

О РОЛИ ОPIOИДНОЙ СИСТЕМЫ В ФОРМИРОВАНИИ ОСОБЕННОСТЕЙ АНКСИОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДНОГО ПРЕПАРАТА СЕЛАНКА

И. И. Козловский¹, Л. А. Андреева², М. М. Козловская³,
А. В. Надорова³, Л. Г. Колик³

Изучены особенности анксиолитического действия пептидного препарата селанка в условиях снижения активности опиоидной системы мозга, индуцированного налоксоном, на инбредных мышцах линий BALB/C и C57BL/6 с высоким и низким уровнем тревожности, пассивным и активным фенотипом эмоционально-стрессовой реакции (ЭСР) в тесте “открытое поле” (ОП). Селанк (0,25 мг/кг внутривнутрибрюшинно) проявлял анксиолитическое действие, увеличивая общую двигательную активность мышцей BALB/C, и не влиял на поведение мышцей C57BL/6 в тесте ОП. Налоксон (1 мг/кг внутривнутрибрюшинно) изменял исходный фенотип ЭСР мышцей BALB/C, вызывая реакцию “стремительного побега” по периферической зоне ОП и оказывал противоположное депримирующее действие у мышцей C57BL/6, выраженное в реакции замиранья. На фоне предварительно введенного налоксона у мышцей BALB/C чувствительность к анксиолитическому действию селанка снижалась, у мышцей C57BL/6, напротив, повышалась. Полученные результаты выявляют новую мишень в действии селанка на ЦНС и свидетельствуют о значении активности опиоидной системы в формировании индивидуальной чувствительности к действию селанка.

Ключевые слова: селанк, анксиолитик, эмоциональный стресс, опиоидная система, налоксон, мыши BALB/C, мыши C57BL/6

ВВЕДЕНИЕ

Селанк — новый оригинальный отечественный пептидный препарат, сочетающий анксиолитическое и стимулирующее действие. Эффективен при лечении тревожных расстройств разной структуры, характеризуется быстротой наступления терапевтического действия и отсутствием нежелательных побочных эффектов [8]. Селанк разработан, фармакологически изучен и внедрен в медицинскую практику в результате совместных исследований НИИ фармакологии им. В. В. Закусова и ИМГ РАН (Рег. № ЛСР 003338/09 от 30.04.2009).

Экспериментально установлено, что селанк обладает широким спектром нейрорепроактивной активности: оптимизирует процессы обучения, памяти, переобучения и восстановления сложного навыка пространственной зрительной ориентировки, нарушенного стрессом и/или нейротоксическим воздействием [5, 9]. Установлена зависимость антистрессорного действия селанка от наследуемого фенотипа эмоционально-стрессовой реакции (ЭСР), антидепрессивная и антиагедоническая активность [2].

Механизм центрального нейробиохимического действия селанка многокомпонентен [3, 7, 9] и включает

ингибирование ферментов деградации опиоидных пептидов (энкефалинов), повышающих активность энкефалин-опиоидной системы мозга (ЭОС) [6]. ЭОС играет ведущую роль в регуляции эмоционального стресса и тревоги [13, 15], однако фармакологические данные о ее роли в формировании противотревожного действия известных и новых анксиолитиков единичны и противоречивы [10, 12]. Актуальным остается анализ роли ЭОС в противотревожном и стресс-протекторном действии селанка. Совокупность представленных выше данных явилась обоснованием для проведения настоящего исследования.

Целью работы было изучение особенностей формирования анксиолитического действия селанка в условиях снижения активности ЭОС, вызванной введением блокатора опиоидных рецепторов конкурентного типа налоксона, в связи с наследуемым, высоким и низким, соответственно, уровнем тревоги у мышцей инбредных линий BALB/C и C57BL/6 в стресс-ситуации “открытого поля”.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на мышцах-самцах линий BALB/C ($n = 80$) и C57BL/6 ($n = 80$), массой 20–22 г, полученных из питомника “Столбовая” РАМН. Мышей содержали в стандартных условиях вивария НИИ фармакологии РАМН, по 10 особей в клетке, при свободном доступе к воде и корму, при естественном световом режиме, в течение 14 суток до начала экспериментов. Опыты проводили в осенне-зимний период, с 10:00 до 14:30. Для воспроизведения эмоционального стресса (ЭС) у мышцей использовали метод “открытое

¹ Кафедра адаптивной физической культуры (зав. — проф. М. М. Расулов) Московский городской педагогический университет, 117303, Москва, Балаклавский просп., 32, к. 4.

² Отдел химии физиологически активных веществ (зав. — акад. РАН Н. Ф. Мясоедов) ИМГ РАН, Москва.

³ Лаборатория фармакологической регуляции состояний зависимости (зав. — Л. Г. Колик) НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

поле” (ОП) [1]. Количественную оценку эмоционально-стрессовой реакции (ЭСР) мыши в ОП проводили, регистрируя двигательную активность (ДА) — горизонтальную активность (раздельно в периферической и центральной зонах ОП по числу пересеченных квадратов) и суммарно, включая вертикальные стойки (вертикальная активность). Оценивали также специфическую реакцию “замирания” (freezing-реакция), как проявление тревоги-страха у мышей.

Анксиолитик гептапептид селанк (Thr-Liz-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro, субстанция, ИМГ РАН) и антагонист опиоидных рецепторов налоксон (субстанция, “Sigma”, Польша), а также физраствор вводили мышам внутрибрюшинно в водных растворах, в объеме 0,2 – 0,3 мл. Селанк использовали в ранее установленной, оптимальной анксиолитической дозе 0,25 мг/кг, налоксон — в дозе 1 мг/кг, согласно большинству представленных в литературе экспериментальных данных. Разработанная нами схема введения препаратов включала проведение 4-х серий исследований, с одиночным и сочетанным введением селанка и налоксона, в разной последовательности. Были сформированы 2 группы мышей каждой линии — А и Б. Каждая группа включала 4 подгруппы (табл. 1 и 2). Первые 3 подгруппы сопоставляли с основной подгруппой 4, все подгруппы сопоставляли с подгруппой 1 (двойное введение физраствора). Тестирование мышей в ОП проводили через 25 мин после однократного или сочетанного введения препаратов, а также физраствора. В группе А селанк вводили за 20 мин до налоксона, в группе Б — через 5 мин после налоксона.

Статистическую обработку проводили с использованием метода Mann-Whitney U-test и представляли в виде $M \pm SEM$. Все подгруппы сопоставляли с подгруппой 1, подгруппу 4 сопоставляли с подгруппами 2 и 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования выполнены на мышках линий BALB/C и C57BL/6 с высоким и низким уровнем тревожности, соответственно. Для мышей BALB/C в ОП характерен “пассивный” фенотип ЭСР, низкая двигательная активность и реакция замирания (freezing-реакция). Для мышей C57BL/6 в ОП характерен активный фенотип ЭСР в ОП с высоким уровнем двигательной и исследовательской активности.

Действие селанка на показатели ЭСР мышей BALB/C при одиночном и сочетанном с налоксонем введении

Селанк при одиночном введении оказывал присутствующее ему анксиолитическое и активирующее действие на показатели ЭСР мышей BALB/C в ОП, устраняя freezing-реакцию и повышая двигательную активность (ДА). Периферическая ДА возрастала в 4,76 и 3,2 раза, центральная ДА возрастала в 4,7 и 5 раз, общая ДА повышалась в 4,7 и 3,7 раза, соответственно, в группах А и Б (табл. 1: А2 и Б2). Поведение мышей на фоне селанка могло быть охарактеризовано как ориентировочно-исследовательское. Налоксон при одиночном введении модулировал пассивную форму ЭСР мышей BALB/C в ОП в активную, freezing-реакция не наблюдалась, общая двигательная активность достоверно возрастала в 2,4 и 4,4 раза, соответственно, в группах А и Б (табл. 1: А3 и Б3) и реализовалась в форме побега преимущественно по периферии ОП с короткими остановками (прерывистый, или “рваный” бег).

Сочетанное действие селанка и налоксона на ЭСР мышей BALB/C в ОП представлено в табл. 1: А4 и Б4. Налоксон, введенный после селанка, снижал активирующее действие последнего (сопоставление данных табл. 1: А2 и А4). Периферическая ДА уменьшалась в 2,2 раза, общая двигательная активность снижалась в 2,4 раза, выходы в центральные зоны и вертикальная активность практически не изменялись. Налоксон, введенный до селанка, также снижал активирующее

Таблица 1. Действие селанка на поведение мышей BALB/C в “открытом поле” при одиночном и совместном введении с налоксонем в разной последовательности (группы А и Б)

Подгруппа	Вводимые вещества, мг/кг	Двигательная активность мышей в “открытом поле”			
		периферическая	центральная	вертикальная	общая
Группа А: селанк на фоне последующего введения налоксона					
А1	Физраствор + физраствор	23,3 ± 2,6	2,3 ± 1,4	0,167 ± 0,67	25,7 ± 3,3
А2	Селанк + физраствор	111,0 ± 13,6**	9,5 ± 3,4	0,17 ± 0,17	120,7 ± 14,4**
А3	Физраствор + налоксон	61,17 ± 7,62**	0,17 ± 0,17	0,0 ± 0,0	61,3 ± 7,6**
А4	Селанк + налоксон	50,5 ± 7,2**	0,17 ± 0,17	0,0 ± 0,0	50,7 ± 7,3**
Группа Б: селанк на фоне предварительного введения налоксона					
Б1	Физраствор + физраствор	31,0 ± 4,4	1,0 ± 0,63	0,0 ± 0,0	32,0 ± 4,8
Б2	Физраствор + селанк	100,3 ± 8,9**	5,7 ± 7,7*	3,5 ± 2,2	109,0 ± 15,7**
Б3	Налоксон + физраствор	135,8 ± 21,6**	6,5 ± 6,5	1,3 ± 1,1	143,7 ± 23,1**
Б4	Налоксон + селанк	84,3 ± 4,4***	8,5 ± 2,8*	3,6 ± 1,9*	96,5 ± 4,1**

Примечание. Здесь и в табл. 2 достоверные отличия экспериментальных подгрупп от подгрупп А1 и Б1, соответственно: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$; подгруппы А4 от подгруппы А2[#] — $p < 0,05$; подгруппы Б4 от подгруппы Б3^{##} — $p < 0,05$.

действие последнего, однако выраженность этого эффекта была меньше (сопоставление данных табл. 1: Б2 и Б4). Периферическая ДА уменьшалась в 1,19 раза, общая ДА снижалась в 1,23 раза.

Действие селанка на показатели ЭСР мышей C57BL/6 при одиночном и сочетанном с налоксоном введении

Селанк при одиночном введении не оказывал достоверного влияния на показатели ЭСР мышей C57BL/6 (табл. 2: А2 Б2), в отличие от его действия на мышей BALB/C, что согласуется с ранее полученными нами данными [1, 3]. Налоксон при одиночном введении, напротив, оказывал выраженное действие на показатели поведения мышей C57BL/6 в ОП, изменяя (модулируя) типичную для этих мышей активную форму ЭСР в пассивную (табл. 2: А3 и Б3). Периферическая ДА уменьшалась в 2 и 1,4 раза, общая ДА уменьшалась в 1,9 и 1,7 раз, снижалась также центральная и вертикальная ДА (в 1,3 и 1,9 раза) (табл. 2: А3 и Б3 соответственно).

Сочетанное действие селанка и налоксона на ЭСР мышей C57BL/6 в ОП представлено в табл. 2: А4 и Б4. При одиночном введении селанка мышам C57BL/6 их поведение в ОП не изменялось. При сочетанном введении селанка и налоксона чувствительность мышей C57BL/6 к его действию на показатели ЭСР мышей существенно повышалась. В зависимости от последовательности введения фармакологических препаратов селанк снижал или устранял депримирующее действие налоксона на показатели ЭСР мышей C57BL/6 (табл. 2: А4 и Б4). При введении до налоксона селанк снижал, а после налоксона устранял депримирующее действие последнего на поведение мышей C57BL/6 (табл. 2: А4). Сниженная налоксоном периферическая ДА при последующем введении селанка возрастала в 2 раза, центральная и вертикальная ДА увеличивались в 1,7 и 2,0 раза, соответственно, общая ДА возрастала в 1,5 раза (табл. 2: Б3 и Б4, соответственно). Селанк, введенный до налоксона, снижал, но полностью не предупреждал депримирующее действие последнего.

В нашем исследовании был проведен поведенческий анализ особенностей формирования анксиолитического действия нового анксиолитика селанка в условиях фармакологически вызванного снижения активности ЭОС, обусловленного введением блокатора опиоидных рецепторов налоксона, на мышцах BALB/C и C57BL₆ с наследуемым высоким и низким уровнем тревожности, пассивным и активным фенотипом ЭСР в методе ОП. Анализ полученных данных позволяет также говорить об изменении индивидуальной чувствительности к действию селанка мышей обеих линий, обусловленном введением налоксона.

В настоящее время имеются экспериментальные данные, что состояние тревоги, провоцирующей стресс, сопровождается повышением синтеза и высвобождения опиоидных пептидов в эмоциогенных структурах мозга [10, 13, 14]. В единичных исследованиях показано, что содержание опиоидов в мозге мышей BALB/C ниже и увеличение их при стрессе меньше по сравнению с низкотревожными мышами C57BL/6 или DBA [10, 11, 13], что объясняет высокую чувствительность мышей BALB/C к действию анксиолитика селанка, увеличивающего содержание эндогенных опиоидов [6]. Снижение активности ЭОС, вызванное налоксоном, сопровождается реверсией фенотипических особенностей ЭСР мышей BALB/C и C57BL/6 в стресс-ситуации ОП и изменением (снижением или повышением) чувствительности к анксиолитическому действию селанка, соответственно. С точки зрения генетического фактора формирования фенотипических особенностей реакции на стресс и значимости анализа индивидуальной чувствительности к действию анксиолитиков [8, 13, 15] полученные в исследовании данные показывают зависимость формирования анксиолитического действия от фенотипически детерминированной ЭСР на стресс, обусловленной функциональным состоянием ЭОС.

Таблица 2. Действие селанка на поведение мышей C57BL/6 в “открытом поле” при одиночном и совместном введении с налоксоном в разной последовательности (группы А и Б)

Подгруппа	Вводимые вещества, мг/кг	Двигательная активность мышей в “открытом поле”			
		периферическая	центральная	вертикальная	общая
Группа А: селанк на фоне последующего введения налоксона					
А1	Физраствор + физраствор	86,3 ± 5,5	13,67 ± 2,72	17,33 ± 3,96	118,3 ± 7,95
А2	Селанк + физраствор	83,5 ± 10,8	17,83 ± 1,74	11,83 ± 2,1	115,83 ± 10,07
А3	Физраствор + налоксон	42,3 ± 5,2**	10,5 ± 2,1	9,17 ± 1,5	62,0 ± 7,9**
А4	Селанк + налоксон	45,3 ± 3,8***#	14,5 ± 1,28	7,83 ± 1,11*	68,3 ± 3,96***#
Группа Б: селанк на фоне предварительного введения налоксона					
Б1	Физраствор + физраствор	93,3 ± 5,55	15,5 ± 2,96	12,7 ± 0,91	132,7 ± 5,7
Б2	Физраствор + селанк	83,8 ± 6,5	16,5 ± 3,1	14,33 ± 3,0	115,83 ± 4,1**
Б3	Налоксон + физраствор	50,83 ± 4,3**	12,5 ± 2,6	8,5 ± 1,12*	72,3 ± 5,5**
Б4	Налоксон + селанк	102,8 ± 5,5##	19,67 ± 2,65##	17,33 ± 2,59##	140,67 ± 10,0##

ВЫВОДЫ

1. На фоне блокатора опиоидных рецепторов налоксона мышам BALB/C и C57BL/6 изменяется индивидуальная чувствительность к стресс-протекторному действию анксиолитика селанка.

2. Налоксон модулирует исходный пассивный фенотип ЭСР мышей BALB/C в активную реакцию побега, что сопровождается относительным снижением чувствительности к действию селанка.

3. Модифицированная налоксоном активная ЭСР мышей C57BL/6 в ОП приобретает черты пассивной формы, что сопровождается повышением чувствительности к действию селанка.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. М. Козловская, И. И. Козловский, Е. А. Вальдман, С. Б. Середенин, *Физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, **88**(6), 751 – 761 (2002).
2. М. М. Козловская, К. Ю. Саркисова, И. И. Козловский, *Психофармакол. и биол. наркол.*, 5, Вып. 3(2), 989 – 996 (2005).
3. И. И. Козловский, С. Б. Середенин, Н. Ф. Мясоедов и др., *Материалы Рос. симпозиума по химии и биол. пептидов*, ИБХ РАН, Москва (2003), с. 74.
4. И. И. Козловский, Ф. Ю. Белозерцев, Т. П. Семенова, *Научно-практич. журн. Pathogenesis*, № 3, 66 (2008).
5. И. И. Козловский, Ф. Ю. Белозерцев, Т. П. Семенова, *Экспер. и клин. фармакол.*, **71**(2), 3 – 7 (2008).
6. Н. В. Кост, В. К. Мешавкин, О. Ю. Соколов и др., *Вестн. РАМН*, № 3, 24 – 33 (2007).
7. В. Б. Наркевич, В. С. Кудрин, П. М. Клодт и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **71**(5), 28 – 31 (2008).
8. Г. Г. Незнамов, Е. С. Телешова, В. К. Бочкарев и др., *Терапия психических заболеваний*, Москва (2002), сс. 28 – 36.
9. Т. П. Семенова, И. И. Козловский, Н. М. Захарова, М. М. Козловская, *Экспер. и клин. фармакол.*, **73**(8), 2 – 5 (2010).
10. A. Agmo, C. Belzung, *Neuropharmacology*, **37**(2), 223 – 232 (1998).
11. C. Belzung, S. Barreau, A. Shaneperr, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **65**(3), 419 – 423 (2000).
12. H. Cohen, A. B. Gevo, M. A. Mate, *Int. J. Neuropsychopharmacology*, **11**(3), 2008331 – 349 (2008).
13. S. D. Brain, N. M. Cox, *Br. J. Pharmacol.*, **147**, Suppl. 1, S202 – 211 (2006).
14. M. Narita, C. Kaneko, K. Miyoshi, et al., *Neuropsychopharmacology*, **31**(4), 739 – 750 (2006).
15. R. G. Rodgers, R. Angar, N. Berryman, et al., *Psychopharmacology*, № 187, 345 – 355 (2006).

Поступила 02.02.11

THE ROLE OF OPIOID SYSTEM IN PECULIARITIES OF ANTI-ANXIETY EFFECT OF PEPTIDE ANXIOLYTIC SELANK

I. I. Kozlovskii¹, L. A. Andreeva², M. M. Kozlovskaya³,
A. V. Nadorova³, and L. G. Kolik³

¹ Adaptive Physical Activity Department, Moscow State Pedagogical University, Balaklavskii prosp. 32/4; Moscow, 117303, Russia

² Department of Chemistry of Physiologically Active Compounds. Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182, Russia

³ Laboratory of Pharmacological Regulation of Addiction States, Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiyskaya 8, Moscow, 125315, Russia

Peculiarities of the anxiolytic effects of selank (heptapeptide analog of taftsin) under reduced activity of opioid system upon acute administration of naloxone have been studied in BALB /C and C57BL/6 inbred mice with high and low levels of anxiety, with passive and active emotional stress reaction phenotypes in the open field (OF) test. Selank (0.25 mg/kg, i.p.) per se exhibited anxiolytic effect in BALB/C mice by increasing the general locomotor activity, with no effects on the behavior of C57BL/6 mice in the OF test. Naloxone (1.0 mg/kg, i.p.) per se evoked swift runaway in OF peripheral areas in BALB /C mice while “freezing” the reaction in C57BL/6 mice with active response to stress under the same conditions. Pretreatment with naloxone attenuated the sensitivity to selank in BALB/C mice whereas the response to anxiolytic effects of peptide was increased in C57BL/6 mice. The data obtained reveal a new target for selank in CNS and indicate significance of the activity of enkephalin-opioid system in individual sensitivity to selank.

Key words: Selank, anxiolytic drug, emotional stress, enkephalin, opioid system, naloxone, BALB/C and C57BL/6 mice