

*На правах рукописи*

**ДРАВОЛИНА Ольга Андреевна**

**ВЛИЯНИЕ АНТАГОНИСТОВ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ НА  
ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ НАРКОТИЧЕСКОЙ  
ТОЛЕРАНТНОСТИ И ЗАВИСИМОСТИ**

14.00.25 - фармакология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург 2000

Работа выполнена в Институте фармакологии им. А.В. Вальдмана Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор Э.Э. Звартау

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор И.В. Маркова

доктор медицинских наук, профессор Н.А. Лосев

**Ведущее учреждение:**

НИИ фармакологии РАМН

Защита диссертации состоится "17" марта 2000 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета К074 37.02 в Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им.акад. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8) на заседании Ученого Совета.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке университета.

Автореферат разослан "16" февраля 2000 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
профессор

Э.Э. Звартау

A2000  
2368

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** NMDA-рецепторы представляют собой подтип глутаматных ионотропных рецепторов и обнаружены практически во всех отделах и структурах ЦНС млекопитающих (Watkins, Evans, 1981). NMDA-рецепторный комплекс имеет сложное надмолекулярное строение и состоит из нескольких связывающих участков (рецепторов). Наибольший интерес для фармакотерапии представляют: 1) участок связывания агонистов (глутамат, NMDA) и конкурентных антагонистов; 2) участок связывания "канальных" блокаторов (фенциклидин, кетамин, мсмантин) (McBain, Mayer, 1994); 3) участок связывания коагонистов глицина и D-серина (другие названия этого рецептора: стрихнин-нечувствительный глициновый рецептор, глицин<sub>в</sub> рецептор) и глициновых антагонистов (Danysz, Parsons, 1998; Johnson, Ascher, 1987); 4) участок связывания полиаминов (спермин, спермидин) и полиаминовых антагонистов (McBain, Mayer, 1994; Williams, 1993). Между участками комплекса существуют сложные функциональные взаимоотношения, определяющие действие веществ данной группы в целом на NMDA-рецепторный комплекс (Johnson, 1996; Thomson, 1990; Voltz et al., 1994; Williams, 1997).

Исследования последних лет показали, что реализация мнестических функций существенно зависит от уровня активности NMDA-рецепторов. Именно NMDA-рецепторы, благодаря своим уникальным свойствам, способны участвовать в регуляции нейрональной пластичности и, таким образом, способствовать обучению и памяти. В самом широком смысле обучение определяют как изменение поведения, обусловленное индивидуальным опытом, а память как механизм, с помощью которого опыт накапливается и может становиться источником адаптивных изменений поведения (Шеперд, 1987). Одним из примеров таких адаптивных реакций являются толерантность и зависимость, развивающиеся при введении аддиктивных веществ. Имеются основания предполагать, что NMDA-рецепторы играют роль в развитии и/или проявлении этих реакций, хотя полученные к настоящему времени данные в достаточной степени противоречивы (Tanganelli et al., 1991; Marquis et al., 1991; Matwyshyn et al., 1993; Thorat et al., 1994).

Недостаточно изученным остается терапевтический потенциал различных лигандов NMDA-рецепторов при фармакотерапии аддиктивных состояний. Известно, что фенциклидиноподобные неконкурентные антагонисты обладают психотомиметической активностью и значительным наркотическим потенциалом (Kemp et al., 1987; Balster, Willetts, 1996). Сравнительные исследования антагонистов данного класса и антагонистов NMDA-рецепторов с иным механизмом взаимодействия с рецепторным комплексом (конкурентные, глициновые, полиаминовые) показывают существенные отличия между этими веществами (Gorelick, Balster, 1995,

1995

Sharkey et al., 1996) и могут служить основой для поиска антагонистов NMDA-рецепторов, лишенных фенциклидиноподобных побочных эффектов. Например, антагонисты NMDA-рецепторов, связывающиеся с глициновым участком, не только лишены фенциклидиноподобной активности, но и сами обладают атипичным нейролептическим действием (Bristow et al., 1996).

В очень малой степени исследованы эффекты длительного введения антагонистов NMDA-рецепторов и связанное с ним появление различных изменений в функциональной активности глутаматергической системы, которые могут также стать причиной ограничения клинического применения некоторых веществ данной группы (Kooyuncuoglu, Aricioglu, 1991; McDonald et al., 1990; Wessinger, 1994).

Настоящая работа выполнена в рамках государственной программы ГНТП "Национальные приоритеты в медицине и здравоохранении" (направление 05 "Наркомании, токсикомании, алкоголизм"; тема: "Разработка в эксперименте новых моделей влечения к наркотикам и алкоголю и способов его фармакологической коррекции"; сроки выполнения: 1996-2000 гг.), а также отраслевой научно-исследовательской программы "Разработка функционально-метаболических основ патогенеза, совершенствование диагностики, лечения и реабилитации больных с заболеваниями нервной системы" (тема договора № 739/147/052 от 27.05.98: "Разработка и изучение методов лекарственного и немедикаментозного лечения болевых синдромов в эксперименте и клинике", 1998-2002 гг.) и отраслевой научно-исследовательской программы "Разработка эффективных методов и средств профилактики, диагностики и лечения наркологических заболеваний на основе медико-биологических, клинических и медико-социальных исследований" (тема: договора № 621/147/050 от 05.02.99: "Изыскание и изучение средств фармакотерапии наркотоксикоманий и алкоголизма в ряду веществ, влияющих на ионные каналы и нейрональные рецепторы").

Целью работы являлось исследование влияния антагонистов NMDA-рецепторов, селективно связывающихся с различными участками NMDA-рецепторного комплекса, на формирование и/или проявление адаптивных реакций, сопутствующих введению наркотических средств.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Провести анализ эффектов антагонистов NMDA-рецепторов, селективно связывающихся с различными участками NMDA-рецепторного комплекса, на моделях, оценивающих подкрепляющие свойства аддитивных веществ.
2. Изучить влияние антагонистов NMDA-рецепторов на развитие и/или проявление "острой" толерантности к действию морфина
3. Изучить влияние антагонистов NMDA-рецепторов на сомато-

вегетативные проявления и дискриминативный стимульный компонент опиатного абстинентного синдрома и определить возможность фармакологической коррекции поведенческих реакций, обусловленных введением морфина.

4 Оценить эффекты длительного введения антагонистов NMDA-рецепторов.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. NMDA-рецепторы участвуют в выработке и экспрессии условнорефлекторного поведения, основанного на подкрепляющих свойствах эталонных наркотических средств (морфин, кокаин). Учитывая важную роль раздражителей, ассоциированных с приемом наркотиков, в генезе рецидивов наркоманий и показанную в настоящем исследовании способность антагонистов NMDA-рецепторов препятствовать выработке и экспрессии поведенческих реакций, обусловленных действием наркотиков, следует прогнозировать терапевтический эффект данной группы фармакологических средств при противорецидивном поддерживающем лечении у наркологических больных

2. NMDA-рецепторы участвуют в выработке контрадаптивных реакций на воздействие опиатов, в частности, при развитии опиатной толерантности и зависимости. Предупреждение или подавление ответной глутаматергической реакции, реализуемой через NMDA-рецепторы, является новым способом повышения эффективности опиатной анальгезии, а также открывает новые возможности лекарственной терапии опиатного абстинентного синдрома.

3. Существуют взаимные модулирующие влияния между различными участками NMDA-рецепторного комплекса, которые могут быть выявлены в поведенческих тестах в форме перекрестных толерантности и сенситизации к действию антагонистов, селективных к определенному участку NMDA-рецепторного комплекса, при субхронической блокаде места связывания конкурентных антагонистов

4. Низкоаффинные канальные блокаторы и антагонисты глицинового участка NMDA-рецепторов имеют преимущества по эффективности и безопасности по сравнению с антагонистами других подклассов и являются наиболее перспективными средствами в плане дальнейшего клинического развития.

**Научная новизна.** Результаты исследования развивают представления о роли NMDA-рецепторов в патогенезе адаптивных реакций, развивающихся при употреблении наркотиков. Впервые доказано угнетающее действие антагонистов NMDA-рецепторов на подкрепляющие свойства опиатов (морфина). Впервые получены сравнительные данные о способности антагонистов NMDA-рецепторов различных подклассов блокировать проявления морфинового абстинентного синдрома и, в меньшей степени, влиять на его дискриминативные стимульные свойства

Впервые показана способность различных антагонистов NMDA-рецепторов блокировать развитие так называемой “острой” толерантности к аналгетическому эффекту, развивающейся после однократной инъекции опиатов (морфина). Полученные данные обосновывают целесообразность разработки на основе антагонистов NMDA-рецепторов лекарственных средств для лечения и профилактики наркоманий. Научная новизна данной работы подчеркивается тем фактом, что в настоящее время только один антагонист NMDA-рецепторов (мемантин) зарегистрирован для клинического применения в России, а также тем, что антагонисты NMDA-рецепторов ранее не рассматривались как перспективные средства для лечения и/или профилактики наркоманий.

**Научно-практическое значение работы.** Полученные данные определяют новое направление поиска новых эффективных методов фармакотерапии болевых синдромов, опиатного абстинентного синдрома и поддерживающего противорецидивного лечения наркологических больных. Показана необходимость использования и предложен вариант методики, оценивающей дискриминативные стимульные свойства опиатного абстинентного синдрома, которая может в дальнейшем успешно применяться при апробации новых препаратов. Результаты сравнительного анализа эффектов антагонистов, избирательно связывающихся с различными участками NMDA-рецепторного комплекса, позволяют указать на низкоаффинные каналные блокаторы и антагонисты глицинового участка связывания как наиболее клинически перспективные соединения ввиду выгодного соотношения терапевтических и побочных эффектов.

**Реализация результатов исследования.** Результаты исследования внедрены в практику учебной и исследовательской работы кафедры фармакологии и НИЦ СПбГМУ им. акад. И П Павлова, а также в исследовательскую работу Ленинградского областного наркологического диспансера

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на Научной сессии Института фармакологии им. А В. Вальдмана СПбГМУ им. акад. И П Павлова (Санкт-Петербург, 1997), на V и VI Российских национальных конгрессах “Человек и лекарство” (Москва, 1998-1999), на Всероссийской научной конференции “Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии” (Санкт-Петербург, 1999), на 2-ом Пленуме правления Российского научного общества фармакологов (Санкт-Петербург, 1999), 10-й и 12-й конференциях Европейской Коллегии нейропсихофармакологии (Вена, Австрия, 1997 и Лондон, Великобритания, 1999), на 61-ом заседании Коллегии по проблемам лекарственной зависимости (Акапулько, Мексика, 1999), на съезде Общества нейронаук (Майами, США, 1999), на совместных заседаниях кафедры фармакологии, отдела психофармакологии и лаборатории фармакологии поведения Института фармакологии им. А.В.

Вальдмана СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова (1997-2000).

По результатам исследования опубликовано 14 работ.

**Структура работы.** Диссертация изложена на 185 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 3 глав с результатами собственных исследований и их обсуждением, заключения, выводов и библиографического указателя (321 источников, из них 309 зарубежных работ). Работа иллюстрирована 40 рисунками и 11 таблицами.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальная часть работы выполнена на 1109 самцах крыс линии Вистар и 1518 самцах мышей линий DBA/2 и SHR, полученных из питомника “Раполово” (Лен. область).

В работе использовали следующие вещества: морфина гидрохлорид (Эндокринный завод, Москва, Россия), кокаина гидрохлорид (Центральная городская аптечная база, С-Петербург, Россия), налоксона гидрохлорид (Research Biochemicals Inc., США), лоперамида гидрохлорид (Janssen Pharmaceutica, Бельгия), метилналоксона гидрохлорид (Research Biochemicals Inc., США), а также антагонисты NMDA-рецепторов, селективно связывающиеся с различными участками NMDA-рецепторного комплекса (таблица 1).

Морфин, кокаин, налоксон, метилналоксон, дизоцилпин, мемантин, D-CPPene, MRZ-2/579, MRZ-2/576 растворяли в изотоническом растворе NaCl; элипродил - в водном растворе Alkamuls EL-620 (этоксилированное касторовое масло, Rhone-Poulenc, США) и этанола в соотношении 1:1:18; CP-101,606 - в 0.1% водном растворе метилцеллолозы; ACEA-1021 и лоперамид - в 50% водном растворе диметилсульфоксида (завод “Химреактивкомплект”, Россия). ACEA-1021 растворяли также в 1% водном растворе Твина-80 (Sigma Chemical Co., США) для проведения тестов “отдергивания хвоста” и при изучении влияния на условнорефлекторное предпочтение места, ассоциированное с морфином. При растворении D-CPPene нейтральную реакцию среды (pH 7.2) восстанавливали с помощью NaOH. Все растворы вводили в объеме 1 мл/кг для крыс и 10 мл/кг для мышей.

Результаты экспериментов обрабатывали с помощью пакета статистических программ “САС” (версия 6 11; SAS Institute, США) После ранжирования данных статистическую достоверность действия веществ и его дозозависимость оценивали с помощью одно-, двух- и многофакторного дисперсионного анализа (градуальный учет) и пробит-анализа (альтернативный учет), адаптированных для ситуаций с повторными измерениями и с разным размером групп. Межгрупповые сравнения (тесты/критерии Тьюки, Дункана, Даннега, Мани-Уитни).

Вилкоксона,  $\chi$ -квадрат) проводили только при условии, что достоверный эффект был выявлен процедурой дисперсионного анализа. Достоверность результатов при альтернативном учете оценивали с помощью точного метода Фишера. Значения ЭД50 рассчитывали с помощью пробит-анализа (альтернативный учет) и регрессионного анализа (градуальный учет).

Таблица 1. Антагонисты NMDA-рецепторов, использованные в работе

Тип антагониста	Название	Диапазон доз <sup>1</sup>
Высокоаффинный блокатор канала	Дизоцилпин (МК-801) <sup>2</sup>	0.01-1 мг/кг
Низкоаффинный блокатор канала	Мемантин <sup>3</sup>	1-30 мг/кг
	MRZ 2/579 <sup>4</sup>	1-30 мг/кг
Конкурентный антагонист	D-CPPene <sup>5</sup>	0.1-10 мг/кг
Глициновый антагонист	ACEA-1021 <sup>6</sup>	3-56 мг/кг
	MRZ 2/576 <sup>7</sup>	1-10 мг/кг
Полиаминовый антагонист	Элипродил <sup>8</sup>	1-30 мг/кг
	CP-101,606 <sup>9</sup>	10-56 мг/кг

Примечание <sup>1</sup> - при системном внутривенном введении, <sup>2</sup> - (+)-5-метил-10,11-дигидро-5Н-либензо-[a,d]-циклопентен-5,10-имина малеат (Research Biochemicals Inc, США), <sup>3</sup> - 1-амино-3,5-диметил-адамантана гидрохлорид (Merz+Co, Германия), <sup>4</sup> - 1-амино-1,3,3,5,5-пентаметил-циклогексана гидрохлорид (Merz+Co, Германия), <sup>5</sup> - SDZ EAA 494, (+)-3-(2-карбоксихиперазин-4-ил)-1-пропенил-1-фосфоновая кислота (Novartis Pharma, Швейцария), <sup>6</sup> - 5-нитро-6,7-дихлоро-1,4-дигидро-2,3-хиноксалиндион (CoCensys Inc, США), <sup>7</sup> - 8-хлоро-4-гидрокси-1-оксо-1,2-дигидропиридаино(4,5-b)хинолин-5-оксида холиновая соль (Merz+Co, Германия), <sup>8</sup> - Synthelabo Recherche, Франция, <sup>9</sup> - (1S,2S)-1-(4-гидроксибензил)-2-(4-гидрокси-4-фенилпиперидино)-1-пропанол-метана сульфонат (Pfizer Inc, США)

## 1. Анализ эффектов антагонистов NMDA-рецепторов на моделях, оценивающих подкрепляющие свойства наркотиков

Изучение влияния антагонистов NMDA-рецепторов на поведение, контролируемое условными раздражителями, ассоциированными с действием аддитивных веществ, проводилось на моделях внутривенного самовведения, условнорефлекторного предпочтения места и условнорефлекторной локомоторной активации.

Влияние антагонистов NMDA-рецепторов на первично-подкрепляющее действие морфина оценивали с помощью метода внутривенного самовведения (Кузьмин, Звартау, 1991) у самцов необученных мышей. Во время теста одна из мышей ("активная" - АМ) получала в/в инъекции морфина в ответ на собственные выглядывания. Другая ("пассивная" - ПМ) получала инъекции в ритме выглядывания АМ, без связи с собственными выглядываниями. Сочетание инфузий морфина в концентрации 0.5 мг/мл ("оптимальная" концентрация) с оперантной реакцией (выглядывание в отверстия камеры) у АМ приводило к



значимому увеличению соотношения количества выгладываний (R-критерий) по сравнению с ПМ. Для оценки влияния антагонистов NMDA-рецепторов перед тестом животным вводили D-CPPene (0.3-3 мг/кг).

Влияние антагонистов NMDA-рецепторов на вторично-подкрепляющие свойства морфина исследовали на модели условной реакции предпочтения места у крыс в автоматизированной челночной камере (Звартау и соавт., 1984; Звартау, Коваленко, 1986). Выработку предпочтения места (4 дня) проводили в отсеках челночной камеры, разделенных перегородкой на два одинаковых по размеру и различающихся по освещенности, цвету и текстуре пола (металлическая сетка - в темном отсеке и плетеный пластиковый коврик - в светлом) Посадку в один из отсеков сочетали с инъекцией морфина (5 мг/кг), в другой - его растворителя. Предпочтение места оценивали через 2 дня после последнего обусловливания. Перед тестом крысам вводили антагонисты NMDA-рецепторов или их растворители: D-CPPene (1-10 мг/кг), дизоцилпин (0.1 и 0.3 мг/кг), мемантин (1-10 мг/кг), ACEA-1021 (3-17 мг/кг), элипродил (10 и 30 мг/кг) и CP-101,606 (10-56 мг/кг).

Моделирование условнорефлекторной локомоции проводили в специальной экспериментальной установке для автоматической регистрации локомоторной активности "Актометр". Для выработки условнорефлекторной локомоторной активации крысам вводили кокаин (30 мг/кг) и его растворитель ежедневно в течение 5 дней После этих инъекций животных либо возвращали в домашнюю клетку, либо помещали в экспериментальную камеру "Актометра". Для каждой серии опыта для половины животных регистрационная камера была ассоциирована с кокаином (группы УС+), а для другой - с растворителем (группы УС-) Перед тестом (регистрация уровня двигательной активности в "Актометре" на 6-й день) животные получали инъекцию одного из следующих веществ: дизоцилпина (0.03-0.3 мг/кг), мемантина (1-30 мг/кг), D-CPPene (1-10 мг/кг), ACEA-1021 (3-56 мг/кг), элипродила (1-30 мг/кг).

Поведение, контролируемое условными раздражителями, ассоциированными с действием фармакологических средств (морфином, кокаином), оказалось более чувствительным к действию антагонистов NMDA-рецепторов, чем безусловные поведенческие реакции Так, в экспериментах на мышах выработка реакции внутривенного самовведения морфина замедлялась после введения конкурентного антагониста D-CPPene, причем ЭД50 составила 0.52(0.40-0.62) мг/кг, тогда как нарушение двигательной координации в тесте "вращающийся стержень" (Е.А. Блохина, О.Н. Незнанова и А.Ю. Беспалов) происходило при введении больших доз данного вещества (ЭД50=14(0.9-1.9) мг/кг). Аналогичное соотношение ЭД50 на данных поведенческих моделях наблюдалось в опытах с мемантином, проведенных ранее в нашей лаборатории (Semenova et al, 1999).

Как показано в таблице 2, среднеэффективные дозы различных антагонистов NMDA-рецепторов, подавляющие условнорефлекторное увеличение двигательной активности крыс, обусловленное кокаином, были существенно ниже, чем ЭД<sub>50</sub>, влияющие на спонтанную двигательную активность.

Интересно, что выработка условнорефлекторных реакций на действие аддиктивных веществ оказалась более чувствительной к блокаде NMDA-рецепторов, чем экспрессия сформированного ответа. Так, подавление экспрессии условнорефлекторного предпочтения места, ассоциированного с морфином, происходит при использовании в 5-5.6 раз больших доз антагонистов NMDA-рецепторов, чем те, которые требуются для нарушения выработки данной поведенческой реакции (таблица 2).

При оценке соотношения доз, вызывающих условные “нежелательный” (например, влияние на спонтанную двигательную активность крыс) и “терапевтический” (например, подавление условнорефлекторной двигательной активности, ассоциированной с действием кокаина) эффекты, обнаружили, что их значения у высокоаффинных канальных блокаторов, конкурентных и полиаминовых антагонистов находились в диапазоне от 1.2 до 4.9. Значения аналогичного показателя у лиганда глицинового участка связывания ACEA-1021 и низкоаффинного канального блокатора мемантина составили 6.6 и 10.1, соответственно, что может указывать на большую избирательность их действия. В сочетании с имеющимися данными об отсутствии аддиктивного потенциала и нарушений сенсомоторного сопряжения в данном диапазоне доз у глициновых антагонистов и низкоаффинных канальных блокаторов (Willets et al., 1990; Pussinen et al., 1996) можно прогнозировать определенный терапевтический потенциал данных представителей антагонистов NMDA-рецепторов в отношении изменений поведения, контролируемых аддиктивным веществом или стимулами, ассоциированными с его действием.

## **2. Влияние антагонистов NMDA-рецепторов на развитие и/или проявление опиатной толерантности и зависимости**

Толерантность традиционно рассматривают как феномен, развивающийся при хронической, длительной лекарственной экспозиции. Однако при сравнении фармакодинамических и фармакокинетических показателей однократного введения морфина было отмечено, что продолжительность анальгезии значительно короче, чем можно было бы предположить, исходя из кривой “время-концентрация” (рис. 1; Kissin et al., 1991). Это позволило выдвинуть гипотезу “острой” толерантности, а обнаруженную возможность пролонгирования морфиновой анальгезии при сочетанном введении морфина с антагонистами NMDA-рецепторов

Таблица 2. Активность антагонистов NMDA-рецепторов в поведенческих тестах у крыс

Поведенческая модель/тест	Эффект	Дизоцилпин	Мемантин	D-CPPEne	ACEA-1021	Элипродил
Локомоторная активность ("актометр")	Увеличение(↑) или уменьшение(↓) активности	↑ 0.08 (0.06-0.1)	↑ 13.1 (9.4-16.8)	↓ 4.7 (3.1-6.3)	↓ 32.6 (19.6-45.6)	↓ 12.4 (7.9-16.9)
	Подавление условнорефлекторной активации, обусловленной кокаином	0.04 (0.03-0.05)	1.3 (0.9-1.7)	0.95 (0.81-1.09)	4.9 (4.1-5.7)	8.5 (6.9-10.1)
Опиатная зависимость (абстинентный синдром): экспрессия	Подавление дискриминативных стимульных свойств	0.17 (0.11-0.23)	25.7 (11.2-40.2)	8.1 (4.4-11.8)	54.3 (18.8-89.8)	-
	Подавление соматических и вегетативных признаков	0.08 (0.06-0.1)	6.5 (4.8-8.2)	3.2 (1.7-4.7)	24.1 (15.3-32.9)	32.4 (14.4-50.4)
Условная реакция предпочтения места, ассоциированного с действием морфина	Ухудшение выработки <sup>1</sup>	0.05 (0.03-0.07)	3.4 (1.9-4.9)	1.2 (0.8-1.6)	Нет данных	Нет данных
	Подавление экспрессии	0.28 (0.11-0.45)	-	6.1 (3.7-8.5)	-	-

Примечание В таблице представлены среднеэффективные дозы (ЭД50, мг/кг), в скобках указаны границы 95% доверительного интервала  
<sup>1</sup> - данные получены в исследованиях сотрудников отдела психофармакологии Института фармакологии им. А.В. Вальдмана СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова (Беспалов А.Ю., 1994) "-" - нет эффекта

рассматривать как признак замедления развития “острой” толерантности к морфину (Ben-Eliyahu et al., 1992; Bespalov et al., 1998).

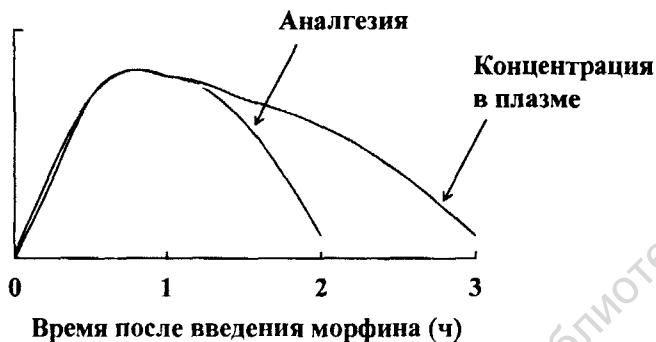


Рис 1 Соотношение уровня аналгезии и концентрации морфина в плазме крови при развитии острой толерантности.

Для изучения влияния антагонистов NMDA-рецепторов на развитие и/или проявление “острой толерантности” к морфину использовали тест “отдергивания хвоста” (D’Amour, Smith, 1941). Анальгетическое действие морфина и его комбинации с исследуемыми веществами (D-CPPene (0.1-1 мг/кг), мемантином (1-10 мг/кг), MRZ-2/579 (1-10 мг/кг), ACEA-1021 (5 и 10 мг/кг), MRZ-2/576 (1-10 мг/кг)) оценивали по показателю “степени аналгезии”, рассчитываемой по формуле, учитывающей уровень болевой реакции до фармакологического воздействия. Антагонисты NMDA-рецепторов вводили одновременно и через 90 мин после морфина, тест проводили через 30 мин после инъекции антагонистов NMDA-рецепторов.

Таблица 3. Активность антагонистов NMDA-рецепторов в тесте “отдергивания хвоста” у мышей

Эффект	Мемантин	D-CPPene	ACEA-1021
Антиноцицептивное действие	-	-	-
Усиление аналгетического действия морфина через 120 мин после его введения	9.3 (7.7-10.9)	0.41 (0.32-0.50)	8.8 (6.9-10.7)

Примечание. В таблице представлены среднееффективные дозы (ЭД<sub>50</sub>, мг/кг), в скобках указаны границы 95% доверительного интервала.

По результатам данного исследования глициновые антагонисты (ACEA-1021 и MRZ-2/576) через 2 часа после инъекции морфина

усиливают его анальгетическое действие. Подобным образом действуют и низкоаффинные канальные блокаторы (мемантин и MRZ-2/579). Конкурентный антагонист D-CPPene усиливает анальгетическое действие морфина независимо от интервала между инъекцией морфина и его введением. Значения ЭД50 для представителей подклассов исследованных веществ представлены в таблице 3.

Приведенные данные указывают на то, что в ответ на стимуляцию опиоидных рецепторов морфином в определенный критический временной интервал развивается контрдаптивная реакция, которая ведет к развитию “острой” толерантности, т.е. более быстрому снижению кривой анальгетического эффекта по сравнению с кривой концентрации морфина в крови (рис. 1), и глутаматергическая система (в частности, NMDA-рецепторы) вовлечена в формирование этого феномена. На основании этих экспериментов можно полагать, что применение антагонистов NMDA-рецепторов в качестве адьювантных средств при обезболивании с помощью морфина и, вероятно, других опиоидов должно повысить эффективность и продолжительность анальгетического эффекта, а также замедлить развитие привыкания к анальгетику, что находит подтверждение в последних данных экспериментальных и клинических исследований (Yang et al., 1996; Christensen et al., 1998; Quartaroli et al., 1999).

В специальной серии экспериментов было изучено влияние антагонистов NMDA-рецепторов на признаки опиатного абстинентного синдрома как наиболее яркого и клинически значимого проявления лекарственной зависимости. Формирование лекарственной зависимости проводили путем введения крысам морфина (15 мг/кг) 2 раза в день в течение 4 недель. После этого через 2 часа после утренней инъекции морфина вводили налоксон (0.1 мг/кг) или комбинации налоксона и антагонистов NMDA-рецепторов. Через 5 мин животных помещали в экспериментальные боксы и в течение 15 мин регистрировали количество поведенческих (потягивания, отряхивания), а также наличие соматовегетативных (птоз, тремор, слюнотечение и диарея) признаков абстинентного синдрома. Все исследованные представители подклассов антагонистов NMDA-рецепторов подавляли проявления соматовегетативных проявлений опиатного абстинентного синдрома (таблица 2)

Была исследована также возможность ослабления дискриминативного стимульного компонента опиатного абстинентного синдрома. Для этого у крыс, зависимых от морфина, вырабатывали диссоциированную реакцию на введение налоксона (0.1 мг/кг) или растворителя. Животных обучали избегать ударов электрического тока (1-1.5 мА), подаваемого на пол Y-образного лабиринта, путем перехода из стартового отсека в безопасный отсек “избегания” (правый или левый, в зависимости от инъекции налоксона или растворителя, предшествовавшей тренировочной сессии). Исследуя влияние антагонистов NMDA-

рецепторов, одновременно с налоксоном вводили дизоциллин (0.03-0.3 мг/кг), мемантин (1-30 мг/кг), D-CPРene (1-10 мг/кг), АСЕА-1021 (10 и 50 мг/кг) и элипродил (3-30 мг/кг). Значения ЭД50 для представителей подклассов исследованных веществ представлены в таблице 2.

Введение антагонистов NMDA-рецепторов ослабляет стимульные свойства опиатного абстинентного синдрома. Обращает на себя внимание то, что эти эффекты достигают уровня статистической значимости при использовании антагонистов NMDA-рецепторов в дозах, превышающих в 2.1-3.9 раза требуемые для устранения сомато-вегетативных проявлений (таблица 2) и вызывающих по данным исследований нашей лаборатории (А.Ю. Беспалов) явные нарушения сенсомоторного сопряжения. Для анализа результатов этих экспериментов имеет значение именно возможность “затенения” антагонистами NMDA-рецепторов дискриминативных стимульных свойств налоксона (т.е. преципитированного им синдрома отмены) В высоких дозах антагонисты NMDA-рецепторов сами обладают мощными стимульными свойствами, на фоне которых “субъективные” эффекты, производимые инъекцией налоксона, могут быть плохо различимы. Это подтверждается неэффективностью полиаминовых антагонистов (таблица 2), которые не обладают фенциклидиноподобными дискриминативными стимульными свойствами (Willetts et al., 1990).

Избирательность действия исследуемых веществ в отношении подавления сомато-вегетативных проявлений и дискриминативного стимульного компонента опиатного абстинентного синдрома оценивали по соотношению ЭД50 в данных поведенческих опытах с ЭД50, вызывающими нарушения оперантного поведения (А.Ю. Беспалов). Оказалось, что наиболее благоприятными показателями характеризовался низкоаффинный блокатор канала мемантин, оказывающий “терапевтическое” действие в дозах, не вызывающих “нежелательные” эффекты.

### **3. Исследование эффектов субхронического введения антагонистов NMDA-рецепторов**

Практически все возможные области клинического применения антагонистов NMDA-рецепторов требуют не однократного, а многократного, повторного введения этих веществ. Длительное введение антагонистов NMDA-рецепторов может быть связано с появлением различных изменений активности глутаматергической системы, и, следовательно, с развитием толерантности/гиперчувствительности к клинически значимым эффектам антагонистов NMDA-рецепторов, формированию физической зависимости от этих веществ (Balster, Willetts, 1996; Kitaichi et al, 1995; Lu et al., 1992; Wessinger, 1994). Кроме того,

возможная “up”-регуляция NMDA-рецепторного комплекса вследствие длительного введения антагонистов NMDA-рецепторов может оказать влияние на формирование опийной толерантности и/или зависимости (Koynucuoglu, Aricioglu, 1991; Koynucuoglu et al., 1992).

Исследование эффектов субхронического введения D-CPPene (56 мг/кг, один раз в день в течение 7 дней) проводили на крысах, содержащихся в условиях с ограниченным доступом к воде, используя методику оперантного поведения. Животных обучали нажимать на педаль стандартной камеры Скиннера за получение водного подкрепления. Экспериментальная методика была основана на множественной схеме подкрепления: фиксированный интервал - 1 сек (по истечении которого животное могло нажать на педаль, чтобы получить подкрепление) с задержкой в 9 сек (время предъявления подкрепления, в течение которого реакции животного также фиксируются, но не приводят к получению следующего подкрепления).

Введение D-CPPene (1-5.6 мг/кг), диозоцилина (0.03-0.3 мг/кг), мемантина (0.3-17 мг/кг), ACEA-1021 (10-56 мг/кг), элипродила (1-30 мг/кг) по-разному влияло на оперантное поведение животных: было отмечено как увеличение (при введении умеренных доз диозоцилина), так и уменьшение (при введении больших доз всех исследуемых веществ) частоты нажатий на педаль; а также различное изменение аккуратности воспроизведения выученной реакции. Аккуратность поведения оценивали путем расчета соотношения количеств “эффективных” (приводивших к получению подкрепления) и “неэффективных” (в течение 9-секундного периода задержки) нажатий на педаль. Уменьшение числа “неэффективных” нажатий на педаль наблюдали после введения ACEA-1021 и элипродила, а увеличение - после введения диозоцилина и высоких доз мемантина и D-CPPene.

Субхроническое введение D-CPPene приводило к ослаблению поведенческих нарушений, вызываемых острым введением D-CPPene (толерантность) и ACEA-1021 (перекрестная толерантность), но усиливало эффекты диозоцилина, мемантина и элипродила (сенситизация).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что после длительного воздействия конкурентного антагониста NMDA-рецепторов D-CPPene изменяется чувствительность рецепторного комплекса к антагонистам со всеми возможными механизмами взаимодействия с NMDA-рецепторным комплексом. Данные изменения могут выражаться как в развитии толерантности и перекрестной толерантности, так и гиперчувствительности к действию веществ данной группы, что соответствует комплексному характеру аллостерических взаимодействий различных участков NMDA-рецепторного комплекса.

Подтверждая данные о повышении аффинности NMDA-рецепторов вследствие двухнедельного введения антагонистов NMDA-

рецепторов (Lason et al., 1997; McDonald et al., 1990; Sanner et al., 1994; Wang et al., 1999; Williams et al., 1992), отмена введения канальных блокаторов NMDA-рецепторов (дизоцилпина, мемантина, MRZ-2/579) у мышей характеризовалась поведенческими отклонениями (снижением порогов болевого реагирования в тесте “отдергивания хвоста” и снижением уровня общительности и длительности элементов исследования среды и увеличением продолжительности элементов статичного поведения в тесте парного взаимодействия с незнакомым партнером (тест “резидент-интродер”)). Только субхроническое введение дизоцилпина облегчало в дальнейшем развитие толерантности к анальгетическому эффекту морфина (тест “отдергивания хвоста”) Исползованные в работе антагонисты NMDA-рецепторов не влияли на дальнейшую выработку зависимости от морфина (тест “резидент-интродер”) Суммарные результаты представлены в таблице 4. Следует отметить, что для воспроизведения синдрома отмены и ускоренного развития толерантности к морфину потребовались большие дозы исследуемых веществ: 0,3-1 мг/кг дизоцилпина, 10-30 мг/кг мемантина, 10-30 мг/кг MRZ-2/579. Подобных эффектов не наблюдали с низкими, но достаточными для угнетения развития толерантности, дозами канальных блокаторов, а также при введении конкурентных антагонистов NMDA-рецепторов (Tiseo et al., 1994).

Таблица 4. Эффекты субхронического введения антагонистов NMDA-рецепторов (14 дней).

Эффекты	Дизоцилпин	Мемантин	MRZ-2/579
Выраженность синдрома отмены введения антагонистов NMDA-рецепторов	+	+	+
Последующее развитие толерантности к анальгетическому эффекту морфина (5 мг/кг, 8 дней)	+	-	-
Выраженность опийного абстинентного синдрома	-	-	-

Примечание “+” - есть эффект, “-” - нет эффекта. Наличие эффекта подразумевает статистически значимые отличия от контроля

## ВЫВОДЫ

1 Антагонисты NMDA-рецепторов предупреждают выработку и подавляют экспрессию условнорефлекторного поведения, подкрепляемого введением эталонных наркотических средств (морфин, кокаин). Выраженность и характер эффекта зависят от типа антагониста и этапа ассоциативного процесса, являющегося “мишенью” действия антагониста (в частности, выработка условнорефлекторного поведения более



чувствительна к действию антагониста, чем экспрессия).

2. Антагонисты NMDA-рецепторов предупреждают формирование “острой” толерантности и пролонгируют анальгетический эффект морфина. Конкурентные антагонисты способны усиливать или продлевать эффекты морфина независимо от времени, прошедшего после введения морфина (30 или 120 мин). Низкоаффинные блокаторы и глициновые антагонисты NMDA-рецепторов не усиливают анальгезию на пике действия морфина, но способны восстанавливать действие морфина через 120 мин после его введения. Сочетанное назначение опиоидных анальгетиков и антагонистов NMDA-рецепторов может быть использовано в качестве перспективного способа повышения эффективности и безопасности терапии болевых синдромов.

3. Антагонисты NMDA-рецепторов уменьшают выраженность опиатного абстинентного синдрома, причем его стимульный (“субъективный”) компонент более резистентен, чем соматические и вегетативные проявления. Для подавления дискриминативных стимульных свойств абстинентного синдрома требуются дозы от 2.1-2.5 (для высокоаффинных канальных блокаторов, конкурентных антагонистов и антагонистов, связывающихся с глициновым участком комплекса) до 3.9 (для низкоаффинных канальных блокаторов) раз большие, чем для устранения сомато-вегетативных проявлений опиатного абстинентного синдрома. Антагонисты NMDA-рецепторов, связывающиеся с полиаминовым участком, не эффективны в подавлении дискриминативных стимульных свойств абстинентного синдрома в исследованном диапазоне доз.

4. Субхроническое введение низкоаффинных канальных блокаторов NMDA-рецепторов, в отличие от высокоаффинных канальных блокаторов, не приводит к ускорению (или усилению) развития толерантности к анальгетическому эффекту морфина, что может быть расценено как показатель отсутствия или низкого риска усиления контрадаптивных глутаматергических реакций при продолжительной блокаде NMDA-рецепторов этими веществами.

5. Различные участки NMDA-рецепторного комплекса оказывают друг на друга модулирующее влияние. Длительное введение конкурентного антагониста D-CPPEne приводит к изменению чувствительности к антагонистам NMDA-рецепторов: выработке толерантности к действию конкурентного (D-CPPEne) и глицинового (ACEA-1021) антагонистов и сенситизации - к высоко- (дизоцилпин) и низкоаффинным (мемантин) канальным блокаторам и полиаминовому антагонисту (элипродил) NMDA-рецепторного комплекса.

## НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Рекомендуется продолжить поиск новых лекарственных средств в ряду антагонистов NMDA-рецепторов с целью создания клинически эффективных препаратов для фармакотерапии наркотической зависимости. Результаты работы целесообразно использовать для дальнейшего изучения взаимовлияний участков NMDA-рецепторного комплекса вследствие субхронических введений веществ данной группы.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Изучение дискриминативных стимульных свойств налоксона в Y-образном лабиринте у морфин-зависимых крыс // Тез. докл. Научной сессии Института Фармакологии им. А.В.Вальдмана. - СПб., 30-31 января 1997 г. - С. 40-41 (соавт. Медведев И.О., Беспалов А.Ю.)

2. Влияние антагонистов NMDA рецепторов на дискриминативные стимульные свойства налоксона в Y-образном лабиринте у морфин-зависимых крыс // В сб. Актуальные проблемы внутренней медицины и стоматологии. - СПб., 1997 - С. 73-74 (соавт.: Медведев И.О., Беспалов А.Ю.).

3. Антагонисты N-метил-D-аспаратных рецепторов: влияние на дискриминативные стимульные и мотивационные свойства наркотиков // Тез. докл. V Российского Национального Конгресса "Человек и лекарство". - Москва, 20-24 апреля 1998 г. - С. 67 (соавт.: Беспалов А.Ю., Белозерцева И.В., Медведев И.О., Сухотина И.А., Звартау Э.Э.).

4. Дискриминативные стимульные свойства налоксона при диссоциированном обучении в Y-образном лабиринте у морфин-зависимых крыс // Журн. высш. нерв. деят. - 1999. - Т 49. - С. 96-105 (соавт.: Беспалов А.Ю., Медведев И.О., Звартау Э.Э.).

5. Условнорефлекторная теория опиатной толерантности: механизмы компенсаторной реакции на острое введение опиатов // Тез. докл. VI Рос. Нац. Конгресса "Человек и лекарство". - Москва, 19-23 апреля 1999 г. (соавт.: Беспалов А.Ю., Белозерцева И.В., Звартау Э.Э.).

6. Влияние селективных антагонистов NMDA рецепторов на экспрессию предпочтения места, обусловленного морфином // Тез. докл. Всерос. научн. конф. "Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии" - СПб., 1-5 июня 1999 г. - С.64 (соавт.: Паткина Н.А., Беспалов А.Ю., Звартау Э.Э.).

7. Влияние антагонистов NMDA-рецепторов на активность морфина у животных с развившейся острой толерантностью к опиатной анальгезии // Тез. докл. 2-ого Пленума правления Российского Научного общества фармакологов "Фармакология и современная медицина" - СПб., 19-21 октября 1999 г. - С. 13-14 (соавт.: Белозерцева И.В., Блохина Е.А., Незнанова О.Н., Беспалов А.Ю.).

8. Discriminative stimulus effects of EAA receptors agonists and antagonists in morphine-dependent rats discriminating between naloxone and saline // 10th ECNP

Congress. - Vienna, Austria, September 13-17, 1997. - P. S263-S264 (co-workers: Bepalov A Y, Medvedev I.O.).

9 Effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on discriminative stimulus effects of naloxone in morphine-dependent rats using the Y-maze drug discrimination paradigm // J. Pharmacol. Exp. Ther. - 1998. - Vol. 286. - P. 1260-1268 (co-workers: Medvedev I.O., Bepalov A.Y.).

10. Modulation of cocaine-conditioned locomotion by site-selective NMDA receptor antagonists in rats // 61st CPDD Meeting. - Akapulco, Mexico, June 12-17, 1999 (co-workers: Bepalov A.Y., Beardsley P.M., Balster R.L., Zvartau E.E.).

11. Modulation of drug-conditioned responses by site-selective NMDA receptor antagonists // Building Intern. Research in Drug Abuse. - Akapulco, Mexico, June 11-12, 1999 (co-workers: Bepalov A.Y., Zvartau E.E., Beardsley P.M., Balster R.L.).

12. Repeated exposures to NMDA receptor channel blockers in mice: no sign of intensification of morphine tolerance and dependence // Pharmacol. Biochem. Behav. - 1999. - Vol. 63. - P. 613-619 (co-workers: Belozertseva I., Danysz W., Sukhotina I., Bepalov A.).

13. Modulation of drug-conditioned responses by NMDA receptor antagonists // 12th ECNP Congress. - London, UK, Sept. 21-25, 1999 - P. S159-S160 (co-workers: Zvartau E.E., Bepalov A.Y., Beardsley P.M., Balster R.L.).

14. Effects of novel low-affinity NMDA receptor channel blocker and glycine<sub>B</sub> receptor antagonist on analgesic and reinforcing properties of morphine in mice // Society for Neuroscience 29<sup>th</sup> Annual Meeting, Miami, FL, October 23-29, 1999. Abstr Soc Neurosci 25 (1), P. 921 (co-workers: Sopala M, Danysz W., Belozertseva I V., Semenova S G., Bepalov A Y.).

A2000  
2368

Из фондов Российской национальной библиотеки

Подписано в печать . Формат 60x84/16  
Печать ризографическая. Заказ № 1/1602.  
И. л. 1.25. Уч.-изд. л. 1.25. Тираж 100 экз.