

ЕФЕКТ НА НАЛТРЕКСОН ВЪРХУ ОБРАЗУВАНЕ НА ПРОВЪЗПАЛИТЕЛНИ ЦИТОКИНИ И АЗОТЕН ОКСИД ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПЛЪХОВЕ С ХРОНИЧНО АЛКОХОЛНО ТРЕТИРАНЕ

М. Варадинова и Н. Бояджиева

Катедра по фармакология и токсикология,

Медицински факултет, Медицински университет – София

Резюме. Налтрексон е фармакологично средство/лекарство, разработено и внедрено като антагонист на опиоидните рецептори. През последните години е документирано приложението на налтрексон при лечение на хроничен алкохолизъм. Целта на настоящото експериментално изследване е да се проучи влиянието на налтрексон върху плазмени концентрации на два провъзпалителни цитокина (туморен некрозен фактор алфа – TNF- α , и интерлевкин-1 бета – IL-1 β) и образуването на азотен оксид при бели мъжки плъхове, продължително ежедневно третирани с алкохол. Резултатите демонстрират, че алкохолът активира както продукцията на TNF- α и IL-1 β , така и на азотен оксид. Приложението на налтрексон (0.1 mg/kg, интраперитонеално, в продължение на 15 дни) е свързано с инхибиране ефектите на алкохола върху цитокини и азотен оксид. При провеждане на тест с липополизахарид (LPS) (1000 mg/kg) беше документиран инхибиращ ефект на налтрексон върху плазмени концентрации на TNF- α , IL-1 β и нитрати/нитрити (азотен оксид). Взети заедно, резултатите дават основание да се направи заключение, че налтрексон повлиява механизмите на хроничен алкохолизъм както чрез рецепторно действие върху опиоидни рецептори, така и чрез влияние върху образуване на провъзпалителни цитокини и азотен оксид (оксидативен стрес).

Ключови думи: *налтрексон, алкохол, плъхове, TNF-alpha, IL-1 beta, нитрати/нитрити (азотен оксид), LPS*

EFFECT OF NALTREXONE ON TWO PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES AND NITRIC OXIDE IN MALE RATS WITH CHRONIC ALCOHOL INTAKE

M. Varadinova and N. Boyadjieva

Department of pharmacology and toxicology, Medical Faculty,

Medical University – Sofia

Summary. Naltrexone is a well known antagonist of opioid receptors. It has been used in the chronic alcoholism treatment. The aim of the study is to investigate the effects of naltrexone on the production of the two pro-inflammatory cytokines (TNF alpha and IL-1 beta) and on the nitric oxide in

male rats with chronic application of alcohol for a period of 30 days. Naltrexone (0.1 mg/kg, i.p. and for a period of 15 days) inhibited the blood levels of TNF alpha and IL-1 beta in alcohol-treated rats as well as the production of nitric oxide. A test with LPS (1000 mg/kg) was performed. Naltrexone inhibited the LPS-induced blood levels of TNF alpha and IL-1 beta in alcohol-treated rats. Moreover, LPS induced the elevation of nitric oxide and naltrexone demonstrated the capacity to decrease it. Taken together, the data demonstrate new effects of naltrexone in experimental alcoholism. The results suggest that naltrexone may affect alcohol intake by both, opioid receptors and effects on cytokines and oxidative stress.

Key words: *naltrexone, alcohol, rats, TNF alpha, IL-1 beta, nitrate/nitrite (nitric oxide), LPS*

Въведение

Налтрексон е антагонист на опиоидните рецептори и се прилага в клиниките за лечение на алкохолизъм (Braun, 2009). Наши предишни проучвания демонстрират, че налтрексон потиска консумацията на алкохол само при продължително приложение и това се дължи на ефекта му върху делта-опиоидните рецептори (N. Boyadjieva и D. Sarkar, 2010). Ние доказахме също, че след продължително приложение на налтрексон рецепторната му активност се променя от антагонист към агонист. Известно е, че при хронична употреба на алкохол се увеличава рискът от възпаления и от ракови заболявания (Laso et al., 1997). Има данни, че при хронична употреба на алкохол се увеличава концентрацията на свободни радикали в организма (Bogdan et al., 2000). В настоящото проучване си поставяме за цел да изследваме ефектите на налтрексон върху 2 провъзпалителни цитокина (туморен некрозен фактор-алфа и интерлевкин-1-бета) и образуването на азотен оксид в кръв на бели мъжки плъхове, хронично третирани с алкохол.

Материал и методи

1. Опитни животни и експериментален протокол. В проучването са използвани бели мъжки плъхове на възраст 3-4 месеца и с тегло 220-260 g, линия Vistar. Животните бяха разделени в следните групи: 1-ва група: контролна – 20 животни; 2-ра група: опитна – 20 животни, ежедневно третирани в продължение на 30 дни орално, с помощта на сонда с 20% разтвор на алкохол в обем 1 ml/100 g. Във всяка от посочените групи животните бяха разде-

лени на 4 подгрупи, съответно: 1 – чиста контрола; 2 – третирана с налтрексон 0.1 mg/kg интраперитонеално еднократно дневно в продължение на 15 дни; 3-та група – третирана с LPS 1000 mg/kg тегло интраперитонеално еднократно в последния ден на експериментите, и 4-та група – третирана с налтрексон 0.1 mg/kg в продължение на 15 дни и еднократно с LPS 1000 mg/kg. Всички животни имаха свободен достъп до храна и вода и бяха отглеждани в условия на вивариум, съгласно съвременните изисквания и законодателни норми.

2. Определяне на нитрати в кръв. Нивата на нитрати/нитрити в плазма се определяха по метода на Green et al. (1982). Нитрати и нитрити се образуват по неензимен начин, когато азотният оксид си взаимодейства с кислород. Определянето на тоталните концентрации на нитрити е на база превръщането на нитрати в нитрити чрез използване на нитрат-редуктаза в присъствие на редуциран никотинамид-аденин-динуклеотид фосфат и флавинаденин динуклеотид и последващо добавяне на Griess реагент (Trasey et al., 1995). По протокол: 6 μ l от плазма се миксират с 44 μ l от dH₂O, 20 μ l от 0.31 M phosphate buffer (pH 7.5) и 0 μ l от 0.86 mM редуциран nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, 10 μ l от 0.11 mM flavinadenine dinucleotide (Sigma) и 10 μ l от 1.0 U/ml nitrate reductase се миксират в индивидуално гнездо (96-гнездова лабораторна плака). Пробите се инкубират за 1.5 часа на стайна температура. Добавят се 200 μ l от Griess reagent, който съдържа 1:1 (v/v) разтвор от 1% sulfanilamide в 5.0% phosphoric acid и 0.1%N-(1-naphthyl)ethyl-enedamine dihydrochloride в дестилирана вода. Пробите се инкубират за 10 min на стайна температура и се измерват на Biotec plate reader на 550 nm абсорбция. Концентрацията на нитрати се определя в микромолове (μ M) на базата на стандарт.

3. Определяне на TNF- α и IL-1 β . И двата цитокина се определяха в кръв/плазма чрез ELISA. Използваха се ELISA китове, специфични за плъх, от R&D Systems, като се спазваха протоколът и указанията на производителя. Концентрациите на двата цитокина се определяха в picogram/ml спрямо стандарт.

4. Статистическа обработка. Резултатите се представят като mean \pm standard error. Статистическата обработка е извършена с Anova и Bonferroni, с t-test. Стойности от P < 0.05 се приемаха за статистически значими.

Резултати

Хроничното приложение на алкохол увеличава концентрациите на TNF- α и IL-1 β в кръв на бели мъжки плъхове. Налтрексон намалява алкохол-индуцираното увеличение на двата провъзпалителни цитокина

След 30-дневно третиране с алкохол на бели мъжки половозрели плъхове бяха установени увеличени концентрации на TNF- α и IL-1 β . Налтрексон, прилаган през последните 2 седмици на третиране с алкохол, намалява концентрациите и на двата цитокина в кръвта (табл. 1). Налтрексон не повлиява статистически значимо концентрацията на проучваните цитокини при контролните животни (нетретирани с алкохол).

Таблица 1. Ефект на алкохол със или без налтрексон върху плазмени концентрации на TNF- α и IL-1 β при мъжки плъхове

Група и третиране	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)
1. Контролна група	47.21 \pm 2.46	89.34 \pm 8.7
2. Контролна + налтрексон	49.18 \pm 3.96	80.01 \pm 1.16
3. Алкохол	62.78 \pm 2.74*	154.62 \pm 11.87 ^{aa}
4. Алкохол + налтрексон	51.12 \pm 3.42**	98.23 \pm 6.28 ^a

*P < 0.05 в сравнение с контролна група #1

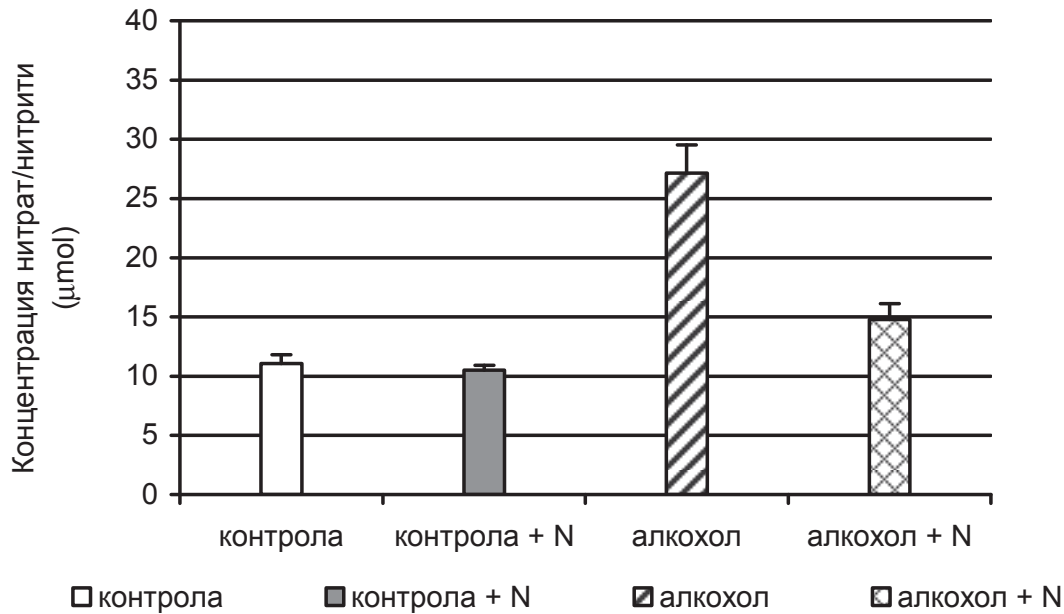
**P < 0.05 в сравнение с контролна група #1 и с група с алкохол #3 (TNF- α)

^aP < 0.01 в сравнение с група # 3 с алкохол

^{aa}P < 0.01 в сравнение с контролна група #1 (IL-1 β)

Налтрексон намалява активираната от алкохол продукция на азотен оксид при мъжки бели половозрели плъхове

Азотният оксид е приет като критерий/параметър за определяне на свободни радикали (оксидативен стрес) при експериментални животни. 30-дневното третиране на мъжки плъхове с алкохол предизвиква увеличена продукция на азотен оксид, измерена в плазма чрез метода на Griess (концентрация на нитрати/нитрити). Интраперитонеалното ежедневно приложение на налтрексон в дози от 0.1 mg/kg през последните 2 седмици на третиране с алкохол понижава образуването на азотен оксид в кръвта (фиг. 1). Няма статистически значимо влияние на налтрексон върху продукция на азотен оксид при контролните животни.



Фиг. 1. Влияние на налтрексон (N) върху продукцията на азотен оксид на плъхове, третиран с алкохол

Налтрексон намалява активираната продукция на цитокини чрез LPS при мъжки плъхове с хронично третиране с алкохол

Липополизахарид (LPS) е фармакологично средство, което се използва експериментално за създаване модел на активирано, остро или хронично възпаление. Наши публикувани резултати показват, че LPS активира както продукцията и секрецията на провъзпалителни цитокини, така и образуването на свободни радикали. Това определи използването на този метод за проучване влиянието на налтрексон върху ефектите на алкохол при експериментално активирани възпалителни механизми. Резултатите са представени на табл. 2. LPS активира продукцията на 2 провъзпалителни цитокина (TNF- α и IL-1 β), измерени в кръв на животни със или без алкохолно третиране. Многократното приложение на налтрексон статистически значимо намалява концентрациите на 2-та провъзпалителни цитокина. Инхибиращият ефект на налтрексон е по-значим при животните, хронично третиран с алкохол.

Таблица 2. Ефект на налтрексон върху кръвни концентрации на TNF- α и IL-1 β при контролни плъхове с LPS и при хронично третирани с алкохол с LPS

Група и третиране	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)
1. Контрола + LPS	82.16 \pm 7.1	260.12 \pm 24.8
2. Контрола + налтрексон + LPS	68.17 \pm 3.19**	198.21 \pm 10.34
3. Алкохол + LPS	94.23 \pm 4.58	289.34 \pm 9.6
4. Алкохол + налтрексон + LPS	71.62 \pm 4.92*	184.52 \pm 12.6 ^a

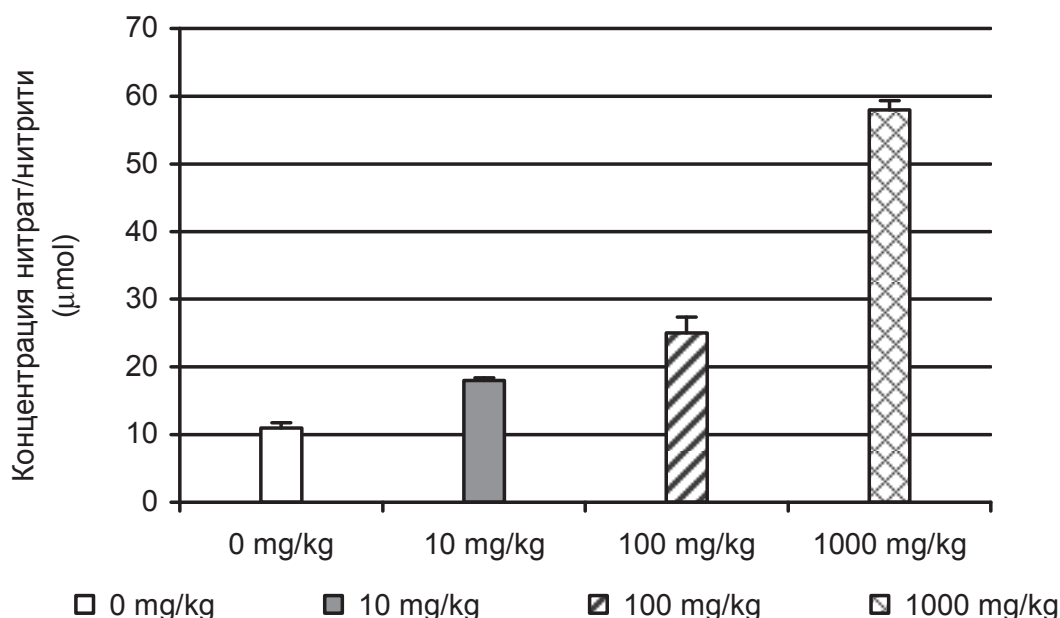
*P < 0.05 в сравнение с контролна група #1

** P < 0.05 в сравнение с контролна група #1 и с група с алкохол #3 (TNF alpha)

^aP < 0.01 в сравнение с група #3 с алкохол (IL-1 beta)

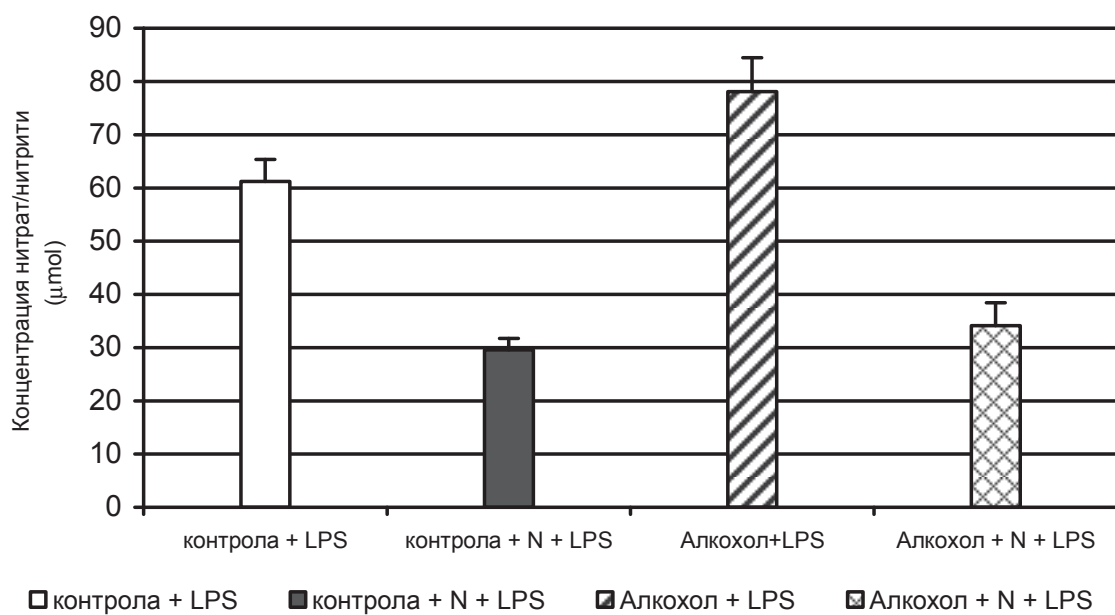
Налтрексон намалява образуването на азотен оксид при тест с LPS при плъхове, третирани продължително с алкохол.

На фиг. 2 са представени резултати от теста с LPS върху мъжки плъхове при изучаване на доза/ефект зависимост за продукцията на азотен оксид. Бяха използвани следните дози LPS: 10, 100 и 1000 mg/kg. След интраперитонеално инжектиране с LPS животните бяха декапитирани и беше взета кръв за определяне на нитрати/нитрити. На базата на представените на фиг. 2 резултати, опитите бяха продължени с тест LPS от 1000 mg/kg – приложен на контролни и опитни с алкохол животни, съответно със или без налтрексон.



Фиг. 2. Доза-ефект на LPS върху концентрацията на нитрат/нитрити (µmol) в кръв на мъжки плъхове

На фиг. 3 са представени резултатите от изследванията върху продукцията на азотен оксид в кръв на плъхове, които са третирани в продължение на 30 дни с алкохол и с проведен тест с LPS. Алкохолът потенцира LPS-активираната продукция на азотен оксид. Приложението на налтрексон в продължение на 15 дни преди провеждане на LPS тест предизвиква намалена концентрация на нитрати/нитрити както в кръв на контролни животни, така и в кръв на животни, които продължително са третирани с алкохол. Налтрексон инхибира продукцията на азотен оксид, която е стимулирана при тест с LPS.



Фиг. 3. Ефект на налтрексон (N) върху LPS-активирана продукция на азотен оксид в кръв на мъжки плъхове – контролни и опитни, третирани 30 дни с алкохол

Обсъждане

Резултатите от представените експериментални изследвания документират, че налтрексон намалява ефектите от продължителното прилагане на алкохол върху два провъзпалителни цитокина, TNF- α и IL-1 β , в кръв на бели мъжки плъхове. Резултатите показват също, че налтрексон инхибира продукцията на азотен оксид, която е активирана след продължително въвеждане на алкохол при плъхове. В допълнение, налтрексон има способност-

та да намали продукцията на азотен оксид и на двата проучвани цитокина при провеждане на тест с LPS.

Налтрексон е разработен и внедрен като фармакологично средство и лекарство – антагонист на опиоидните рецептори. През последните години се прилага в различни клиники за лечение на алкохолизъм. Наши предишни изследвания документират, че налтрексон намалява количеството алкохол, което плъховете поемат при свободен достъп до алкохолни разтвори (Boyadjieva et al., 2006). Ние за първи път публикувахме убедителни данни, че налтрексон инхибира вредните ефекти на алкохол върху NK cells (имунни клетки – естествени убийци) (Boyadjieva и др., 2004). Наши изследвания също демонстрират, че хроничното третиране на животни с алкохол активира продукцията на цитокини от изолирани лимфоцити на слезка на експериментални животни и в клетъчни култури от лимфоцити (Boyadjieva и Sarkar, 2010). Резултатите от настоящите изследвания допълват посочените факти за ефекта на алкохол и налтрексон. Способността на налтрексон да намали концентрацията в кръвта на два провъзпалителни цитокина при хронично алкохолно третиране е нова и важна характеристика за това фармакологично средство. Установяването на увеличени провъзпалителни цитокини в кръвта корелира с данните от литературата, че при хроничен алкохолизъм е завишен рискът от възпалителни заболявания (Laso et al., 1997).

Новост в настоящото проучване е изследване влиянието на налтрексон върху продукцията на азотен оксид. Хроничното въвеждане на алкохол предизвиква повишено образуване на азотен оксид в кръв на експериментални мъжки плъхове. Многократното приложение на налтрексон в периода на третиране с алкохол потиска ефектите на алкохола върху образуване на азотен оксид. Прието е измерването на нитрати/нитрити в кръвта да е критерий/показател за оксидативен стрес и за образуване на азотен оксид. Резултатите демонстрират увеличаването на оксидативния стрес под влияние на алкохол и способността на налтрексон да потисне оксидативния стрес. Посочените резултати могат да обяснят частично механизма, чрез който налтрексон намалява нуждата от употреба на алкохол при лечение на хора с алкохолна зависимост. Известно е, че при стресови въздействия, включително и при оксидативен стрес, се активира употребата на алкохол. Възможността на налтрексон да инхибира образуването на

свободни радикали допълва механизмите на действие на лекарството при алкохолизъм. Водещ е рецепторният му механизъм на действие, за който при наши проучвания доказахме, че след продължително приложение налтрексон има опиоидна подобна активност върху делта-рецептори, регулиращи имунни клетки (N. I. Boyadjieva и D. K. Sarkar, 2010).

Нашите изследвания корелират с данните на Фроелиш и сътр., които доказват, че налтрексон в комбинация с празозин след еднократно орално приложение намалява употребата на алкохол при пълхове, които са с алкохолна преференция (alcohol-preferring "Pirets"). Доказателствата, че хронично прилагане на налтрексон различно повлиява механизмите на участие на делта-опиоидни рецептори в ноцицепцията (Kest et al., 1998), също подкрепят нашата хипотеза за опиоиден механизъм на влияние върху имунните клетки.

M. Bertolucci и сътр. (1996) документират, че опиоидите регулират централно секрецията на цитокин интерлевкин-6, и това поставя началото на значими изследвания върху опиоидните лекарства и имунната система. При опити *in vitro* е установено, че енкефалини повлияват експресията на цитокини (Piva et al., 2005). Имуносупресия под влияние на алкохол е отчетена преди 20 години (Pruett et al., 1994). Мю-опиоидните рецептори играят роля в механизми на апоптоза на имунни клетки (Wang, 2002). Ebrahimpour и сътр. (2013) демонстрират, че налтрексон подобрява имунните отговори при мишки с експериментален тумор. Взети заедно, всички тези факти от литературния анализ подкрепят мнението, че опиоидите регулират секреция на цитокини, която се променя при хроничен алкохолизъм. Допускаме, че налтрексон повлиява механизми на алкохолизъм чрез влияние върху цитокини и оксидативен стрес.

Благодарност: Част от проучванията са извършени в лабораторията на проф. Дипак Саркар, САЩ, Ню Джърси. С благодарност за неговото съдействие!

Библиография

1. Arjona, A. et al. Fetal ethanol exposure disrupts the daily rhythms of splenic granzyme B, IFN-gamma, and NK cell cytotoxicity in adulthood. – *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **30**, 2006, № 6, 1039-1044.
2. Arjona, A., N. Boyadjieva et D. K. Sarkar. Circadian rhythms of granzyme B, perforin, IFN-gamma, and NK cell cytolytic activity in the spleen: effects of chronic ethanol. – *J. Immunol.*, **172**, 2004, № 5, 2811-2817.
3. Bertolucci, M., C. Perego et M. G. De Simoni. Central opiate modulation of peripheral IL-6 in rats. – *Neuroreport*, **7**, 1996, № 6, 1181-1184.
4. Bogdan, C., M. Rollinghoff et A. Diefenbach. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. – *Curr. Opin. Immunol.*, **12**, 2000, 64-76.
5. Boyadjieva, N., J. P. Advis et D. K. Sarkar. Role of beta-endorphin, corticotropin-releasing hormone, and autonomic nervous system in mediation of the effect of chronic ethanol on natural killer cell cytolytic activity. – *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **30**, 2006, № 10, 1761-1767.
6. Boyadjieva, N. I. et al. Opioid antagonist naltrexone disrupts feedback interaction between mu and delta opioid receptors in splenocytes to prevent alcohol inhibition of NK cell function. – *J. Immunol.*, **173**, 2004, № 1, 42-49.
7. Boyadjieva, N. I. et D. K. Sarkar. Opioid-like activity of naltrexone on natural killer cell cytolytic activity and cytokine production in splenocytes: effects of alcohol. – *J. Interferon Cytokine Res.*, **30**, 2010, № 1, 15-22.
8. Brown, N. et J. Panksepp. Low-dose naltrexone for disease prevention and quality of life. – *Med. Hypotheses*, **72**, 2009, 333-337.
9. Ebrahimpour, S. et al. Synergistic effect of aged garlic extract and naltrexone on improving immune responses to experimentally induced fibrosarcoma tumor in BALB/c mice. – *Pharmacognosy Res.*, **5**, 2013, № 3, 189-194.
10. Eisenstein, T. K. et al. Macrophage nitric oxide mediates immunosuppression in infectious inflammation. – *Immunobiology*, **191**, 1994, 493-502.
11. Franchi, S. et al. Mu opioid receptor activation modulates Toll like receptor 4 in murine macrophages. – *Brain. Behav. Immun.*, **26**, 2012, № 3, 480-488.
12. Green, L. C. et al. Analysis of nitrate nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. – *Anal. Biochem.*, **126**, 1982, 131-136.
13. Kest, B. et al. Chronic naltrexone differentially affects supraspinal delta-opioid receptor-mediated antinociception. – *Eur. J. Pharmacol.*, **345**, 1998, № 1, 47-53.
14. Laso, F. J. et al. Alterations in tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and interleukin-6 production by natural killer cell-enriched peripheral blood mononuclear cells in chronic alcoholism: relationship with liver disease and ethanol intake. – *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **21**, 1997, № 7, 1226-1231.
15. Liu, S. et al. Lipopolysaccharide treatment in-vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. – *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **196**, 1993, 1208-1213.

16. P i v a , M. et al. In vitro modulation of cytokine expression by enkephalin-derived peptides. – Neuroimmunomodulation, **12**, 2005, 339-347.
17. P r u e t t , S. B., Y. C. Han et W. J. Wu. A brief review of immunomodulation caused by acute administration of ethanol, involvement of neuroendocrine pathways. – Alcohol Alcohol. Suppl., **2**, 1994, 431-437.
18. W a n g , J. et al. Mu-opioid receptor mediates chronic restraint stress-induced lymphocyte apoptosis. – J. Immunol., **169**, 2002, 3630-3636.

✉ **Адрес за кореспонденция:**

Д-р Мирослава Варадинова, дм
Катедра по фармакология и токсикология
Медицински факултет
Медицински университет
ул. „Здраве“ № 2
1431 София

☎ 02/9520539;

e-mail: miria@abv.bg