

Потенцирование гепарином антиноцицептивного действия нейропептида FMRFa на супраспинальном уровне

А.Е. Хомутов, К.А. Пурсанов, О.В. Лушникова, З.В. Перепелюк

ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»,
Нижегород

Контактная информация: д.б.н. Хомутов Александр Евгеньевич, kfg@bio.unn.ru

В опытах на крысах с использованием теста «горячей пластины» («hot plate») и регистрацией латентного периода реакции облизывания лапок установлено потенцирующее действие гепарина на антиноцицептивный эффект нейропептида FMRFa. Протамина сульфат, Налоксон и Обзидан снижали антиноцицептивный эффект FMRFa. Гепарин блокировал антианальгетическое действие Протамина сульфата, Налоксона и Обзидана.

Ключевые слова: нейропептид FMRFa, гепарин, Протамина сульфат, Налоксон, Обзидан.

Введение

Нейропептид FMRFa отнесен к семейству опиоидных пептидов группы параопиоидов, в которую входят также около двух десятков представителей. Регуляторные пептиды семейства FMRFамида активно исследуются уже более трёх десятилетий, однако данные относительно механизма их действия у млекопитающих весьма противоречивы [18]. Некоторые авторы приписывают пептидам этого семейства способность активировать симпатическую нервную систему, также было показано, что симпатомиметические эффекты FMRFa при системном введении обусловлены его способностью взаимодействовать с периферическими α - и β -адренорецепторами [12]. С другой стороны, FMRFамиды способны взаимодействовать с опиатными рецепторами, причем их действие зависит от уров-

ня, на котором рассматривается система. Так, на простых тест-системах (активность ферментов) у них проявляются антагонистические свойства, на более сложных тест-системах FMRFамиды могут вести себя как агонисты или антагонисты, или же эффект отсутствует [7]. В мозге и гипофизе крыс обнаружено широкое представительство FMRF-иммунореактивных нейронов, которые, возможно, образуют новую, относительно независимую пептидергическую систему. Из литературы [2] известно, что FMRFa-подобные пептиды могут образовываться путем ограниченного протеолиза из некоторых опиоидных пептидов: YGGFMRF-NH₂, локализованного преимущественно в надпочечниках, и геморфин-подобных пептидов LVVP-WTQRF и VVVVPWTQRF, выделенных из гомогенатов головного мозга и являющихся фрагментами 31-40 и 32-40

β -цепи гемоглобина [3]. Таким образом, данные факты указывают на существование связи между эндогенной опиоидной и симпато-адреналовой системой: фрагменты параопиоидов, образующиеся в результате их ограниченного протеолиза, обладают способностью взаимодействовать с адренорецепторами, и, возможно, служат в качестве функциональных антагонистов своих предшественников (эндоопиоидов) [7].

Существенную роль в проявлении эффектов FMRFa, как и многих других веществ, играет количественный эквивалент применяемого пептида, при внутрибрюшинном введении крысам в дозе 5 мг/кг FMRFa оказывает действие, сходное с введением адреналина в той же дозе, т.е. угнетение двигательной активности, саливация, пилоэрекция, гипергликемия, отек легких. Блокада альфа-адренорецепторов дигидроэрготамином (2 мг/кг) отменяла данные патологические изменения; с другой стороны, введение пептида в дозе 0,1 мг/кг, как и применение адреналина в той же дозе, не приводило к существенным морфологическим отличиям от контроля [8].

В литературе имеются данные об анальгетической активности многих представителей семейства (NPFF, NPAF, NPSF) FMRFa-подобных пептидов. Интратекальные инъекции FMRFa и NPFF способны вызвать гиперанальгезию у крыс, а также пролонгируют морфиновую анальгезию [13, 16]. Показана их роль в регуляции боли на спинальном уровне на модели воспалительных болей, вызванных каррагеновыми инъекциями, а также при термической болевой стимуляции, при этом значительно возрастает уровень mRNA в спинном

мозге, кодирующей NPFF прекурсор [14].

Как известно, полифункциональный мукополисахарид гепарин широко представлен в организме млекопитающих и характеризуется уникальной способностью к взаимодействию с эндогенными белками и полипептидами, осуществляющими регуляторные функции [4-6]. В связи с этим, оценивать активность в организме того или иного пептида без изучения влияния на этот процесс гепарина является, на наш взгляд, неконструктивным.

Целью работы явилось изучение процессов пролонгирования гепарином антиноцицептивного действия нейропептида FMRFa на супраспинальном уровне, а также влияния на этот процесс Протамина сульфата, Налоксона и Обзидана.

Материалы и методы

Для исследования были использованы 90 половозрелых беспородных крыс-самцов массой 200 ± 10 г, содержащихся на общем рационе вивария. Животные были получены из питомника лабораторных животных «Рапполово» РАН. Исследования осуществляли в соответствии с правилами проведения работ и использования экспериментальных животных (Приложение к Приказу МЗ СССР № 775 от 12.08.1977 г.), «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.03.1986 г. и ФЗ РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г. Животные содержались в одинаковых стандартных условиях в пластиковых клетках с автопоилками, получали полноценный комбикорм и

очищенную водопроводную воду *ad libitum*. В качестве подстилки использовали древесные опилки из хвойных пород деревьев.

В качестве исследуемых веществ использовали следующие препараты:

1) высокомолекулярный гепарин (произв. Московского эндокринного завода), содержащий в 1 мл раствора 5000 ME (1ME=0,0077 мг);

2) FMRFa, синтезированный в ГНЦ РАМН;

3) Протамина сульфат (произв. Московского эндокринного завода), содержащий 10 мг сухого вещества в 1 мл раствора;

4) Налоксон (произв. Варшавского фармацевтического завода «Польфа»), содержащий 0,4 мг действующего вещества в 1 мл раствора;

5) Обзидан (произв. «ISIS PHARMA GmbH»), содержащий 1 мг пропранолола в 1 мл раствора.

Исследуемые вещества вводили внутрибрюшинно в объёме 1 мл в определённой последовательности, предусмотренной условиями опыта. Временной интервал между введениями был постоянным и составлял 10 мин.

При исследовании антиноцицептивного действия FMRFa использовали тест «горячей пластины («hot plate»), который даёт общее представление о действии веществ на супраспинальном уровне [9]. Животное помещали на пластину, нагретую до 57-58°C, температура поверхности пластины регулировалась термостатом. По секундомеру засекалось время от момента помещения животного на пластину до момента первого облизывания лап (задних), что и составляло латентный период реакции облизывания лап (ЛП РОЛ). Макси-

мальное время нахождения животного на пластине – 25 сек.

Анальгетический эффект оценивался в процентах от значений контрольной группы, принимаемой за 100%. Для оценки использовались медианы. Это связано с тем, что средняя арифметическая очень подвержена влиянию крайних членов вариационного ряда, наименее характерных для данной совокупности, что в случае использования нами небольших выборок (6-10 особей в группе) недопустимо. Кроме того, определённые ограничения продолжительности измерения вообще исключили в ряде опытов возможность использования какой-либо другой обобщающей характеристики. Поэтому в наших опытах использование медианы являлось наиболее оправданным.

Достоверность различий между группами оценивалась с использованием непараметрического критерия Уилкоксона-Манна-Уитни для независимых совокупностей. Для множественных сравнений применяли критерий Данна [1].

Результаты и их обсуждение

Внутрибрюшинное введение FMRFa в дозе 0,1 мг/кг сопровождается увеличением времени ЛП РОЛ, что говорит об антиноцицептивном действии параопиоида (табл.). Анальгетический эффект FMRFa потенцируется на фоне действия гепарина в дозе 500 ME/кг, что выражается в продолжительности эффекта. Так, если при введении FMRFa максимальный эффект регистрируется только в течение первых двух минут от момента инъекции, то на фоне действия гепарина продолжительность анальгетического эффекта увеличивается до 60 мин.

Влияние FMRFa, гепарина и Протамина сульфата на ЛП РОЛ (%) у крыс

Условия опыта	Время после введения веществ, мин				
	20	40	60	90	150
Контроль (физиол. раствор)	100	100	100	100	100
FMRFa (0,1 мг/кг)	223,4*	105,4	130,8*	118,4	126,0
Гепарин (500 МЕ/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг)	188,3**	204,3**	167,0**	98,0	145,1*
Протамина сульфат (10 мг/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг)	84,3 ⁺	92,6 ⁺	72,1**	80,5 ⁺	97,2 ⁺
Протамина сульфат (10 мг/кг) → гепарин (500 МЕ/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг)	145,5**	150,2**	117,6	158,2**	102,4

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем;
 + – $p < 0,05$ по сравнению с FMRFa.

Блокада эндогенного гепарина Протамина сульфатом с последующим введением FMRFa характеризуется реверсией анальгетического эффекта, а ЛП РОЛ в течение всего времени наблюдения достоверно ниже показателей группы крыс, которым вводили FMRFa. Интересные данные были получены при последовательном введении Протамина сульфата, гепарина и FMRFa. В этом случае величина ЛП РОЛ была ниже показателей FMRFa, но выше контрольных величин (табл.).

Предварительное введение Налоксона, являющегося антагонистом опиатных рецепторов, в дозе 1,0 мг/кг, с последующей внутрибрюшинной инъекцией FMRFa характеризовалось блокадой антиноцицептивного действия FMRFa, причём в течение 60 мин ЛП РОЛ резко отличался от аналогичного результата при введении только FMRFa. Введение исследуемых веществ по схеме «Налоксон → гепарин → FMRFa»

сопровождалось значительным снижением ЛП РОЛ в течение 40 мин от момента введения относительно группы с введением только FMRFa и увеличением ЛП РОЛ в течение всего времени наблюдения при введении по схеме «Налоксон → FMRFa» (рис. 1).

Обзидан, являющийся неселективным β -адреноблокатором, снижает антиноцицептивное действие FMRFa, а при введении по схеме «Обзидан → гепарин → FMRFa» анальгетический эффект FMRFa в значительной степени увеличивается по сравнению с результатом работы по схеме «Обзидан → FMRFa» (рис. 2).

Таким образом, данные фармакологического анализа показывают, что антиноцицептивное действие FMRFa связано с активацией опиоидэргической и адренергической систем. На фоне блокаторов гепарин способствует проявлению анальгетической активности FMRF-пептида.

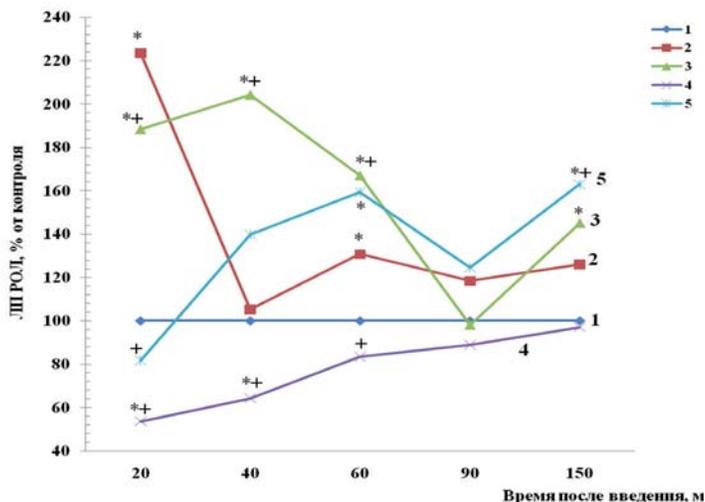


Рис. 1. Влияние FMRFa, гепарина и Налоксона на ЛП РОЛ (%) у крыс.

1 – Контроль (физиол. р-р);

2 – FMRFa (0,1 мг/кг);

3 – Гепарин (500 МЕ/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг);

4 – Налоксон (1 мг/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг);

5 – Налоксон (1 мг/кг) → гепарин (500 МЕ/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг).

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем;

+ – $p \leq 0,05$ по сравнению с FMRFa.

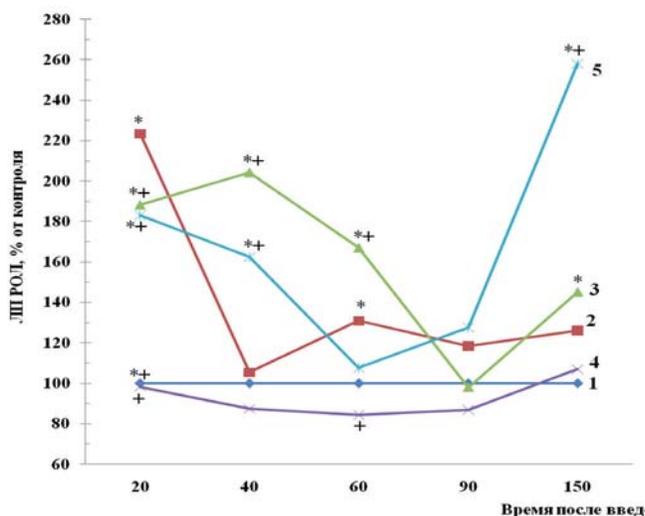


Рис. 2. Влияние FMRFa, гепарина и Обзидана на ЛП РОЛ (%) у крыс.

1 – Контроль (физиол. р-р);

2 – FMRFa (0,1 мг/кг);

3 – Гепарин (500 МЕ/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг);

4 – Обзидан (1 мг/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг);

5 – Обзидан (1 мг/кг) → гепарин (500 МЕ/кг) → FMRFa (0,1 мг/кг).

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем;

+ – $p \leq 0,05$ по сравнению с FMRFa.

Анализируя возможные механизмы потенцирующего действия гепарина на антиноцицептивный эффект FMRFa, особого внимания заслуживают взаимоотношения гепарина с медиаторными системами, в т.ч. и с рецепторами. Так, оказалось, что гепарин влияет на десенситизацию δ -опиоидных рецепторов, подавляет неконкурентным способом связывание с сигма-рецептором опиоидов $3H^+$ -N-аллилнорметазоцина в микросомальной фракции мозга и мембран печени крыс [20]. Гепарин уменьшает фосфорилирование дельта-опиоидных рецепторов, соединенных с G-белком (GPCR), и, как следствие, снижает гипосенсибилизацию, вызванную специфическим опиоидным агонистом эторфином и D-Ala₂-D-Leu₅-энкефалином (DADLE) [15, 17]. Гепарин блокирует выход Ca²⁺ [17, 19, 21], также как ингибитор инозитол 1,4,5-трисфосфата, гепарин реверсирует развитие морфиновой толерантности [19]. Процесс десенситизации, т.е. уменьшение чувствительности (гипосенситизация) и сокращение числа рецепторов на клеточной поверхности (интернализация) показаны не только для опиоидных рецепторов, но и для других, также принадлежащих к GPCR (в частности, β 2-адренергических и α 2-адренергических), для A1-аденозиновых рецепторов и m2-мускариновых рецепторов [10, 11]. Недавно были изучены рецепторы FMRFa-пептидов человека, они также относятся к классу GPCR [16]. Роль гепарина как неспецифического блокатора протеинкиназы доказана для опиоидных рецепторов и для β -адренергических рецепторов. Возможно, взаимодействуя с данным видом рецепторов, гепарин уменьшает

процесс десенситизации, вызванный воздействием синтетических агонистов, тем самым повышает чувствительность рецепторов к анальгетикам и, соответственно, при прочих равных условиях пролонгирует анальгетический эффект.

Выводы

В реализации анальгетического эффекта нейропептида FMRFa (в дозе 0,1 мг/кг) принимают участие опиоидная и β -адренергическая системы. На фоне действия гепарина (500 МЕ/кг) антиноцицептивное действие параопиоида усиливается. Протамина сульфат, Налоксон и Обзидан снижают анальгетическое действие FMRFa. Гепарин, включённый в схему последовательных введений, снижает антианальгетическое действие Протамина сульфата, Налоксона и Обзидана.

Список литературы

1. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. - М.: Практика. 1999. 459 с.
2. *Гомазков О.А.* Современные тенденции в исследовании физиологически активных пептидов // Успехи совр. биологии. 1996. Т. 116. № 1. С. 60-68.
3. *Иванов В.Т., Карелин А.А., Михалёва И.И.* Выделение, структура и свойства новых эндогенных пептидов // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. № 10-11. С. 1271-1311.
4. *Каркищенко Н.Н.* Психонитропизм лекарственных средств. - М.: Медицина. 1993. 208 с.
5. *Кондашевская М.В.* Тучные клетки и гепарин – ключевые звенья в адаптивных и патологических процессах // Вестник РАМН. 2010. № 6. С. 49-54.
6. *Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Пасторова В.Е.* Противосвёртывающие эффекты комплексного соединения высокомолекулярного гепарина с аргинином // Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. 2009. Т. 147. № 3. С. 300-303.

7. **Парин С.Б., Зимин Ю.В., Крылов В.Н.** Применение пептидов опиоидного ряда в экспериментальной терапии шока // Антигипоксанты и антипротекторы / Мат-лы конф. - СПб. 1994. Вып. 4. С. 272-273.
8. **Пономаренко А.А., Тияков Р.Л.** Эдемогенное и гипергликемическое действие FMRF-амида // Сб. работ мол. ученых биол. ф-та ННГУ. – Н. Новгород. 1998. С. 113-114.
9. **Северьянова Л.А., Бобынцев И.И., Кирьянова Н.А., Долгинцев М.Е.** Эффекты L-аргинина на различные виды болевой чувствительности // Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. 2006. Т. 141. № 5. С. 503-506.
10. **Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И.** Рецепторы физиологически активных веществ. - Волгоград: Изд-во «Семь ветров». 1999. 640 с.
11. **Судаков С.К., Тригуб М.М.** Гипотеза реципрокного взаимодействия центрального и периферического звена эндогенной опиоидной системы // Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. 2008. Т. 146. № 12. С. 604-607.
12. **Тияков Р.Л., Парин С.Б., Крылов В.Н.** Реанимирующее действие FMRFa-подобных пептидов при клинической смерти у крыс // Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. 1996. № 4. С. 417-418.
13. **Gouarderes C., Sutak M., Zajac J.M.** Antinociceptive effects of intrathecally administered F8Famide and FMRFamide in the rat // Eur. J. Pharmacol. 1993. Vol. 237. P. 73-81.
14. **Ferdinand S.** Gene for pain modulatory Neuropeptide NPFF: induction in spinal cord by noxious stimuli // Mol. pharm. 1999. Vol. 55. № 4. P. 804-811.
15. **Hasbi A., Polastron J., Allouche S.** Desensitization of the delta-opioid receptor correlates with its phosphorylation in SK-N-BE cells: involvement of a G protein-coupled receptor kinase // J. Neurochem. 1998. Vol. 70. N 5. P. 2129-2138.
16. **Kontinent V., Kalso E.** Differential modulation of $\alpha 2$ -adrenergic and μ -opioid spinal antinociception by neuropeptide FF // Peptides. 1995. Vol. 16. P. 973-977.
17. **Morikawa H., Fukuda K., Mima H.** Desensitization and resensitization of delta-opioid receptor-mediated Ca^{2+} channel inhibition in NG108-15 cells // Br. J. Pharmacol. 1998. Vol. 123. N 6. P. 1111-1118.
18. **Raffa R.B.** The action of FMRFamide and related peptides on mammals // Peptides. 1998. V. 9. P. 915-922.
19. **Smith A., Surviladze Z., Gaudet E.** A p110 β and p110 δ phosphatidylinositol 3-kinases up-regulate Fc ϵ RI-activated Ca^{2+} influx by enhancing inositol 1,4,5-trisphosphate production // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. № 20. P. 17213-17220.
20. **Tsao L.I., Su T.P.** IP3 receptor antagonist heparin uncompetitively inhibits [3H](+)-SKF-10047 binding to sigma receptors // Eur. J. Pharmacol. 1996. Vol. 311. N 1. P. 28-36.
21. **Yoon S.H., Lo T.M., Loh H.Y.H.** Delta-opioid-induced liberation of Gbettagamma mobilizes Ca^{2+} stores in NG108-15 cells // Mol. Pharmacol. 1999. Vol. 56. № 5. P. 902-908.

Potential of antinociceptive effect of neuropeptide FMRFa by heparin on supraspinal level

A.E. Khomutov, K.A. Pursanov, O.V. Lushnikova, Z.V. Perepelyuk

In experiments on rats using a test “hot plate” and the registration of the latent period of the reaction licking feet potentiating effect of heparin on the antinociceptive FMRFa effects was established. Protamine sulphate, Naloxone and Obzidan reduced antinociceptive FMRFa effects. The heparin blocked the anti-analgetic action of Protamine sulfate, Naloxone and Obzidan.

Key words: neuropeptide FMRFa, heparin, Protamine sulphate, Naloxone, Obzidan.