

ДЕЛТА-ОПИОИДНИ РЕЦЕПТОРИ УЧАСТВАТ В МЕХАНИЗМИТЕ НА ОБЕЗБОЛЯВАНЕ ПРИ ЗАХАРЕН ДИАБЕТ: ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОУЧВАНИЯ¹

М. Варадинова, Р. Методиева и Н. Бояджиева

Катедра по фармакология и токсикология, МФ, МУ – София

DELTA OPIOID RECEPTORS PARTICIPATE IN THE MECHANISMS OF ANTINOCICEPTION IN DIABETES: EXPERIMENTAL STUDIES

M. Varadinova, R. Metodieva and N. Boyadjieva

Department of Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty, Medical University – Sofia

Резюме. Според съвременни експериментални данни делта-опиоидните рецептори имат роля в модифициране на ноцицептивните механизми при болка, съпътстваща полиневропатията, характерна за захарния диабет. Публикуваните резултати посочват, че делта-рецепторите се включват във вътреклетъчни сигнални каскади, които водят до променена реактивност на болка и хиперсензитивност. Целта на настоящото изследване бе да се проучи влиянието на делта-рецепторен агонист и делта-антагонист върху механизмите на болка при плъхчета с експериментален захарен диабет. Резултатите от проведеното изследване демонстрират повишена болкова чувствителност при животни с експериментален стрептозотоцинов диабет. Многократното въвеждане на опиоиден агонист DADLE увеличава болковата латентност на плъхове със стрептозотоцинов диабет при изследване с тейл-флик тест. Получените резултати, заедно с предишни наши данни, демонстриращи понижаване на нивата на глюкоза в кръвта под влияние на агонист на делта-рецептори при плъхчета със захарен диабет, оформят съвременен подход в търсенето на фармакологични средства с влияние както върху въглеродния обмен, така и върху някои усложнения на захарния диабет, като полиневропатия и придружаващата я болка.

Ключови думи: захарен диабет, делта-опиоидни рецептори, болка

Адрес за кореспонденция: Д-р М. Варадинова, Катедра по фармакология и токсикология, МФ, МУ, ул. "Здраве" № 2, 1431 София

Summary. Current experimental data suggest that delta-opioid receptors play a role in the modification of nociceptive mechanisms associated with polyneuropathy in diabetes. The results show that delta receptors take part in intracellular transduction cascades, and are related to disrupted reactivity to pain and hypersensitivity. The aim of the present research was to study the effects of delta-agonist and antagonist on the mechanisms of nociception of rats with experimental diabetes. Our results demonstrate increased pain sensitivity of rats with diabetes. The repeated treatment with DADLE increased the pain latency of the experimental rats in tail-flick test. Taken together, the data presented here and our previous results, which demonstrated decreased glucose levels of rats with streptozotocin-induced diabetes after treatment with opioid agonist, suggest a new direction of studying of pharmacological substances which may influence both carbohydrate metabolism and some complications of diabetes like polyneuropathy and the accompanying pain.

Key words: diabetes mellitus, delta-opioid receptors, pain

Address for correspondence: M. Varadinova, MD, Department of Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty, Medical University, 2 Zdrave St., Bg – 1431 Sofia

¹Настоящото проучване е финансирано от конкурсен научен проект на МУ – София, договор № 26/2015.

УВОД

Захарният диабет е социалнозначимо заболяване, от което страдат над 520 000 сънародници и чиято честота нараства. Едно от честите му усложнения е диабетната полиневропатия, придружена с разнообразна симптоматика. Фармакотерапията на болката при полиневропатия включва лекарства от групата на антиепилептични средства и антидепресанти [8]. Схемите за антиболково лечение, които включват опиоиди, невинаги са ефективни [6]. Допускаме, че различните класове опиоидни рецептори имат различна роля и механизми на болка при диабетната полиневропатия. Ролята на делта-рецепторите в патогенезата на болката при тази полиневропатия се дискутира при изследвания с различни техни лиганди. Например: лигандите на делта-1 рецептори са с ниска активност към свързващи места на субстанция Р [3, 15, 19]. Делта-1 рецепторите са във фокуса на различни изследвания, свързани с болка. Сред публикуваните доказателства има данни, че те се включват в механизмите на вълнотръпачни сигнални каскади, които водят до болкова хиперсензитивност [5].

ЦЕЛ

Целта на настоящото проучване е да се изследва влиянието на делта-рецепторен агонист и делта-антагонист в механизмите на болка.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Фармакологичните проучвания бяха проведени върху 15 бели мъжки плъха линия Wistar с тегло 250 ± 20 g, при които беше създаден експериментален стрептозотоцинов диабет (60 mg/kg i.p.), стабилна форма на експериментален захарен диабет, средна по тежест. Бяха подбрани животните, които показваха кръвна захар между 15 и 22 mmol/l. Използваме модифициран от нас метод, при който стрептозотозин се инжектира на гладно (животните са оставени 12 h през нощта на вода без храна) и след инжектиране на стрептозотозин плъхчетата се отглеждат при свободен достъп до вода, редовна храна за плъхове, като през първите $1-2$ дни се добавя глюкозен разтвор (ad libitum) с цел намаляване на смъртността. При настоящите изследвания смъртността беше под 20% (плъховете умират предимно от хипогликемия през първите дни от токсичното въздействие на стрептозотозин). Всички животни бяха проучвани за аналгетично действие чрез тейл-флик теста преди третиране с фармакологичните средства (на 4 -тия ден след инжектиране със стрептозотозин) и след многократ-

ното третиране с опиоидния антагонист налоксон (5 mg/kg) и опиоидния агонист DADLE [D-Ala², D-Leu⁵]-Enkephalin (30 mcg/kg). Вторият метод на изследване бе стандартният Рота-род тест за проучване на мускулен тонус и координация на плъховете. Опитните животни също бяха проучени преди и след третиране с посочените фармакологични средства. Животните бяха разпределени в три групи – по 5 плъха в група.

1. Контролна група с експериментален диабет, третирана с физиологичен разтвор $0,2$ ml/100 g тегло i.p. (К)

2. Експериментална група, третирана с налоксон (5 mg/kg) i.p. (Н)

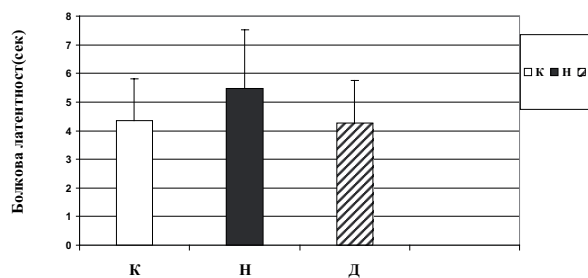
3. Експериментална група, третирана с агонист на опиоидните рецептори DADLE (30 mcg/kg) i.p. (Д).

Двете фармакологични средства под форма на прахообразни субстанции бяха закупени от Сигма, разтваряни съгласно указанията на производителя и въведени в обем не повече от 0.2 ml/100 g тегло.

Методът тейл-флик е публикуван в литературата [4]. Статистическият анализ е извършен чрез ANOVA и стойност на $p < 0.05$ бе приета за статистически значима.

РЕЗУЛТАТИ

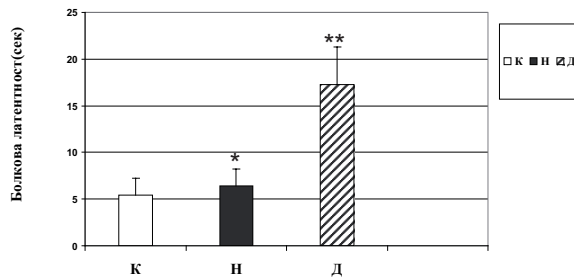
На фиг. 1 са представени изследванията с тейл-флик преди третиране с фармакологичните средства. Няма статистическа значимост между животните от отделните групи. Илюстрирано е латентното време на болкова чувствителност с апарат за тейл-флик, което в сравнение с контрола без захарен диабет е удължено (при животните без диабет времето е $5.2 \pm 1,1$).



Фиг. 1. Латентно време на животните със стрептозотоцинов диабет преди третиране с фармакологичните средства при изследване с тейл-флик

На фиг. 2 са представени резултатите, получени от изследване на аналгетичното действие чрез тейл-флик теста. Под влияние на опиоидния агонист DADLE се увеличава статистически значимо

латентното време в сравнение както с контролната група ($p < 0.001$), така и с латентното време на животните преди третиране. Под влияние на налоксон се отчита известно статистически незначимо удължаване на латентното време.



* $p < 0.001$, при сравняване на групата, третирана с DADLE, спрямо контролната група; ** $p < 0.0001$, при сравняване на експерименталните плъхчета преди и след третиране с DADLE

Фиг. 2. Ефект на DADLE (30 mcg/kg i.p.) и на налоксон (5 mg/kg i.p.) върху латентно време при тейл-флик теста на плъхове със стрептозотоцинов диабет

Проучванията за мускулен тонус и координация чрез Рота-род теста показаха значимо намаление на времето на задържане на животните със стрептозотоцинов диабет в сравнение с контролните недиабетични животни. Резултатите съответно бяха 50 ± 7 секунди за плъховете с диабет към 180 ± 12 секунди (за здравите недиабетични плъхове). Двете фармакологични средства не повлияха мускулния тонус и координацията на животните с диабет – няма различия, които да са статистически значими във времето на задържане на Рота-род.

ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от проведеното проучване демонстрират повишена болкова чувствителност при животни с експериментален стрептозотоцинов диабет. Многократното въвеждане на опиоидния агонист DADLE увеличава латентното време при тейл-флик теста на плъхове със стрептозотоцинов диабет. Третирането с опиоидния антагонист налоксон не променя времето на болкова реактивност. Взети заедно, резултатите демонстрират намаляване на болката под влияние на DADLE. В допълнение опиоидният агонист DADLE не повлиява променения мускулен тонус и координация на животните с експериментален захарен диабет.

Получените резултати с налоксон не се различават от публикувани в литературата изследвания с различни антагонисти на опиоидните рецептори относно болковата чувствителност, проучена чрез тейл-флик [3, 18]. Включването на делта-рецепто-

ри в механизмите на болка е изследвано от други автори, които се фокусират върху тип 1 делта-рецептори [1, 5, 11, 14, 17]. Анализът на публикуваните данни показва, че делта-рецепторите участват в модулация на ноцицептивните механизми основно при механична болка. Нашите проучвания демонстрират ефект на фармакологичното средство DADLE, което е агонист на делта-рецептори и със слаба активност към μ -рецептори. Възможно е тази фармакологична характеристика на DADLE да определя установените ефекти на влияние върху болката, предизвикана от термично въздействие. Неспецифичността върху отделни типове рецептори на DADLE е подкрепена и от някои изследвания, сочещи, че тип делта-1 рецепторите при мишки с диабет нямат различия в експресията на ген и протеин на нивото на проучвания върху ретинални ганглионни клетки в сравнение с недиабетични мишки [16]. Интересно проучване демонстрира различна експресия на делта-1 рецепторите в мозък на диабетични плъхове с различна продължителност на експерименталния диабет [9]. При проучване с метод, определящ рецепторно свързване, е установено понижаване на рецепторите при плъхове с дълго продължаващ експериментален диабет. При плъхове с кратко време на развитие на експериментален диабет не са намерени различия при рецепторното свързване и съответно експресия на делта-1 рецептори. Тези резултати подкрепят становището ни, че намерените промени в болковата чувствителност на опиоиден агонист с действие върху различен подтип делта-рецептори и слаба агонистична активност към μ -рецепторите намалява болковата чувствителност. Фокусът върху това фармакологично средство е свързан и с пониската токсичност в сравнение с агонистите към μ -рецепторите и с по-малкия риск от развитие на лекарствена зависимост при многократна употреба, за разлика от морфин и други морфиномиметици.

Проучванията върху DADLE са свързани и с промените в кръвната захар на животните със стрептозотоцинов захарен диабет. Ние установихме, че DADLE намалява кръвнотехарните нива на мъжки плъхове със захарен диабет с повече от 50%. Взети заедно, резултатите от проучванията върху кръвната захар и тези при настоящото изследване демонстрират експериментален терапевтичен ефект както върху основен показател на въглехидратната обмяна – гликемия, така и върху възможността да се потисне болката при диабетна полиневропатия. Посоченото е ново направление в търсене на фармакологични средства с обезболяващо действие при диабетна полиневропатия, които да подобряват въглехидратната обмяна и

да имат по-малка токсичност от използваните сега лекарства в клиниката. Резултатите от настоящото проучване внасят и новост, свързана с механизмите на развитие на болката при диабетна полиневропатия, които допускат, включват и роля на делта-опиоидни рецептори. В допълнение посочената хипотеза се подкрепя и от доказателства, че делта-рецептори се свързват към NMDA рецептори [2, 7, 10, 12, 13] и регулират вътреклетъчните концентрации на калций чрез повлияване на фосфолипаза С и на инозитол-3-фосфат.

В заключение, резултатите от настоящото проучване демонстрират потискане на болкова чувствителност при плъхове с експериментален стрептозотоцинов диабет чрез модулиране на опиоидните делта-рецептори. Получените резултати, заедно с предишни наши данни, показващи намаляване на повишените нива на глюкоза в кръвта под влияние на агонист на делта-рецепторите, оформят съвременен подход за търсене на фармакологични средства с влияние както върху въглехидратната обмяна, така и върху хроничните усложнения на захарния диабет като полиневропатия.

Библиография

1. Baron, R. Mechanisms of disease: neuropathic pain-a clinical perspective. – *Nat Clin Pract Neurol.*, 2006, 2, 95-106.
2. Bergeron, R., C. de Montigny, G. Debonnel. Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors. – *J Neurosci.*, 1996, 16, 1193-1202.
3. Carlsson, A. et al. Substance P(1-7) induces antihyperalgesia in diabetic mice through a mechanism involving the naloxone-sensitive sigma receptors. – *Eur J Pharmacol.* 2010;626:250-255.
4. D'amour, F.E. D.L. Smith. A method for determining loss of pain sensation. – *J Pharmacol Exp Ther.*, 1941, 72, 74-79.
5. de la Puente, B. et al. Sigma-1 receptors regulate activity-induced spinal sensitization and neuropathic pain after peripheral nerve injury. – *Pain*, 2009, 145, 294-303.
6. Dyck, P.J. et al. Patterns of quantitative sensation testing of hypoesthesia and hyperalgesia are predictive of diabetic polyneuropathy: a study of three cohorts. Nerve growth factor study group. – *Diabetes Care*, 2000, 23, 510-517.
7. Hayashi, T. et al. Modulation by sigma ligands of intracellular free Ca²⁺ mobilization by N-methyl-D-aspartate in primary culture of rat frontal cortical neurons. – *J Pharmacol Exp Ther.*, 1995, 275, 207-214.
8. Kingery, W.S. A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. – *Pain.*, 1990, 73, 123-139.
9. Mardon, K., M. Kassiou, A. Donald. Effects of streptozotocin-induced diabetes on neuronal sigma receptors in the rat brain. – *Life Sci.*, 1999, 65, PL281-PL286.
10. Martina, M. et al. The sigma-1 receptor modulates NMDA receptor synaptic transmission and plasticity via SK channels in rat hippocampus. – *J Physiol.*, 2007, 578, 143-157.
11. Meller, S.T., C.L. Dykstra, G.F. Gebhart. Investigations of the possible role for carbon monoxide (CO) in thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. – *Neuroreport*, 1994, 5, 2337-2341.
12. Monnet, F.P. et al. N-methyl-D-aspartate-induced neuronal activation is selectively modulated by sigma receptors. – *Eur J Pharmacol.*, 1990, 179, 441-445.
13. Monnet, F.P. et al. Protein kinase C-dependent potentiation of intracellular calcium influx by sigma1 receptor agonists in rat hippocampal neurons. – *J Pharmacol Exp Ther.*, 2003, 307, 705-712.
14. Nieto, F.R. et al. Tetrodotoxin inhibits the development and expression of neuropathic pain induced by paclitaxel in mice. – *Pain*, 2008, 137, 520-531.
15. Ohsawa, M. et al. The effect of substance P1-7 amide on nociceptive threshold in diabetic mice. – *Peptides*, 2011, 32, 93-98.
16. Ola, M.S. et al. Analysis of sigma receptor (sigma R1) expression in retinal ganglion cells cultured under hyperglycemic conditions and in diabetic mice. – *Brain Res Mol Brain Res.*, 2002, 107, 97-107.
17. Treede, R.D. et al. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. – *Prog Neurobiol.*, 1992, 38, 397-421.
18. Tsao, L.I., T.P. Su. Naloxone-sensitive, haloperidol-sensitive, [3H](+)SKF-10047-binding protein partially purified from rat liver and rat brain membranes: an opioid/sigma receptor? – *Synapse*, 1997, 25, 117-124.
19. Zhou, Q. et al. The C-terminal amidated analogue of the substance P (SP) fragment SP(1-7) attenuates the expression of naloxone-precipitated withdrawal in morphine dependent rats. – *Peptides*, 2009, 30, 2418-2422.