

Участие μ -опиатных рецепторов ростральной и каудальной областей прилежащего ядра в реализации положительно-подкрепляющих свойств героина у крыс

СМИТ Д.

профессор, зав. кафедрой физиологии и фармакологии медицинского факультета университета Вейк-Фореста, Уинстон-Салем, Северная Каролина, США,

ЛЮПИНА Ю.В.

к.биол.н., старший научный сотрудник лаборатории нейробиологии влечений, НИИ наркологии МЗ РФ, Москва

МАРТИН Т.

профессор кафедры физиологии и фармакологии медицинского факультета университета Вейк-Фореста, Уинстон-Салем, Северная Каролина, США

КИМ С.

профессор кафедры физиологии и фармакологии медицинского факультета университета Вейк-Фореста, Уинстон-Салем, Северная Каролина, США

Впервые было установлено, что μ -опиатные рецепторы каудальной области прилежащего ядра вносят наибольший вклад в реализацию положительно-подкрепляющих свойств героина в реакции самовведения у крыс по сравнению с μ -опиатными рецепторами, расположенными в ростральной области прилежащего ядра. Установленный факт связан с особенностями функциональной организации этой области прилежащего ядра.

Опиаты являются важным классом фармакологических соединений, они широко используются в клинике в качестве анальгетиков. Однако эти вещества обладают некоторыми фармакологическими особенностями, которые ограничивают их клиническое применение. К нежелательным эффектам опиоидов относятся положительные подкрепляющие свойства, которые обуславливают высокий наркогенный потенциал. Героин является широко распространенным нелегальным наркотиком во многих странах Европы и Азии, а также Северной Америки.

Изучение самовведения наркотиков у животных является удобной моделью для выявления подкрепляющих свойств веществ, лежащих в основе развития влечения к наркотику. Инфузии героина обуславливают реакцию его самовведения у животных в дозозависимой манере [5]. Известно, что опиаты оказывают свое действие, связываясь со специфическими участками опиатных рецепторов. Антагонисты -опиатных, но не - или -опиатных рецепторов, как было показано, снижают реакцию самовведения героина у крыс [17]. В мозге высокая плотность опиатных рецепторов, так же как и опиоидных пептидов выявлена в вентральной тегментальной области и в нескольких дофаминергических путях, включающих прилежащее ядро (Nucleus accumbens). Прилежащее ядро является ключевым звеном в реализации подкрепляющих эффектов -опиоидных рецепторных агонистов [4, 8]. В экспериментах установлено, что крысы вводят морфиноподобные опиаты непосредственно в прилежащее ядро [6, 8, 18]. Поведенческие и фармакологические доказательства во влечения прилежащего ядра в реализацию подкрепляющих свойств опиатов согласуются с данными об анатомической локализации -опиоидных рецепторов в этом регионе. Недавно, были получены ультраструктурные доказательства того, что -опиатные рецепторы в прилежащем ядре локализованы преимущественно на экстраинаптических участках плазматических мембран дендритов, контактирующих с опиоидергическими эфферентами. Подкрепляющие свойства опиатов реализуются через активацию -опиоидных рецепторов прилежащего ядра и изменение чувствительности нейронов-мишеней для опиоидных пептидов [22].

Выяснение рецепторных механизмов фармакологического действия опиатов стало возможным благодаря применению различных и обратимых, и необратимых селективных -опиатных рецепторных антагонистов.

-фуналтрексамин (производное налтрексона, -FNA) был одним из первых селективных -опиоидных рецептор-алкилирующих антагонистов, изученных биохимически и фармакологически [23]. -FNA необратимо связывается с -опиоидными рецепторами, вызывая длительный антагонизм -, но не -опиатных рецепторов [7, 9, 21]. Плотность -опиатных рецепторов снижается в мозге крыс после введения -FNA в дозах, вызывающих сдвиг кривой доза-эффект для анальгетического эффекта -опиоидных рецепторных агонистов в неконкурентной манере [1, 11]. Анатомическая локализация связывания -FNA в мозге является индикатором -опиатных рецепторов [10]. Локализация внутрижелудочкового введения -FNA на [³H]DAMGO-связывании с мембранами различных структур мозга у крыс показала, что снижение плотности -опиатных рецепторов составляет 50% и является относительно постоянной величиной во всех регионах мозга [13, 14, 15].

Целью настоящего исследования было определить функциональную роль -опиатных рецепторов ростральной и каудальной области прилежащего ядра в реализации реакции самовведения героина у крыс.

Методы исследования

Животные

В экспериментах использовались крысы-самцы линии Fischer-344, весом 250—300 г в начале эксперимента. Животные содержались индивидуально в плексигласовых клетках, вода была доступна животным *ad libitum*, стандартный корм (одна пищевая гранула весила 5 г) давался в таком количестве, чтобы вес животного находился в пределах 85—90 % от исходного. Температура содержания животных контролировалась в автоматическом режиме 21±1 °C. Режим световая/темновая фаза был продолжительностью 12 ч каждая фаза. Все эксперименты были проведены в темновую фазу (05:00 — 17:00).

Все хирургические процедуры проводились, как было описано ранее [14]. Животные были анестезированы с по-

Местоположение
направляющей канюли от точки
“Bregma”

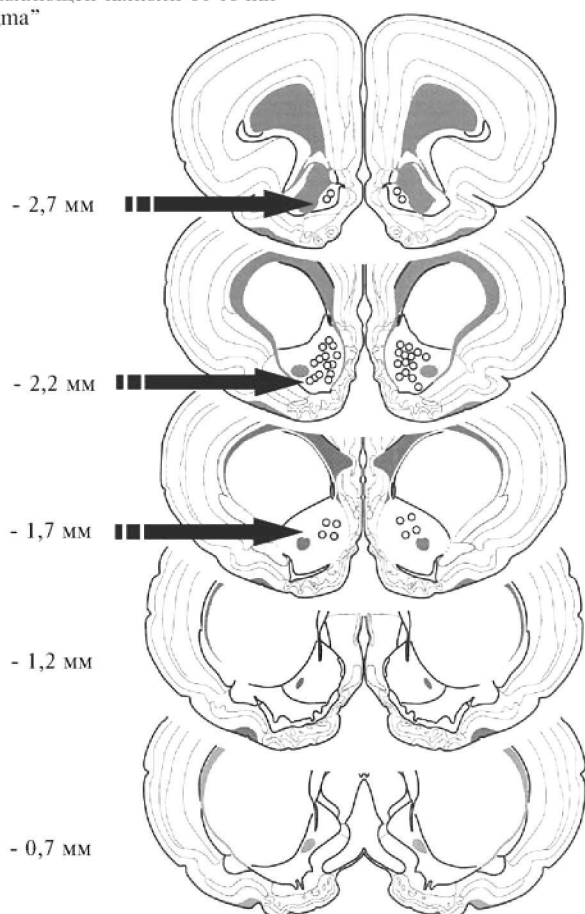


Рис. 1. Схематическое изображение местоположения направляющей канюли для фокальной инъекции -FNA в ростральную область прилежащего ядра

мощью внутрибрюшинной инъекции фентобарбитала в дозе 50 мг/кг и атропина сульфата в дозе 10 мг/кг. Животным были имплантированы катетер в правую подключичную вену. Катетер был зафиксирован под кожей с помощью тefлонового ограничителя. Внешний конец катетера был подсоединен к инъектору с помощью жидкостного контакта и защищен пружинным металлическим поводком [25]. Направляющие канюли были имплантированы билатерально с использованием стереотаксического аппарата Stellar, который позволяет автоматически регулировать угол имплантации направляющей канюли. Направляющие канюли были имплантированы в дорсальную область рострального отдела (+2,2 мм от точки “Bregma”, 1,5 мм от средней линии и 5,8 мм вентрально от поверхности кости черепа) (рис. 1) или каудального отдела (+0,7 мм от точки “Bregma”, 1,5 мм от средней линии и 5,8 мм вентрально от поверхности кости черепа) (рис. 2) прилежащего ядра. Угол имплантации направляющей канюли составлял 100 к поверхности кости черепа.

Канюли были зафиксированы на черепе животного с помощью зубного акрилового цемента и самозакручивающихся винтов (J.I. Morris and Co., Southbridge, MA). После операции животным однократно было введено внутримышечно 75 000 МЕ пенициллина G прокаина, и все наружные покровы, подвергавшиеся хирургическому воздействию были обработаны антибиотиком (Polysporin, Wellcome-Glaxo, Research Triangle Park, NC).

Местоположение
направляющей канюли от точки
“Bregma”

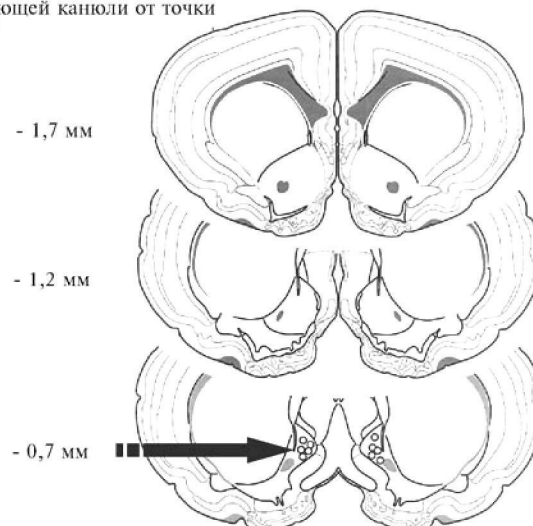


Рис. 2. Схематическое изображение местоположения направляющей канюли для фокальной инъекции -FNA в каудальную область прилежащего ядра

Данные гистологического исследования свидетельствовали, что инъекции были произведены в ростральную область прилежащего ядра, что соответствовало положению направляющей канюли на уровне 2,7 и 1,7 мм ростральнее точки “Bregma” для этих животных (рис. 1) (n=18) или каудальную область прилежащего ядра, что соответствовало положению направляющей канюли на уровне 1,2 и 0,7 мм ростральнее точки “Bregma” для этих животных (рис. 2) (n=14).

Внутривенное самовведение героина

Реакция самовведения героина вырабатывалась у животных по методике, описанной ранее [14]. Все эксперименты были проведены в инструментальных звукоизолированных камерах (21 21 28 см), контролируемых IBM-компьютером через специальный интерфейс (MED Associates Inc., St Albans, VT). В течение 4 ч экспериментальной сессии лампа в камере была включена, что было сопряжено с возможностью активации педали. При нажатии на педаль, расположенную на высоте 6,8 см от пола и 1,1 см книзу от лампы, животные получали инфузию 60 мкг/кг героина в объеме 0,2 мл в течение 5,6 с. У животных вырабатывалась реакция самовведения героина при фиксированном соотношении, равном 1. Реакция самовведения считалась выработанной успешно, если количество полученных инфузий в экспериментальную сессию не превышало 10% таковых значений предыдущей экспериментальной сессии. Затем в течение нескольких последовательных сессий фиксированное соотношение было увеличено с 1 до 10, что обеспечивало получение животным инфузии героина только после 10-кратного нажатия на педаль. После достижения стабильной экспериментальной реакции в течение 5-ти дней у каждого животного была получена зависимость количества полученных инфузий от дозы героина, которой заменяли “обучаемую” дозу 60 мкг/кг. Дозы героина: 1, 3, 6, 18, 30 или 100 мкг/кг были использованы для получения зависимости количества получаемых инфузий от дозы героина. Кроме того, были произведены 3-кратные замены героина на физиологический раствор с целью выявления у животных способности к дифференцированию героина от физиологического раствора.

Введение β -FNA в прилежащее ядро

-FNA в указанных дозах (0,25, 1,25 или 2,5 нМ или 0,9% NaCl, pH 7,4) были введены в объеме 1 мкл со скоростью 0,2 мкл/мин с помощью микроинфузионного насоса (KDS Scientific, Boston, MA).

Изучение эффекта введения β -FNA на радиоавтографическое связывание [3 H]DAMGO и [3 H]DPDPE в прилежащем ядре.

Метод был ранее описан Martin et al., 1993. Срезы головного мозга животных толщиной 20 мкм были сделаны на пяти различных уровнях области прилежащего ядра, соответствующих -2,7, -2,2, -1,7, -1,2 или -0,7 мм рострально от Bregma и идентифицированных согласно атласу Paxinos and Watson, 1986. Животных декапитировали через 24 ч после введения -FNA или 0,9% раствора NaCl. Срезы были преинкубированы в течение 20 мин в буфере (50 мМ Tris HCl, pH 7,4) при 25 °C, с последующей 2,5-ч инкубацией или в 2 нМ [3 H]DAMGO или 4 нМ [3 H]DPDPE. Эти концентрации соответствуют кривым насыщения для -опиатных и -опиатных рецепторов, соответственно, в этих условиях [13]. Неспецифическое связывание было оценено в присутствии 1 мкМ налоксона в примыкающих к прилежащему ядру отделах головного мозга. Срезы отмывали в течение 2 мин в холодном буфере с последующей промывкой в дистиллированной воде в течение 10 с. Затем срезы высушивались в потоке холодного сухого воздуха и экспонировались на 3 H-чувствительной пленке (Hyperfilm- 3 H, Amersham, Arlington Heights, IL) вместе со стандартом (3 H-microscales, Amersham, Arlington Heights, IL) в течение 9 недель.

Анализ данных

Данные, полученные у животных в экспериментах по самовведению, обрабатывались с помощью дисперсионного анализа (ANOVA). Bonferroni-Dunn t-test для анализа многократных повторных наблюдений был использован при оценке временного эффекта введения -FNA. Для анализа данных радиоавтографического исследования был использован двухфакторный анализ ANOVA с использованием прилежащего ядра и дозы -FNA в качестве независимых вариантов и плотности [3 H]DAMGO или [3 H]DPDPE в качестве зависимых вариантов.

Результаты исследования

Биохимическая и анатомическая специфичность действия β -FNA внутри прилежащего ядра

Введение -FNA в прилежащее ядро в дозозависимой манере снижает плотность -опиатных рецепторов, что выражается в снижении связывания [3 H]DAMGO в прилежащем ядре, а максимальное снижение плотности -опиатных рецепторов достигает 80% (рис. 3). Расстояние, на котором происходило снижение плотности -опиатных рецепторов, очевидно, зависит от дозы введенного -FNA в прилежащее ядро. Наибольшая доза -FNA (2,5 нМ) вызывала снижение плотности -опиатных рецепторов на расстоянии до 1,5 мм от места ее введения, а наименьшая доза (0,25 нМ) — на расстоянии только 0,7 мм от места введения (рис 3). Плотность связывания [3 H]DPDPE была заметно уменьшена (на 25+5,6% от контроля) только при введении самой высокой дозы бета-FNA (2,5 нМ). Введение -FNA вызывало достоверное снижение связывания [3 H]DAMGO в прилежащем ядре,

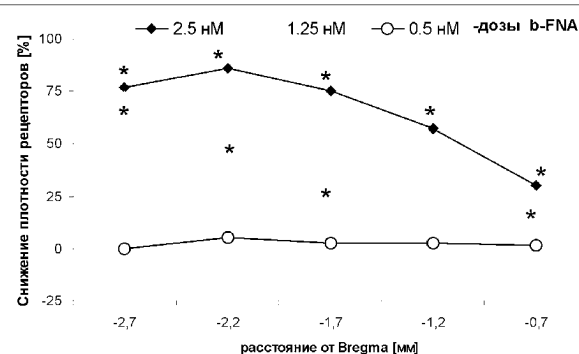


Рис. 3. Влияние -FNA на плотность -опиатных рецепторов в прилежащем ядре. Данные представлены в процентах по отношению к контрольным значениям. * - $P < 0,05$.

а в сопредельных областях, таких, как: хвостатое ядро (96+8,0 %), обонятельные луковицы (105+9,0) и передняя кора (92+8,0) не вызывало снижения связывания [3 H]DAMGO и показатели связывания не отличались от уровня контрольных значений.

Влияние введения β -FNA в ростральную область прилежащего ядра на реакцию самовведения героина у крыс

Героин оказывал значительное подкрепляющее действие (21,8 + 1,0 инфузий/4 ч) в группе исследованных животных, и замена его на физиологический раствор существенно снижала количество полученных инфузий у этих животных (5,1+0,6 инфузий/4 ч) ($F(1,38)=237,2$, $P < 0,0001$). Введение физиологического раствора в прилежащее ядро не оказывало влияния на реакцию самовведения героина у крыс, регистрируемую в течение 18 последовательных сессий после его введения ($F(14,84)=0,606$, $P=0,853$) (рис. 4А). Введение в прилежащее ядро -FNA не оказывало дозозависимого эффекта спустя 24 ч после его введения в ростральную область прилежащего ядра ($F(3,29)=0,427$, $P=0,735$). Не наблюдалось достоверных отличий от контрольной группы животных в реакции самовведения героина, регистрируемую через 24 ч после введения -FNA в ростральную область прилежащего ядра в дозах 0,25 нМ ($P=0,42$), 1,25 нМ ($P=0,73$) или 2,5 нМ ($P=0,82$). Снижение количества получаемых инфузий героина наблюдалось у крыс на 2—4 и 8 дни и возвращалось к контрольным значениям к 9—18 дням после введения 2,5 нМ -FNA в ростральную область прилежащего ядра (рис. 4А).

Влияние введения β -FNA в каудальную область прилежащего ядра на реакцию самовведения героина у крыс

Героин оказывал значительное подкрепляющее действие (22,4 + 1,2 инфузий/4 ч) в группе исследованных животных, и замена его на физиологический раствор существенно снижала количество полученных инфузий у этих животных (4,7+0,6 инфузий/4 ч) [$F(1,42)=186,7$, $P < 0,0001$]. Введение -FNA в каудальную область прилежащего ядра оказывало достоверное дозозависимое влияние на количество полученных инфузий у крыс в реакции самовведения героина [$F(3,31)=2,92$, $P=0,049$], причем фактор времени, прошедшего с момента инъекции, также имел существенное значение [$F(1,31)=6,65$, $P=0,015$] (рис. 4Б). Введение 0,25 нМ -FNA в каудальную область прилежащего ядра приводило к достоверному увеличению, по сравнению с животными контрольной группы,

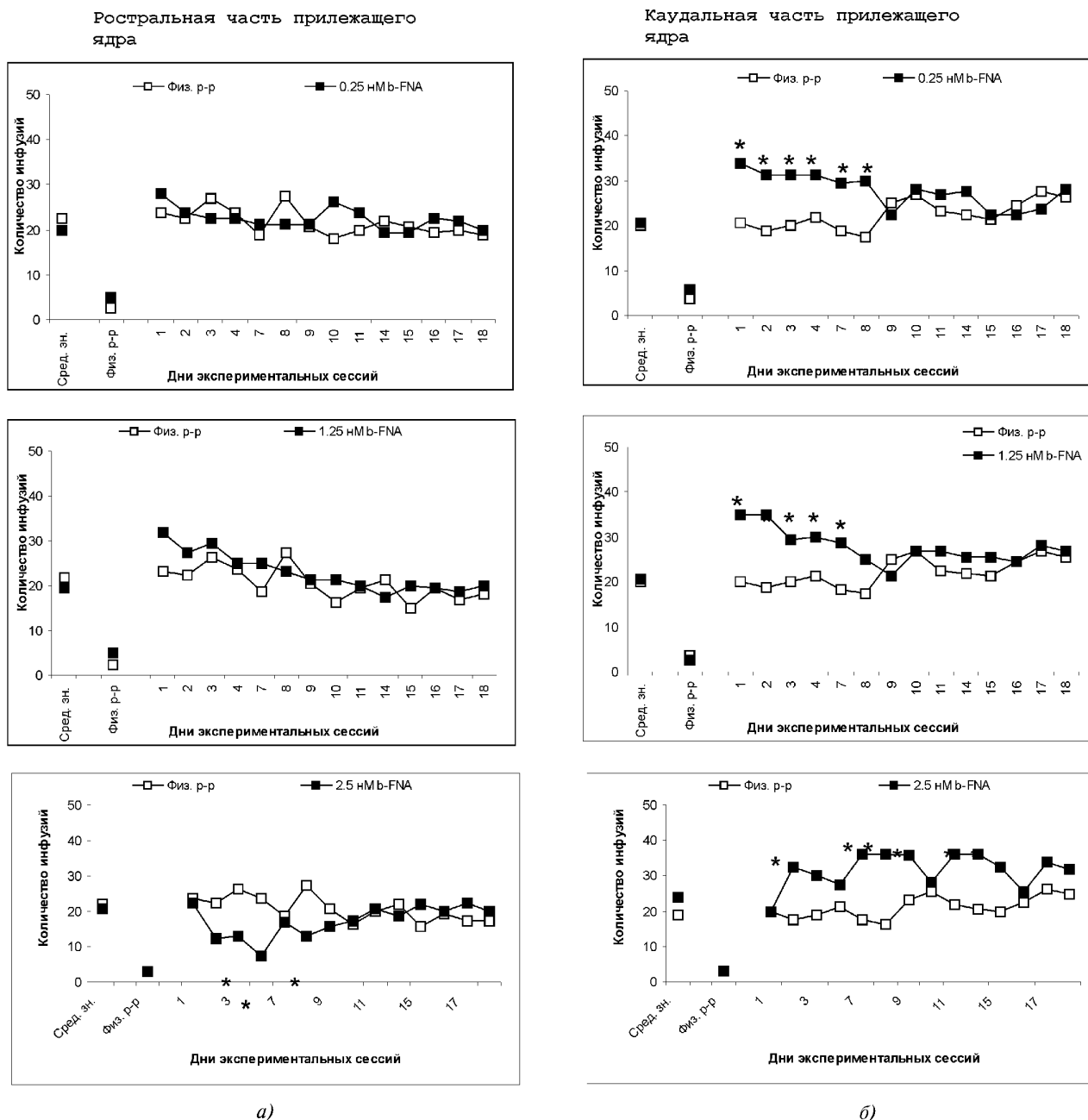


Рис. 4 (а, б). Влияние β -FNA на реакцию самовведения героина у крыс. *— $P < 0,05$ по отношению к контрольной группе

количества полученных инфузий героина на протяжении 7 дней после инъекции β -FNA [$F(14,45)=2,613$, $P=0,0075$]. Введение $1,25 \text{ nM}$ β -FNA в каудальную область прилежащего ядра оказывало сходное воздействие [$F(14,56)=3,85$, $P=0,00468$]. Введение $2,5 \text{ nM}$ β -FNA в каудальную область прилежащего ядра достоверно увеличивало количество полученных инфузий в реакции самовведения героина в 15 последовательных экспериментальных сессиях [$F(14,45)=1,506$, $P=0,049$] (рис. 4Б).

Обсуждение результатов исследования

Данные, полученные в результате настоящего исследования, впервые указывают на тот факт, что β -опиатные рецепторы каудальной области прилежащего ядра вносят наибольший вклад в реализацию положительно-подкреп-

ляющих свойств героина в реакции самовведения, по сравнению с таковыми, расположенными в ростральной области прилежащего ядра. Прилежащее ядро является сложной структурой, цитоархитектура и функциональная нейроанатомия которой изучалась довольно интенсивно [2, 3, 12, 16, 20, 22, 24]. Ростральная область прилежащего ядра занимает приблизительно одну четвертую его часть и включает в себя черты ядра и оболочки, которые располагаются каудальнее. Эфференты в ростральную область идут, преимущественно, из корковых структур и полосатого тела, а афферентные волокна имеют свои проекции в черной субстанции и вентральной покрышке. В более каудальную область прилежащего ядра эфференты приходят из вентратегментальной области и задней части полосатого тела, так же как и из некоторых корковых структур, тогда как афференты имеют свои проекции в таламусе и

миндалине. По-видимому, изменения, наблюдаемые у животных в реализации реакции самовведения героина в результате введения β -FNA, обусловлены его воздействием на μ -опиатные рецепторы описанных выше путей. Известно, что активация опиоидных рецепторов в вентратегментальной области вызывает усиление высвобождения дофамина в прилежащем ядре. Опиоидные рецепторы в прилежащем ядре ингибируют нейрональную активность в этой структуре, а большинство дофаминергических нервных окончаний в прилежащем ядре являются проекциями вентратегментальных нейронов. В каудальной области прилежащего ядра, по сравнению с его ростральной областью, имеется большее количество энкефалинергических синапсов нейронов, подтверждающих особую значимую роль каудальной области прилежащего ядра в нейрхимической модуляции этого региона эндогенными и экзогенными опиоидами [22]. Активация опиатных рецепторов нейронов каудальной области прилежащего ядра вызывает изменения в активности нейронов таламуса, миндалины и соматосенсорной коры [20, 24].

Представленные в настоящем исследовании результаты показывают, что необратимое алкилирование μ -опиатных рецепторов мозга с помощью фокального введения β -FNA является важным инструментом для изучения функциональной нейроанатомии дискретных пулов μ -опиатных рецепторов. Селективность необратимого алкилирующего эффекта β -FNA на μ -опиатные рецепторы показана в дозах от 0,25 до 2,5 нМ, которые достоверно снижали плотность μ -опиатных рецепторов и изменяли реакцию самовведения героина у крыс после их введения в каудальную область прилежащего ядра.

Таким образом, μ -опиатные рецепторы каудальной области прилежащего ядра вносят наибольший вклад в реализацию положительно-подкрепляющих свойств героина в реакции самовведения. Дальнейшее изучение функциональной активности μ -опиатных рецепторов в регионах, связанных с этой областью прилежащего ядра, таких, как миндалина и таламус, позволят оценить динамичную картину функционирования μ -опиатных рецепторов в процессах реализации положительно-подкрепляющих свойств опиатов и, в частности, героина.

Список литературы

- Adams JU, Paronis CA, Holtzman SG et al., Assessment of relative intrinsic activity of μ -opioid analgesics in vivo by using beta-funaltrexamine. *JPET*, 1990, Dec;255(3):1027–32.
- Arvidsson U, Riedl M, Chakrabarti S, Lee JH, Nakano AH, Dado RJ, Loh HH, Law PY, Wessendorf MW, Elde R. Distribution and targeting of a μ -opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *J Neurosci.*, 1995, May;15(5 Pt 1):3328–41.
- Brog JS and Zahm DS. On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neurosci.*, 1992, Oct;50(4):751–67.
- Duvauchelle CL, Fleming SM, Kornetsky C. Involvement of delta- and μ -opioid receptors in the potentiation of brain-stimulation reward. *Eur J Pharmacol.* 1996 Dec 5;316(2–3):137–43.
- Ettenberg A, Sgro S, White N. Algebraic summation of the affective properties of a rewarding and an aversive stimulus in the rat. *Physiol Behav.*, 1982, May;28(5):873–7.
- Goeders NE, Lane JD, Smith JE. Self-administration of methionine enkephalin into the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav.* 1984 Mar;20(3):451–5.
- Heyman JS, Vaught JL, Mosberg HI, Haaseth RC, Porreca F. Modulation of μ -mediated antinociception by delta agonists in the mouse: selective potentiation of morphine and normorphine by [D-Pen2,D-Pen5]enkephalin. *Eur J Pharmacol.*, 1989, Jun 8; 165(1): 1–10.
- Koob GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci.*, 1992, May;13(5):177–84.
- Liu-Chen LY and Phillips CA. Covalent labeling of μ opioid binding site by [3H] β -funaltrexamine. *Mol Pharmacol.*, 1987, Sep;32(3):321–9.
- Liu-Chen LY, Li SX, Lewis ME. Autoradiographic study of irreversible binding of [3H] β -funaltrexamine to opioid receptors in the rat forebrain: comparison with μ and delta receptor distribution. *Brain Res.*, 1991, Mar 29;544(2):235–42.
- Chen C, Xue JC, Zhu J, Chen YW, Kunapuli S, Kim de Riel J, Yu L, Liu-Chen LY. Characterization of irreversible binding of β -funaltrexamine to the cloned rat μ opioid receptor. *J Biol Chem.*, 1995, Jul 28;270(30):17866–70.
- Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.*, 1995, Jan;18(1):22–9.
- Martin TJ, Dworkin SI, Smith JE. Effects of intracerebroventricular administration of β -funaltrexamine on [3H]DAMGO binding to rat brain sections. *J Pharmacol Exp Ther.*, 1993, Oct;267(1):506–14.
- Martin TJ, Dworkin SI, Smith JE. Alkylation of μ opioid receptors by β -funaltrexamine in vivo: comparison of the effects on in situ binding and heroin self-administration in rats. *JPET*, 1995, Mar;272(3):1135–40.
- Martin TJ, Sim LJ, Selley DE, deMontis MG, Childers SR. Effects of intracerebroventricular administration of β -funaltrexamine on DAMGO-stimulated [35S]GTP- γ -S binding in rat brain sections. *Synapse*, 1997, Nov;27(3):177–82.
- Meredith GE, Ingham CA, Vroom P, Arbuthnott GW. Ultrastructural characteristics of enkephalin-immunoreactive boutons and their postsynaptic targets in the shell and core of the nucleus accumbens of the rat. *J Comp Neurol.*, 1993, Jun 8;332(2):224–36.
- Negus SS, Henriksen SJ, Mattox A, Pasternak GW, Portoghese PS, Takemori AE, Weinger MB, Koob GF. Effect of antagonists selective for μ , delta and kappa opioid receptors on the reinforcing effects of heroin in rats. *JPET*, 1993, Jun;265(3):1245–52.
- Olds ME. Reinforcing effects of morphine in the nucleus accumbens. *Brain Res.*, 1982, Apr 15;237(2):429–40.
- Paxinos G and Watson C. The rat brain in Stereotaxic coordinates, 2nd edition, Academic Press, San Diego, 1986.
- Robinson TE, Kolb B. Morphine alters the structure of neurons in the nucleus accumbens and neocortex of rats. *Synapse*, 1999, Aug;33(2):160–2.
- Rothman RB, Long JB, Bykov V, Jacobson AE, Rice KC, Holaday JW. β -FNA binds irreversibly to the opiate receptor complex: in vivo and in vitro evidence. *JPET*, 1988, Nov; 247(2):405–16.
- Svingos AL, Moriwaki A, Wang JB, Uhl GR, Pickel VM. Ultrastructural immunocytochemical localization of μ -opioid receptors in rat nucleus accumbens: extrasynaptic plasmalemmal distribution and association with Leu5-enkephalin. *J Neurosci.*, 1996, Jul 1;16(13):4162–73.
- Takemori AE, Portoghese PS. Affinity labels for opioid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 1985, 25:193–223.
- Wang H, Gracy KN, Pickel VM. μ -opioid and NMDA-type glutamate receptors are often colocalized in spiny neurons within patches of the caudate-putamen nucleus. *J Comp Neurol.* 1999 Sep 13; 412(1):132–46.
- Weeks JR. Experimental morphine addiction: Methods for automatic intravenous injections in untrained rats. *Science*, 1962, 138, 143–144.