

**ПРОУЧВАНИЯ НА ОПИОИДНИ ФАРМАКОЛОГИЧНИ СРЕДСТВА
ВЪРХУ ПРОМЕНИ В ПОВЕДЕНИЕТО И ПАМЕТТА НА ПЛЪХОВЕ
СЪС СТРЕПТОЗОТОЦИНОВ ЗАХАРЕН ДИАБЕТ*****М. Варадинова и Н. Бояджиева****Катедра по фармакология и токсикология,**Медицински факултет, Медицински университет – София*

Резюме. Захарният диабет е хронично заболяване, при което се отчитат различни нарушения в мозъчните функции, като промени в когнитивните процеси, поведението и др. Редица изследователи дискутират ролята на опиоидната система в механизмите на промяна на посочените функции при захарен диабет. Целта на настоящото проучване бе да се определи влиянието на две фармакологични средства – агонист и антагонист на опиоидните рецептори, върху параметри на плъхчета с експериментален диабет. Резултатите демонстрират значими промени в нивата на глюкоза след третиране със субстанциите. В допълнение се наблюдава съществено скъсяване на латентното време и подобрена реакция на обучение при плъхчетата, третирани с делта-опиоиден агонист. Настоящите данни показват роля на делта-опиоидните рецептори в регулацията на глюкозни нива и обучителни процеси при плъхове със захарен диабет и дават основание за по-нататъшни изследвания върху участието на различните субтипове рецептори в тези механизми.

Ключови думи: *диабет, опиоидни агонисти, опиоидни антагонисти, обучение, памет*

**EFFECTS OF OPIOID PHARMACOLOGICAL SUBSTANCES
ON LEARNING AND MEMORY OF RATS WITH STREPTOZOTOCIN-
INDUCED DIABETES*****М. Varadinova and N. Boyadjieva****Department of Pharmacology and Toxicology,**Medical Faculty, Medical University – Sofia*

Abstract. Diabetes is a chronic disease often associated with disrupted brain functions, changes in the cognitive abilities, affective disorders, etc. Numerous data discuss the role of the opioid system in the pathological mechanisms. The aim of the present study was to investigate the effects of opioid agonist or antagonist on reactivity and cognitive abilities of rats with

streptozotocin-induced diabetes. Results demonstrated substantial changes of the glucose levels after treatment with the studied compounds. Moreover, the experimental rats treated with delta-opioid agonist demonstrated significantly decreased latency time in the shuttle-box active avoidance test. The data presented here suggest the role of delta-opioid receptors in the regulation of glucose levels, learning and memory processes of rats with diabetes and give a good reason for further studying on the participation of different delta-receptor subtypes in these mechanisms.

Key words: *diabetes, opioid agonists, opioid antagonists, learning, memory*

Въведение

Опиоидната система регулира различни функции в мозъка и периферията. Известна е ролята на опиоидните рецептори в контрола на болка, развитието на зависимост към различни опиоидни средства и регулацията на много мозъчни функции [2, 5]. Опиоидните рецептори принадлежат към групата на G-протеин-свързани рецептори и основно се разделят в три групи: μ -опиоидни рецептори (MOR); δ -опиоидни рецептори (DOR) и κ -опиоидни рецептори (KOR). Ролята на опиоидните рецептори в поведението и паметта при пациенти със захарен диабет се дискутира, но няма достатъчно експериментални доказателства в подкрепа на един или друг вид рецептори [1, 6, 21, 22].

Захарният диабет е хронично протичащо заболяване, при което се отчитат различни нарушения в мозъчните функции, като промени в апетит, поведение, памет и др. [12, 16, 17, 20]. Има данни за ролята на различни невромедиаторни системи на мозъка в механизмите на промяна на посочените функции при захарен диабет [3, 7, 10, 11]. Ограничени са публикуваните експериментални изследвания за ролята на δ -опиоидните рецептори в механизмите на регулация на памет при експериментален захарен диабет [8, 13, 14]. Наши предишни изследвания сочат, че съществува разлика в ефектите на фармакологични средства със селективност към тип μ -опиоидни рецептори и тип δ -опиоидни рецептори. Ние публикувахме факти, че под влияние на агонисти на μ -опиоидни рецептори се понижава активността на NK cells и обратно – при активиране на δ -опиоидни рецептори се повишава активността на тези имунни клетки [18].

Цел на настоящото проучване е да се определи влиянието на две фармакологични средства DADLE [D-Ala², D-Leu⁵]-Enkephalin и

налуксон, съответно агонист и антагонист на опиоидните рецептори, върху параметри на плъхчета с експериментален диабет.

Материал и методи

Опитите са проведени върху бели мъжки плъхове с тегло 250-300 g, които са разделени в две групи:

1. Контролна – третирани с физиологичен разтвор еднократно i.p., и

2. Експериментална група на създаден захарен диабет чрез стрептозотозин (60 mg/kg i.p.). Експерименталната група е разделена на три подгрупи – всяка с по пет животни, съответно:

1) Контролна – със захарен диабет, третирана с физиологичен разтвор i.p.

2) Група със захарен диабет и третирана с опиоиден агонист DADLE (30 mcg/kg, i.p.).

3) Група със захарен диабет и третирана с антагонист на опиоидните рецептори naloxone (5 mg/kg i.p.).

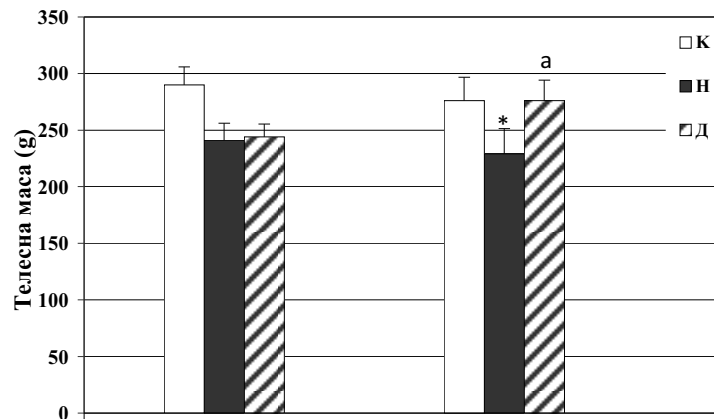
Протокол на проучването

Преди инжектирането на стрептозотозин животните бяха оставени без храна, но на вода *ad libitum* за 12 часа през нощта (нашият опит със стрептозотозиново диабет показва по-голяма чувствителност на β -клетките към токсичното действие на стрептозотозин върху животни на гладно). Инжектирането на стрептозотозин 60 mg/kg i.p. беше еднократно, след което животните веднага се поставяха в касетки със свободен достъп до вода с разтвор 10% на глюкоза и регулярната храна за плъхове. За намаляване на смъртността от стрептозотозин е важно животните да имат достъп до глюкозен разтвор през първите 24-48 часа. През първите 96 часа промените в съдържанието на глюкоза в кръвта са индивидуални за отделните животни, това е нестабилен период, по време на който не се правят фармакологични изследвания. През този период смъртността на инжектираните със стрептозотозин животни е от 20 до 30% в зависимост от вида плъхове, пола, сезонността и др. Експериментите в настоящото проучване стартираха след 4-тия ден от инжектиране на стрептозотозин, като на всеки 3 дни се определяше глюкоза в кръвта. Целта е да се създаде стабилна форма на стрептозотозиново диабет. Третирането с фармакологичните средства се провеждаше ежедневно за период от 14 дни. След третиране животните

бяха изследвани с апарат shuttle-box, съгласно утвърдения метод за изследване на обучение и памет. В хода на проучването бяха определяни концентрациите на глюкоза в кръвта с Акучек апарат, локомоторната активност на животните с теста рота-род, теглото на животните и показатели за обучение и памет чрез определяне на латентното време и броя отговори на стимул на плъховете през сесията на обучение в shuttle-box. Резултатите бяха обработени статистически и представени на фигури.

Резултати

На фиг. 1 са представени данните за промени в теглото на плъхове след третиране с налоксон и DADLE.



Фиг. 1. Телесна маса на експерименталните животни с диабет преди и след третиране с фармакологичните средства

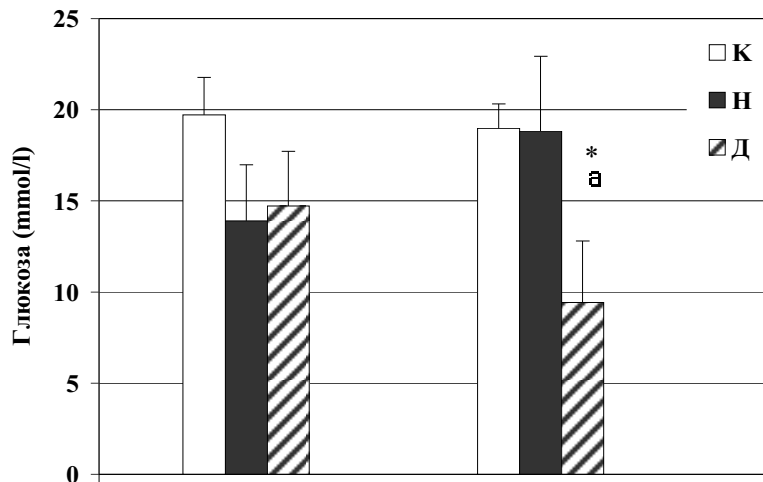
* $p < 0.01$, спрямо група „контрол-диабет“

^a $p < 0.01$, спрямо същата група преди третиране

Животните с DADLE показват повишаване на теглото, което е статистически значимо спрямо теглото преди третиране с веществото. Теглото на животните след третиране с DADLE се доближава до теглото на контролната група. Фигурата демонстрира, че преди стартиране с фармакологичните средства животните със стрептозотцин намаляват теглото за периода от 2 седмици. След многократното третиране с налоксон бе отчетено редуциране на теглото на животните, статистически значимо спрямо контролната група. Няма статистически значима разлика в намаляване на теглото под влияние на налоксон в сравнение с теглото преди третиране.

На фиг. 2 са представени промените в концентрацията на глюкоза в кръвна плазма. Всички животни, които са третирани със

стрептозотоцин, показаха повишени нива на кръвната захар, достигащи до 20-22 mmol/l. Контролната група животни, нетретирана със стрептозотоцин, показваше сутрешни нива на кръвна захар на гладно между 4.8 и 6. Статистически значимо е понижаването на глюкозата в кръвта на животните със стрептозотоцинов диабет след многократно третиране с DADLE, както спрямо стойностите отпреди третирането ($p < 0.02$), така и спрямо контролната група ($p < 0.001$). Под влияние на налоксон се отчетоха по-високи нива на глюкоза в кръвта.



Фиг. 2. Нива на глюкоза на експерименталните животни с диабет преди и след третиране с фармакологичните средства

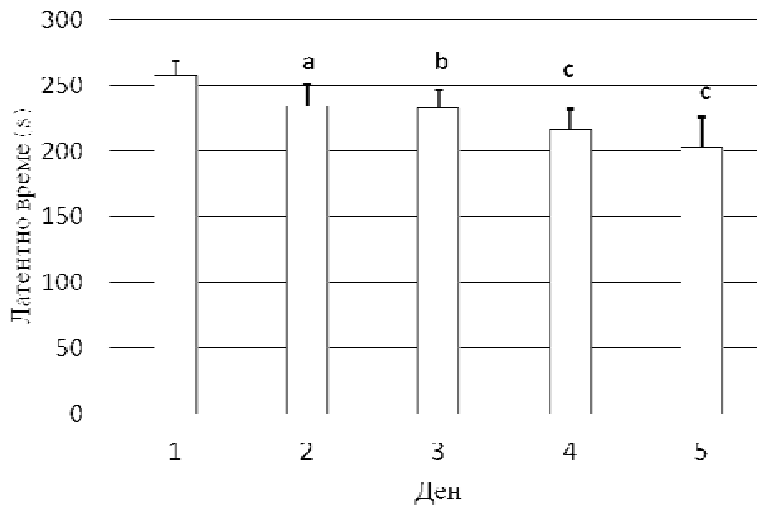
* $p < 0.001$, спрямо група „контрола-диабет”

^a $p < 0.02$, спрямо същата група преди третиране

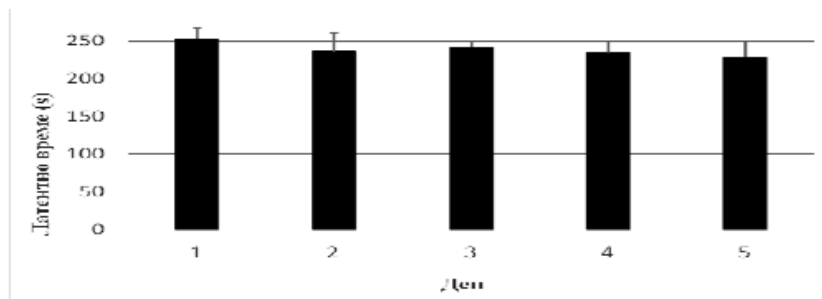
По време на експериментите не се отчетоха промени в концентрациите на глюкоза в кръвта на двете контролни групи без експериментален диабет и групата със стрептозотоцинов диабет, нетретирана с фармакологични средства. По време на изследванията след 4-тия ден от създаване на експерименталния захарен диабет не се отчете смъртност при животните.

На фиг. 3, 4 и 5 са представени резултатите от изследванията върху латентното време на реакция на стимул при обучение в shuttle-box. Периодът на обучение е петдневен и под влияние на налоксон няма статистически значима разлика между отделните дни в групата. При сравняване между групата, третирана с налоксон (фиг. 4), и групата, третирана с DADLE (фиг. 5), на 5-ия ден са отчетени разлики в латентното време ($p < 0.01$). При животните, третирани с DADLE, е отчетено по-значимо скъсяване на латентното

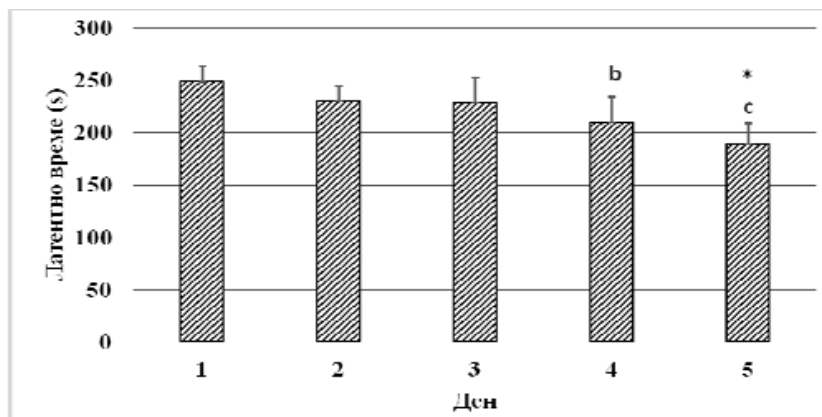
време при обучение в shuttle box на 4-тия и 5-ия ден в сравнение с първия ден ($p < 0.01$; $p < 0.001$). Анализът на резултатите за латентно време на реакция в shuttle-box показва ефекти на DADLE.



Фиг. 3. Латентно време на плъхове от група контрола с диабет в тест с shuttle-box
a – $p < 0.02$; b – $p < 0.01$; c – $p < 0.001$, спрямо първия ден на обучение



Фиг. 4. Ефект на налоксон върху латентното време на плъхчета в тест с shuttle-box



Фиг. 5. Ефект на DADLE върху латентното време на плъхчета в тест с shuttle-box
b – $p < 0.01$; c – $p < 0.001$, спрямо първия ден на обучение; * $p < 0.01$, спрямо групата, третирана с налоксон

Обсъждане

Резултатите от проведените фармакологични изследвания показват промени в теглото и съдържанието на глюкоза в кръвта след еднократно инжектиране на стрептозотоцин на бели мъжки плъхове. Многократното въвеждане на налоксон или DADLE при животните със стабилно развит експериментален захарен диабет показва промени както в теглото и глюкозата в кръвта, така и в паметта. Отчитането на латентното време през сесиите на обучение в продължение на 5 дни е важен елемент за изследване влиянието на фармакологични средства върху паметовата функция. За първи път в настоящото проучване се демонстрира ролята на опиоидните рецептори в регулацията на памет при експериментален захарен диабет.

Известно е, че фармакологичното средство DADLE е селективен агонист на δ -опиоидните рецептори. Има данни за слаба активност към тип 1 μ -рецептори, което е установено върху гладък мускул, но не и при изследвания върху мозък [9]. Опитът с DADLE помага да се обяснят някои промени в поведението на пациенти със захарен диабет. Активирането предимно на делта-рецепторите е свързано с намаляване на латентното време на реакция, отразяващо паметови и когнитивни функции. Налоксон е антагонист на опиоидните рецептори. Наши проучвания върху имунната система доказаха, че при многократното прилагане на опиоиден антагонист се проявява по-значимо антагонизмът и блокиращото действие върху δ -рецепторите и по-слабо върху μ -опиоидни рецептори [4, 18]. След еднократно приложение блокиращото действие на налоксон е по-значимо върху μ -рецептори. Ние също публикувахме в литературата убедителни данни, че след продължително прилагане на налоксон се променят рецепторите (механизми на десензитизация) и е допустимо налоксон да действа като агонист на δ -рецепторите (изследвания върху имунни клетки) [19]. При настоящите изследвания нямаме данни за този „феномен“, което се дължи на по-краткия период на приложение на налоксон в сравнение с проучванията ни върху имунната система.

Резултатите от представеното проучване дават новост в литературата за роля на δ -опиоидните рецептори в регулация на когнитивни функции и реактивни способности при експериментален захарен диабет. В допълнение, проучванията върху глюкоза в кръвта на животните показват данни за понижаване на високите нива на кръвна захар в условията на захарен диабет под влияние на вещество – агонист на делта-рецепторите. Посочените експе-

риментални [15, 16] резултати дават основание да допуснем, че ако при диабетици се добави в комплексна терапия лечебно средство с агонистично действие върху делта-опиоидни рецептори, може да се очаква понижение на кръвната захар и съответен риск от хипогликемия, паралелно с промени в паметта. Взети заедно, резултатите от настоящите изследвания с DADLE и налоксон дават основание да допуснем роля на опиоидните делта-рецептори на мозъка в регулацията на памет при обучение.

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

Библиография

1. Aileen JF. The use of animal models in diabetes research. – Br J Pharmacol, 2012, № 166(3), 877-894.
2. Allouche, S, Noble F, Marie N. Opioid receptor desensitization: mechanisms and its link to tolerance. – Front Pharmacol, 2014, № 5, 280.
3. Aynah AP et al. The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. – Trends Pharmacol Sci, 2011, № 32(10), 581-590.
4. Boyadjieva NI, Chaturvedi K, Poplawski MM, Sarkar DK. Opioid antagonist naltrexone disrupts feedback interaction between mu and delta opioid receptors in splenocytes to prevent alcohol inhibition of NK cell function. – J Immunol, 2004; 173(1):42-9.
5. Bruijnzeel AW. Kappa-opioid receptor signaling and brain reward function. – Brain Res Rev, 2009, № 62(1), 127-146.
6. Cassidy V et al. The Effects of Opioids and Opioid Analogs on Animal and Human Endocrine Systems. – Endocr Rev, 2010, № 31(1), 98-132.
7. Chung PC, Kieffer, BL. Delta opioid receptors in brain function and diseases. – Pharmacol Ther, 2013, № 140(1), 112-120.
8. Gendron, L et al. Recent advances on the δ opioid receptor: from trafficking to function. – Br J Pharmacol, 2015, № 172(2), 403-419.
9. Gowhar A et al. A streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain model for static or dynamic mechanical allodynia and vulvodinia: validation using topical and systemic gabapentin. – Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2015, № 388(11), 1129-1140.
10. Ho N, Sommers MS, Lucki I. Effects of Diabetes on Hippocampal Neurogenesis: Links to Cognition and Depression. – Neurosci Biobehav Rev. Neurosci Biobehav Rev, 2013, № 37(8), 1346-1362.
11. Jian-Qin W et al. Brain Aging and AD-Like Pathology in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. – J Diabetes Res, 2014, 796840.

12. Juan PD et al. Effect of Resveratrol on Behavioral Performance of Streptozotocin-induced Diabetic Mice in Anxiety Tests. – Exp Anim., 2014, № 63(3), 277-287.
13. Klenowski P, Morgan M, Bartlett SE. The role of δ -opioid receptors in learning and memory underlying the development of addiction. – Br J Pharmacol, 2015, № 172(2), 297-310.
14. Lutz PE, Kieffer BL. Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. – Trends Neurosci, 2013, № 36(3), 195-206.
15. Polunina, AG, Bryun EA. Neuropsychological Functions of μ - and δ -Opioid Systems. – ISRN Addict, 2013, 674534.
16. Rezai X et al. Delta Opioid Receptors Regulate Temporoammonic-Activated Feedforward Inhibition to the Mouse CA1 Hippocampus. – PLoS One, 2013, № 8(11), e79081.
17. Sadeghi A et al. The Effect of Diabetes Mellitus on Apoptosis in Hippocampus: Cellular and Molecular Aspects. – Int J Prev Med, 2016, № 7, 57.
18. Sarkar DK, Sengupta A, Zhang C, Boyadjieva N, Murugan S. Opiate antagonist prevents μ - and δ -opiate receptor dimerization to facilitate ability of agonist to control ethanol-altered natural killer cell functions and mammary tumor growth. J Biol Chem, 2012; 287(20):16734-47.
19. Septimiu V et al. Opioid Receptor Blockade Improves Hypoglycemia-Associated Autonomic Failure in Type 1 Diabetes Mellitus. – J Clin Endocrinol Metab, 2011; № 96(11), 3424-3431.
20. Suo-bin Wang et Jian-ping Jia. Oxymatrine attenuates diabetes-associated cognitive deficits in rats. – Acta Pharmacol Sin, 2014, № 35(3), 331-338.
21. Suresh K. et al. Acute and chronic animal models for the evaluation of anti-diabetic agents. – Cardiovasc Diabetol, 2012, № 11, 9.
22. Wee S, Koob GF. The role of the dynorphin- κ opioid system in the reinforcing effects of drugs of abuse. – Psychopharmacology (Berl), 2010, № 210(2), 121-135.

✉ *Адрес за кореспонденция:*

Мирослава Варадинова
Катедра по фармакология и токсикология
Медицински факултет
Медицински университет
ул. „Здраве“ № 2
1431 София

☎ 02 952 05 39

e-mail: miria@abv.bg