

# Действие иммуномодуляторов на формирование экспериментальной опиатной зависимости

М.В. Старостина

Новосибирск, 21 мая 2015

# The effect of immunomodulators on the development of experimental opiate dependence

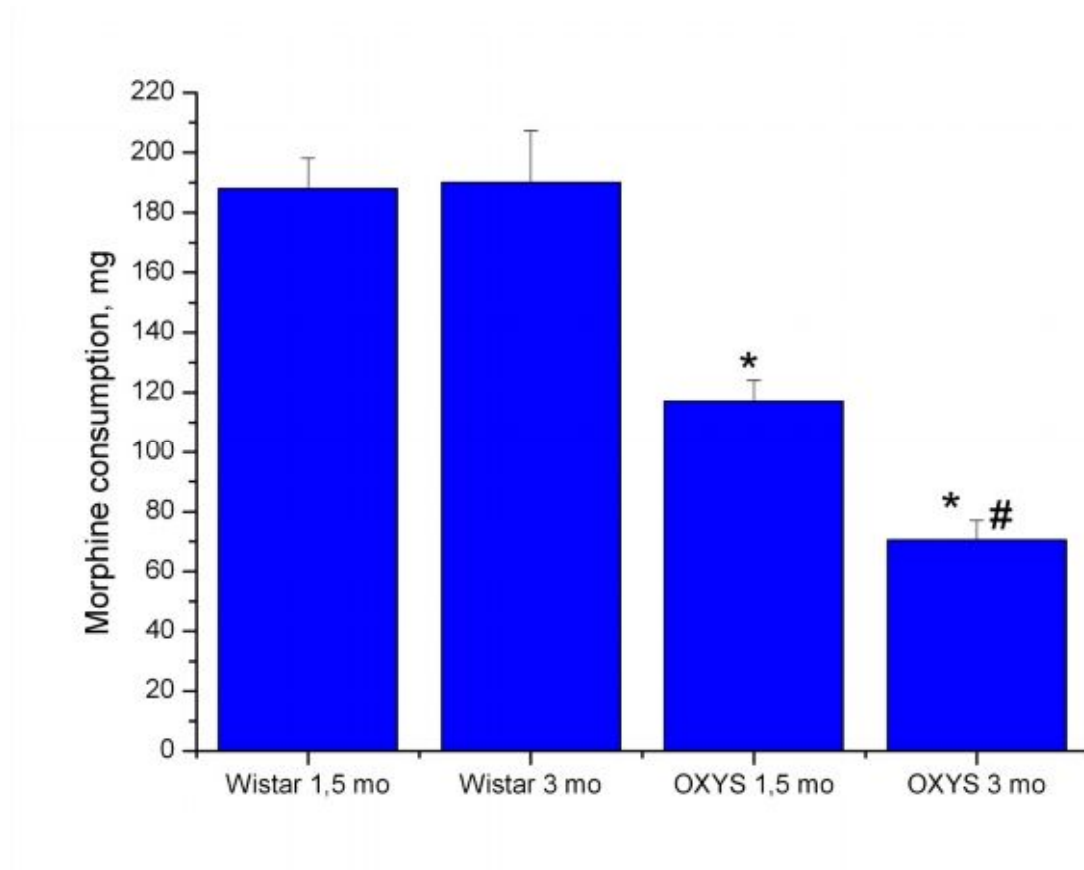
**Marina V. Starostina**

Institute of molecular biology &  
biophysics, Novosibirsk

# Characteristics of OXYS rat strain

- The OXYS rat strain was developed at the Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences (Novosibirsk), from Wistar stock. These rats were registered in the Rat Genome Database as the OXYS rat strain (<http://rgd.mcgw.edu/>) as a strain with “congenital overproduction of free radicals”.
- Since the age of 3 month – altered behavior (low locomotor activity, increased anxiety), impaired learning and memory [Loskutova, Kolosova, 2000; Kolosova et al., 2006, 2009], impaired hippocampal synaptic plasticity [Beregovoy et al., 2011], neurodegenerative changes in hippocampus, especially in CA1 and CA3 regions [Stefanova et al., 2014].
- Since the age of 3 month – impaired immune status, accelerated thymus involution [Markova et al., 2003; Obukhova et al., 2013].
- OXYS rats were used as a model of accelerated senescence, the recent data showed that this rat strain could serve a model of Alzheimer disease.

## Morphine consumption for 25 days by Wistar and OXYS rats



#- differences between 1.5 and 3 month old OXYS rats ( $p < 0.05$ )

\* - differences between OXYS and Wistar rats ( $p < 0.05$ ). No differences were found in water or sucrose consumption

# Формирование хронической опиатной зависимости у крыс Вистар и крыс OXYS

Группа животных	Проявления синдрома отмены (налоксонный тест, 2мг/кг веса, в/б)					
OXYS	стереотипное качание головы, дрожание лап, «встряхивание мокрой собаки»	стереотипное качание головы, дрожание лап, «встряхивание мокрой собаки», птоз, жевательные движения, слабо выраженные корчи	те же симптомы, но сильно выраженные корчи, диарея			
ВИСТАР	реакция отсутствует	реакция отсутствует	реакция отсутствует	стереотипное качание головы, дрожание лап, «встряхивание мокрой собаки»	стереотипное качание головы, дрожание лап, «встряхивание мокрой собаки», птоз, жевательные движения, слабо выраженные корчи	те же симптомы, но сильно выраженные корчи, диарея
	15	17	20	22	24	25
Продолжительность потребления морфина ( дни)						

# Constant light exposure

- Exposure to chronic constant light disrupt circadian rhythms and evokes stress in rodents [Honma , Hiroshige, 1978]
- The stress response of corticosterone remained constant for the first 2 weeks but increased markedly at 3 weeks [Morimoto et al., 1975; Vogel, Jensh , 1988]
- Adrenomedullin level (peptide hormone regulating HPA functions in stress) is increased in plasma with maximum at 21 day [Yuksel, 2008]
- Exposure to chronic constant light impairs spatial memory [Ma et al., 2007] and provokes anhedonia-like effects in adult male rats [ Martynhak et al., 2011]
- Chronic constant light induced lipid and protein peroxidation, increased catalase activity and decrease in the activity of antioxidant enzymes [Baydaş et al., 2001; Sopova, Zamorskii, 2009]
- Wistar and OXYS rats were submitted to constant light exposure for 20 days, tested in open field and elevated plus maze. Restoration of behavior parameters occurred in 6-7 days in Wistar and 10-14 days in OXYS rats.

## Влияние режима непрерывного освещения на поведение крыс Вистар и крыс OXYS в приподнятом крестообразном лабиринте

	Норма		Режим непрерывного освещения	
Показатель	Крысы Вистар, n=59	Крысы OXYS, n=59	Крысы Вистар, n=28	Крысы OXYS, n=16
Количество выходов в центр	<b>1,12 ± 0,13</b>	<b>0,93 ± 0,13</b>	<b>1,5 ± 0,16</b>	<b>0,69 ± 0,15</b> ●
Время пребывания в центре, сек.	<b>14,7 ± 1,9</b>	<b>13,9 ± 2,12</b>	<b>24,6 ± 2,39</b> ■	<b>4,3 ± 0,9</b> ● ■
Количество заходов в открытые рукава	<b>1,5 ± 0,12</b>	<b>1,3 ± 0,18</b>	<b>1,1 ± 0,14</b>	<b>0,56 ± 0,16</b> ■
Время пребывания в открытых рукавах, сек.	<b>38,6 ± 5,1</b>	<b>35,8 ± 5,7</b>	<b>10 ± 1,2</b> ■	<b>4,9 ± 1,36</b> ■
Количество вертикальных стоек	<b>10,17 ± 0,35</b>	<b>6,98 ± 0,38</b> ●	<b>10,25 ± 6,38</b>	<b>6,93 ± 0,6</b> ●
Количество выглядываний из закрытых рукавов	<b>3,34 ± 0,2</b>	<b>2,27 ± 0,2</b> ●	<b>3,0 ± 0,27</b>	<b>2,31 ± 0,38</b>
Количество дефекаций	<b>1,39 ± 0,21</b>	<b>1,97 ± 0,25</b>	<b>1,21 ± 0,23</b>	<b>1,81 ± 0,41</b>

Данные представлены в виде  $m \pm SE$ . Достоверность различий между группами животных оценивали с помощью статистической программы (Statistica 6, "StatSoft"), используя критерии Fisher и Neuman-Keuls.

Достоверные различия: ● – между крысами Вистар и OXYS, ■ – между нормой и режимом непрерывного освещения внутри каждой из линий;  $p \leq 0,001$

## Влияние режима непрерывного освещения на поведение крыс OXYS и крыс Вистар в открытом поле

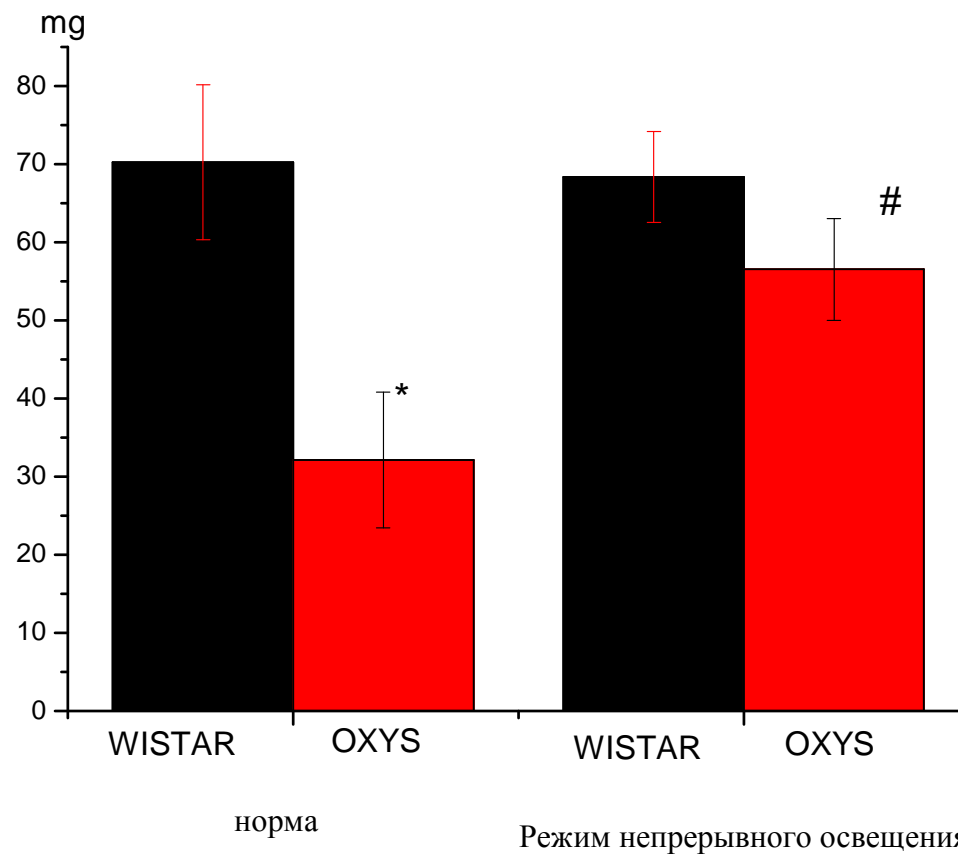
	Норма		Режим непрерывного освещения	
Показатель	Крысы Вистар N=59	Крысы OXYS N=59	Крысы Вистар N=28	Крысы OXYS N=16
Общее число пересеченных квадратов	<b>114,8 ± 7,78</b>	<b>37,15 ± 4,17</b> ●	<b>68,0 ± 2,7</b> ■	<b>28,13 ± 2,34</b> ● ■
Количество вертикальных стоек	<b>10,81 ± 0,8</b>	<b>4,71 ± 0,32</b> ●	<b>9,86 ± 0,9</b> ■	<b>3,69 ± 0,44</b> ● ■
Среднее количество дефекаций	<b>1,63 ± 0,24</b>	<b>2,92 ± 0,27</b> ●	<b>2,86 ± 0,18</b> ■	<b>3,69 ± 0,27</b>
Количество груминговых реакций	<b>4,12 ± 0,22</b>	<b>2,19 ± 0,3</b> ●	<b>3,93 ± 0,44</b>	<b>1,94 ± 0,36</b> ● ■

Данные представлены в виде  $m \pm SE$ . Достоверность различий между группами животных оценивали с помощью статистической программы (Statistica 6, "StatSoft"), используя критерии Fisher и Neuman-Keuls.

Достоверные различия: ● – между крысами Вистар и OXYS, ■ – между нормой и режимом непрерывного освещения внутри каждой из линий;  $p \leq 0,001$



## Влияние перенесенного стресса на потребление морфина Effect of endured stress on morphine consumption for 15 days



Потребление морфина за 15 дней

Достоверные различия: \* – между крысами Вистар и OXYS, # – между нормой и режимом непрерывного освещения внутри каждой из линий;  $p \leq 0,001$

## **Effect of immunomodulators on the development of chronic morphine dependence in Wistar and OXYS rats**

- Effect of immunomodulators on the development of chronic morphine dependence in Wistar and OXYS rats
- Taktivin (complex of thymic polypeptides) and Myelopid (complex of bone marrow immunoregulatory peptides and glycine) were injected intraperitoneally , 10µr/kg (Taktivin) and 100 µr/kg (Myelopid), 10 days before, at the 1<sup>st</sup> and 10<sup>th</sup> days of morphine administration.
- Control groups of rats received physiological solution or glycine (100 µr/kg).
- Behavioral test was performed at a 9<sup>th</sup> day after the first injection.
- Both immunomodulators and glycine did not affect morphine consumption in rats.

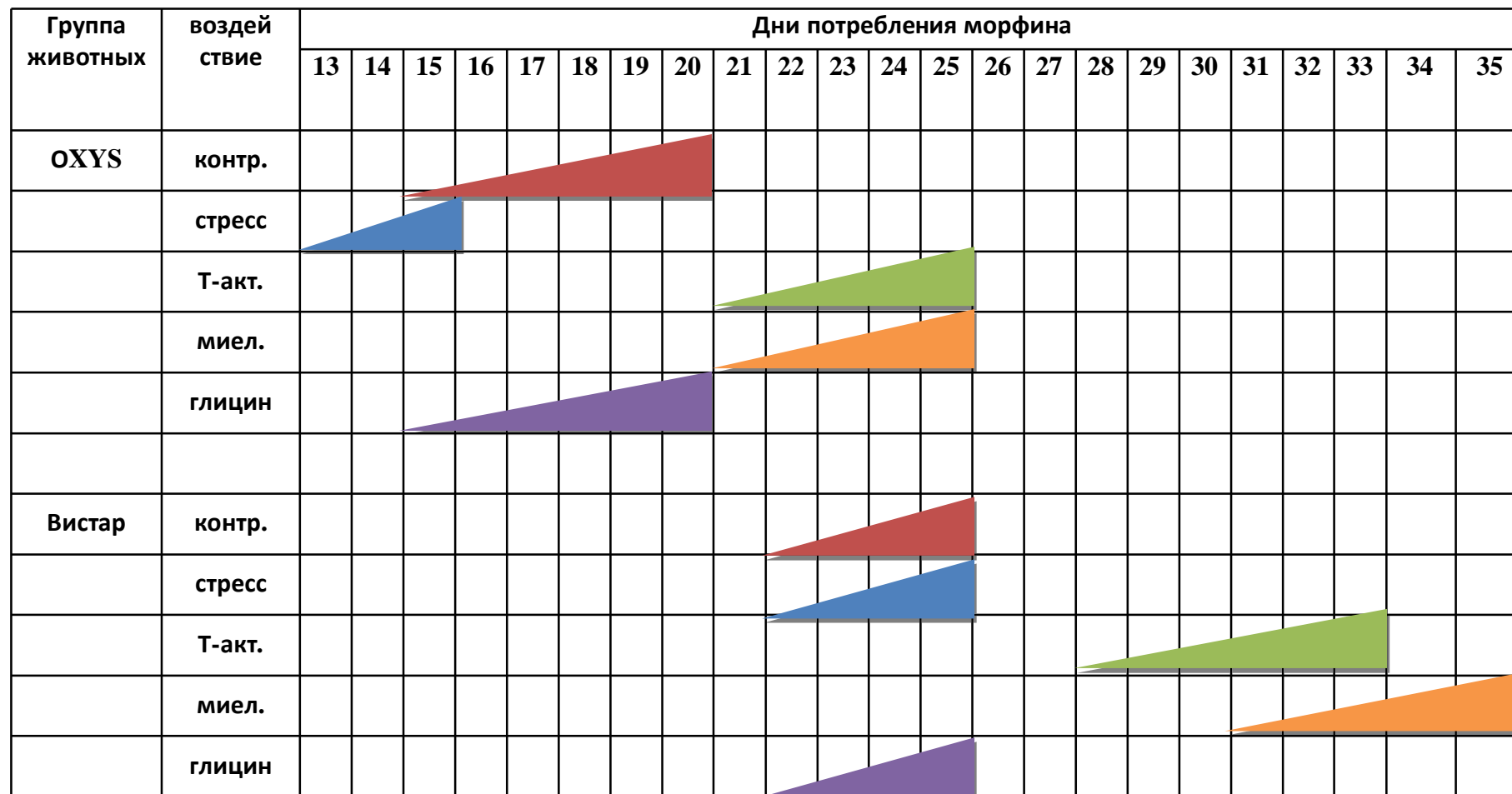
## ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ МИЕЛОПИД И Т-АКТИВИН НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС ВИСТАР И OXYS В ОТКРЫТОМ ПОЛЕ

Показатель	Вистар, Глицин	Вистар, Миелопид	Вистар, Т-активин	Вистар, Норма
Общее число пересеченных квадратов	114,8 ± 16,4	106,8 ± 19,2	109,8 ± 22,3	112,4 ± 21,5
Среднее количество дефекаций	1,67 ± 0,4	1,73 ± 0,3	1,68 ± 0,3	1,75 ± 0,2
	OXYS, Глицин	OXYS, Миелопид	OXYS, Т-активин	OXYS, Норма
Общее число пересеченных квадратов	62,7 ± 6,2 *	59,8 ± 7,9 *	51,9 ± 9,4 *	39,3 ± 8,2
Среднее количество дефекаций	1,8 ± 0,5	2,2 ± 0,5	2,4 ± 0,6	3,1 ± 0,9

Данные представлены в виде  $m \pm SE$ . Достоверность различий между группами животных оценивали с помощью статистической программы (Statistica 6, "StatSoft"), используя критерии Fisher и Neuman-Keuls.

Достоверные различия: \* – между крысами OXYS в норме и после введения препаратов;  $p \leq 0,001$

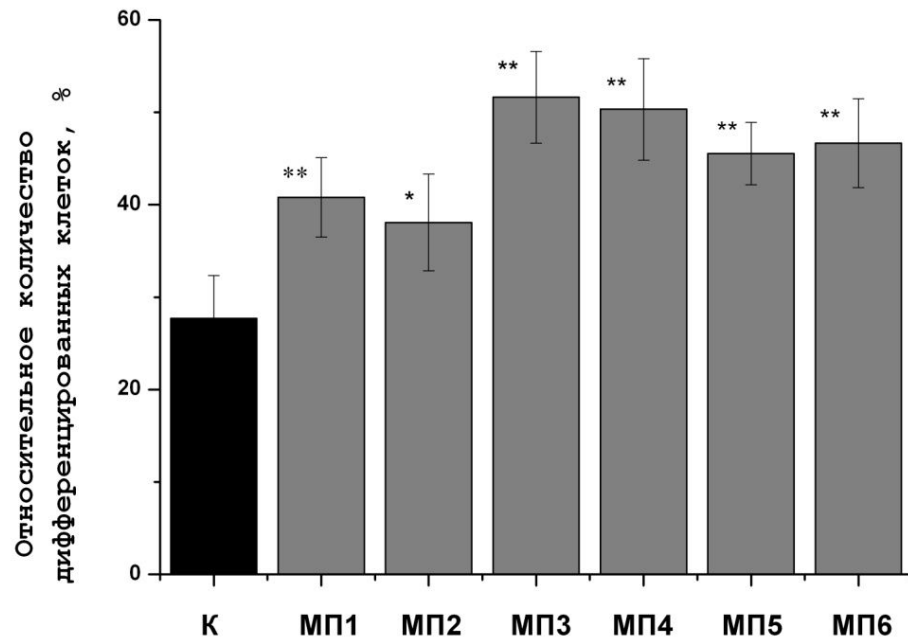
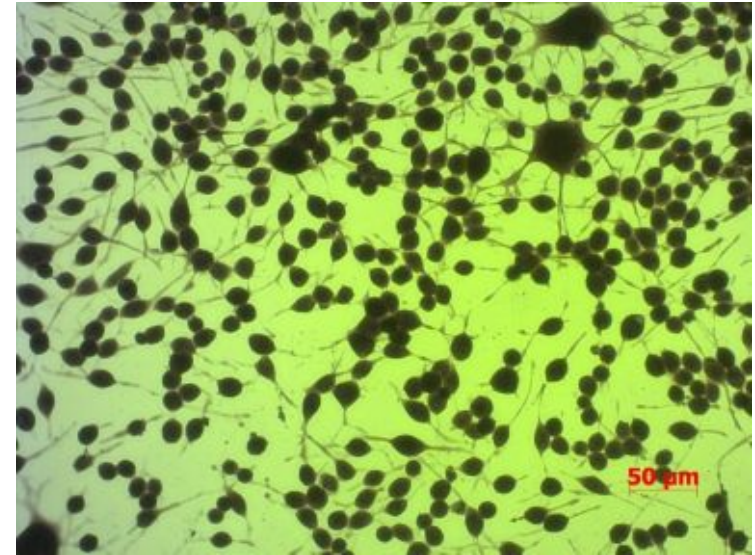
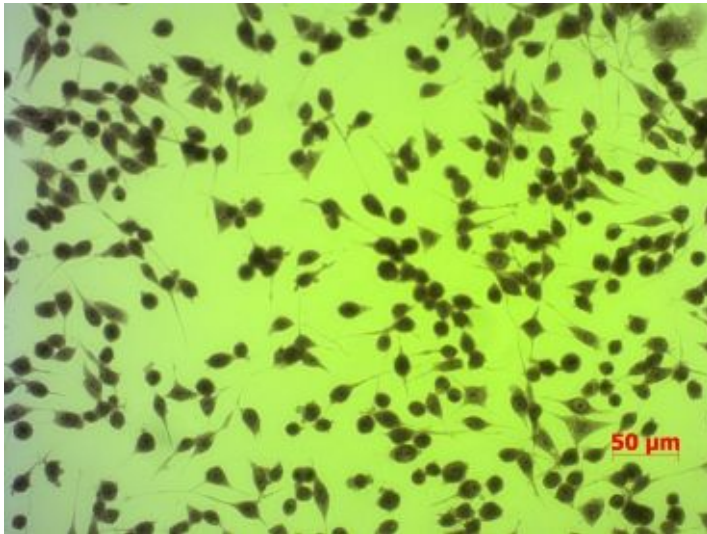
# ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯЦИИ НА ФОРМИРОВАНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ЗАВИСИМОСТИ ОТ МОРФИНА У КРЫС ВИСТАР И OXYS



- Peculiarities of the development of chronic morphine dependence in OXYS rats make this rat strain an interesting model for the studies on mechanisms of drug addiction and allow to suppose that oxidative status is a significant characteristic for drug sensitivity.
- Taktivin and Myelopid significantly prolonged the time period necessary for the development of chronic morphine dependence in Wistar and OXYS rats. This effect could result from the protection of functional activity of immune system altered by prolonged drug consumption and also from the mediated or direct action on the nervous system.
- The possibility of direct action of myelopeptides on nerve cells was studied in *in vitro* models – mouse neuroblastoma C-1300 cell culture and rat hippocampal slice culture.

## Structure and functions of myelopeptides (Petrov et al., 2000, 2005)

- MP1 – Phe\_Leu\_Gly\_Phe\_Pro\_Thr
  - MP2 – Leu\_Val\_Val\_Tyr\_Pro\_Trp
  - MP3 – Leu\_Val\_Cys\_Tyr\_Pro\_Gln
  - MP4 – Phe\_Arg\_Pro\_Arg\_Ile\_Met\_Thr\_Pro
  - MP5 – Val\_Val\_Tyr\_Pro\_Asp
  - MP6 – Val\_Asp\_Pro\_Pro
- 
- Specific binding sites for myelopeptides were identified on mouse spleen cells but the nature of receptors remains unknown.
  - MP1 – stimulates antibody production, restores humoral response in animals after radiation or cytostatic administration, regulates T-helper/T-suppressor interactions;
  - MP2 – anti-tumor effects due to restoration of T-lymphocyte functional activity suppressed by tumor toxins;
  - MP3 – stimulates antigen-presenting and cytotoxic activity of macrophages;
  - MP4 – “factor of cell differentiation”, induces differentiation in human myelomonoblastosis HL-20 and human erythroleicosis K-562 cell lines.

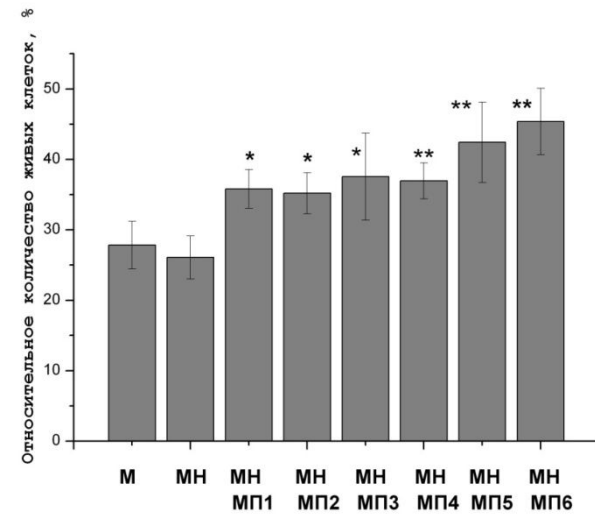
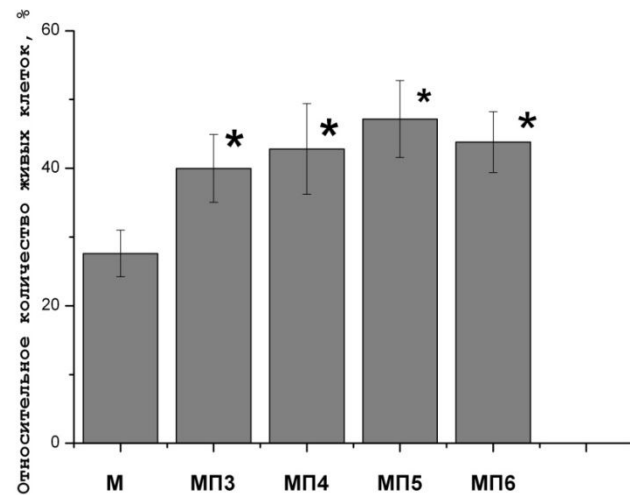
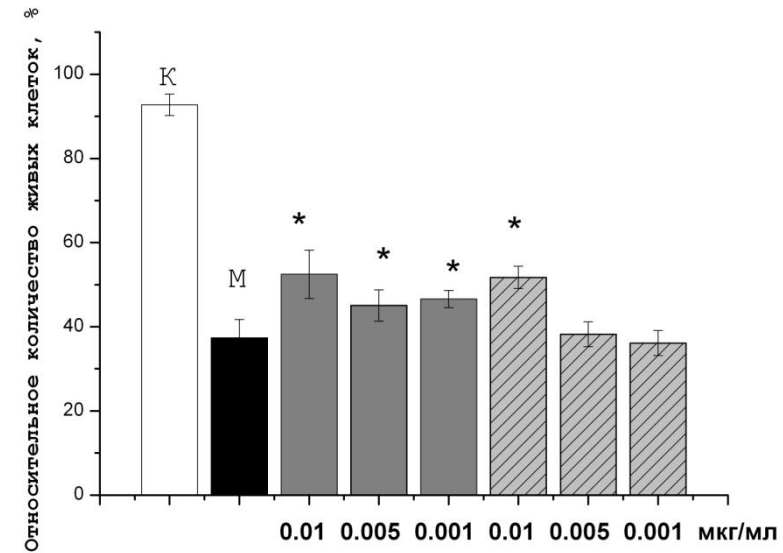
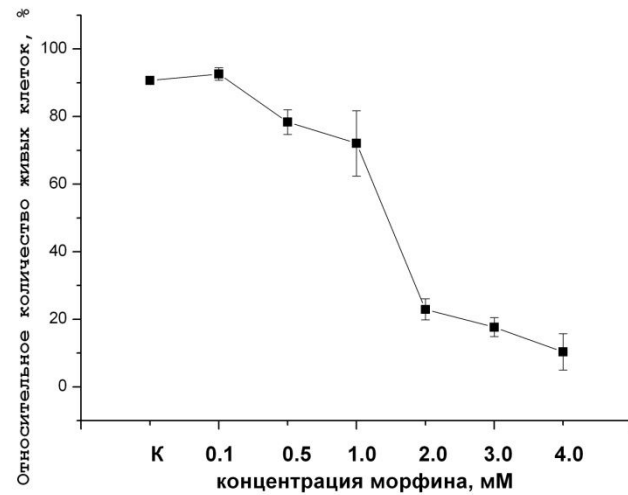


Влияние миелопептидов 1-6 на  
морфологическую  
дифференцировку клеток  
нейробластомы С-1300

\* -  $p < 0.05$

\*\* -  $p < 0.01$

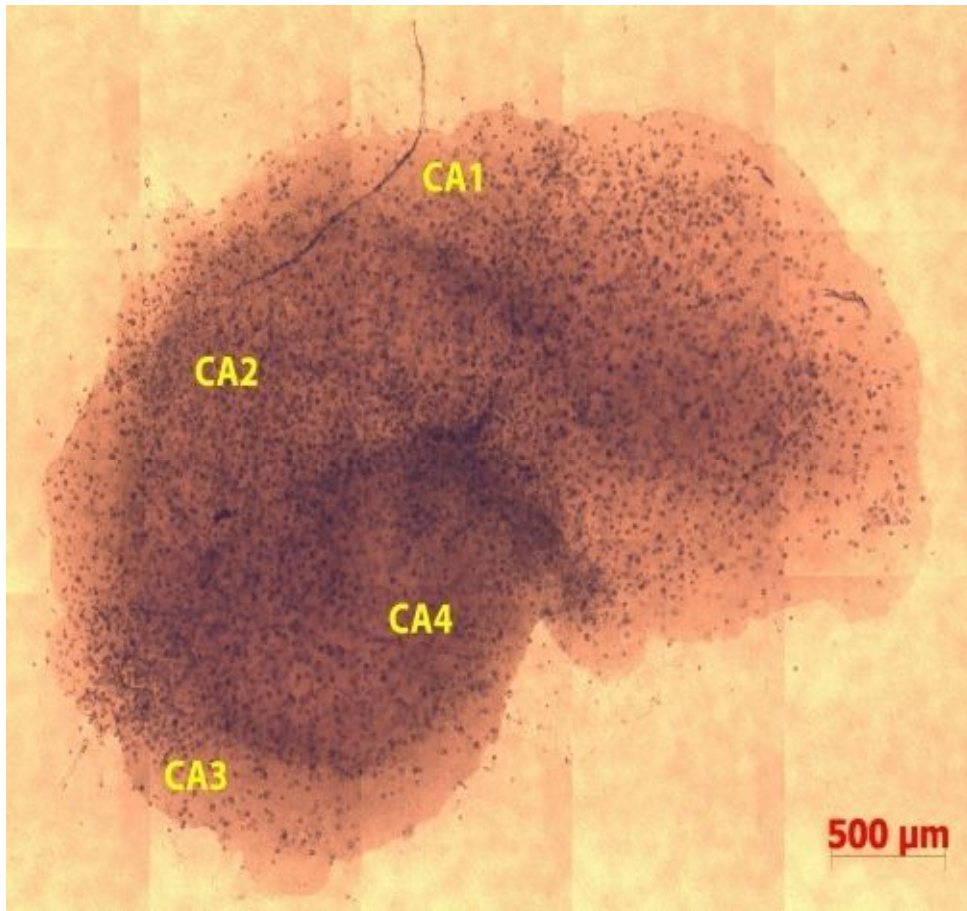
## Протекторные эффекты миелопептидов при токсическом воздействии морфина



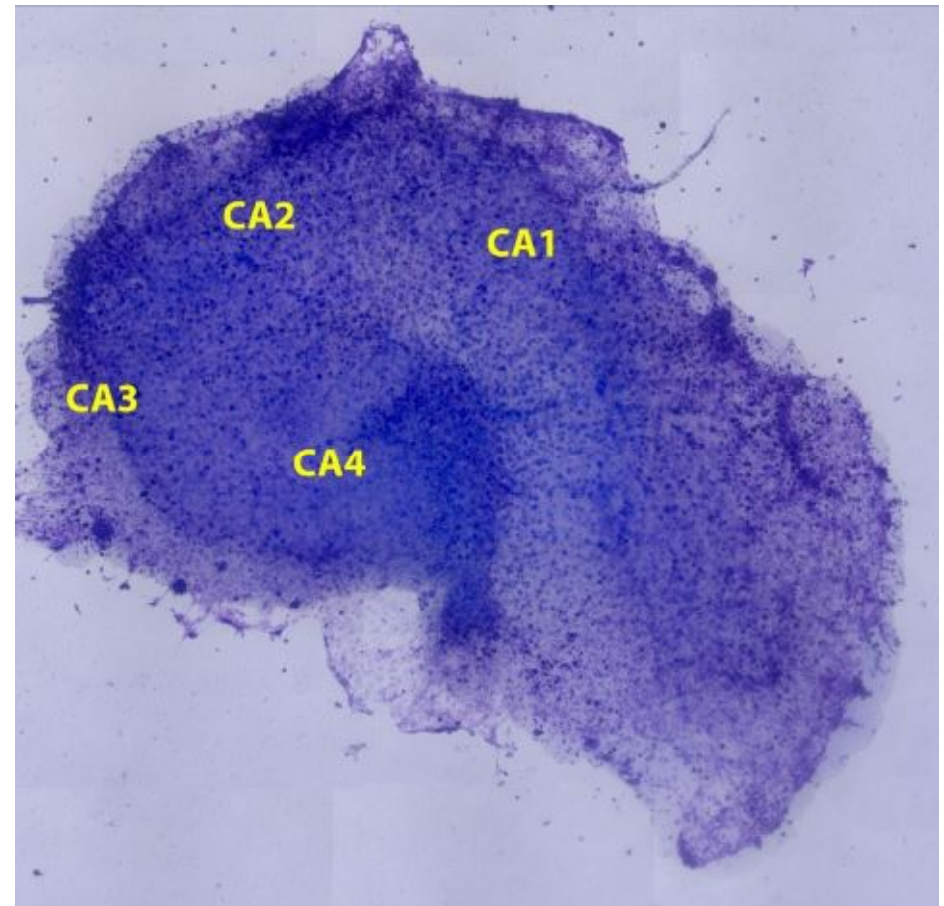
К – контрольная культура, М – культивирование с морфином, 2мМ, 48 час; МН – культивирование с морфином, 2 мМ, и налоксоном, 0,1 мМ, 48 час. \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$



Органотипическая культура гиппокампа крыс 17 дней *in vitro*  
Hippocampal slice culture 17 days *in vitro*

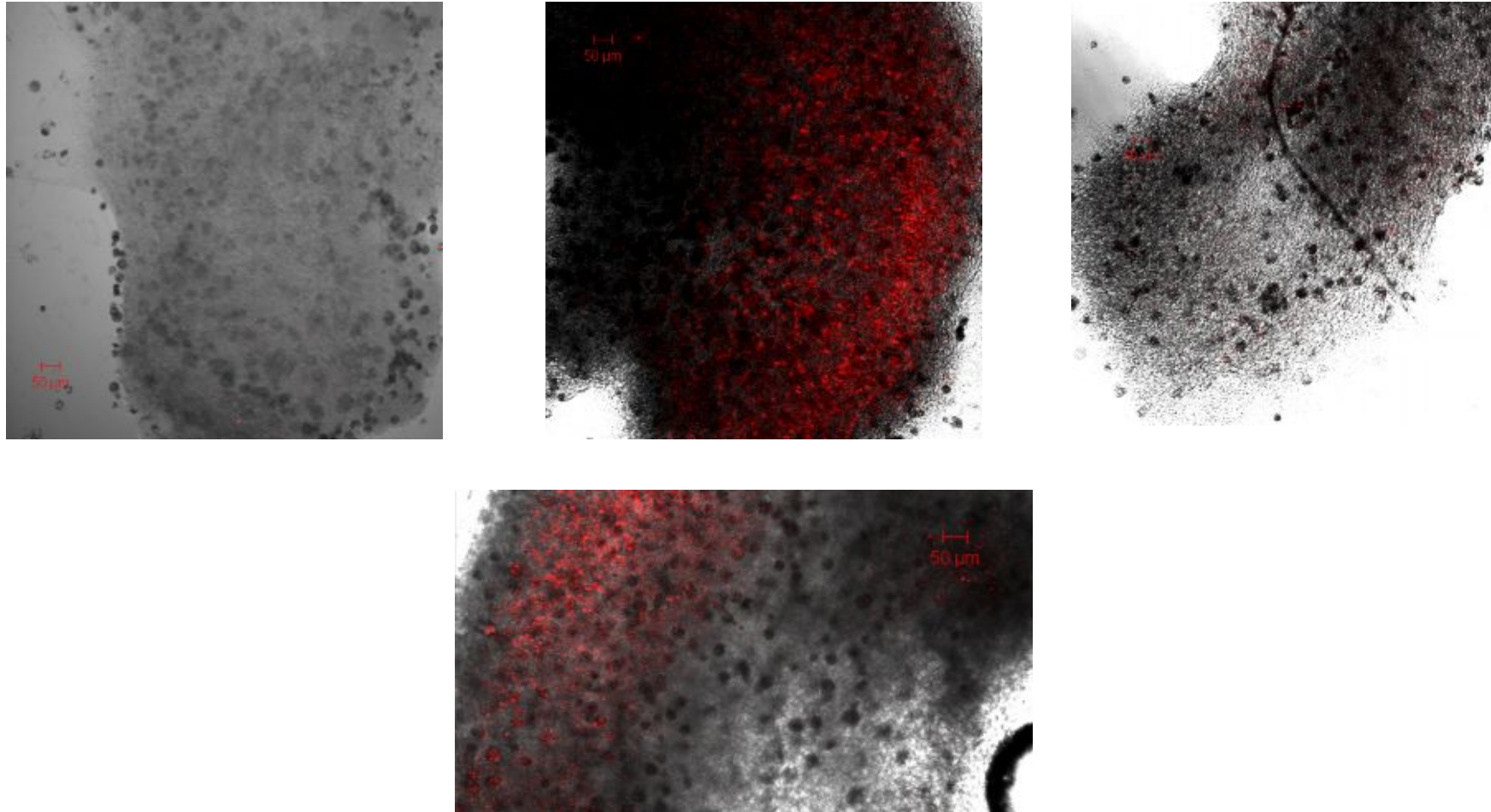


Without staining  
Без окраски



Methylene blue staining  
Окраска метиленовым синим

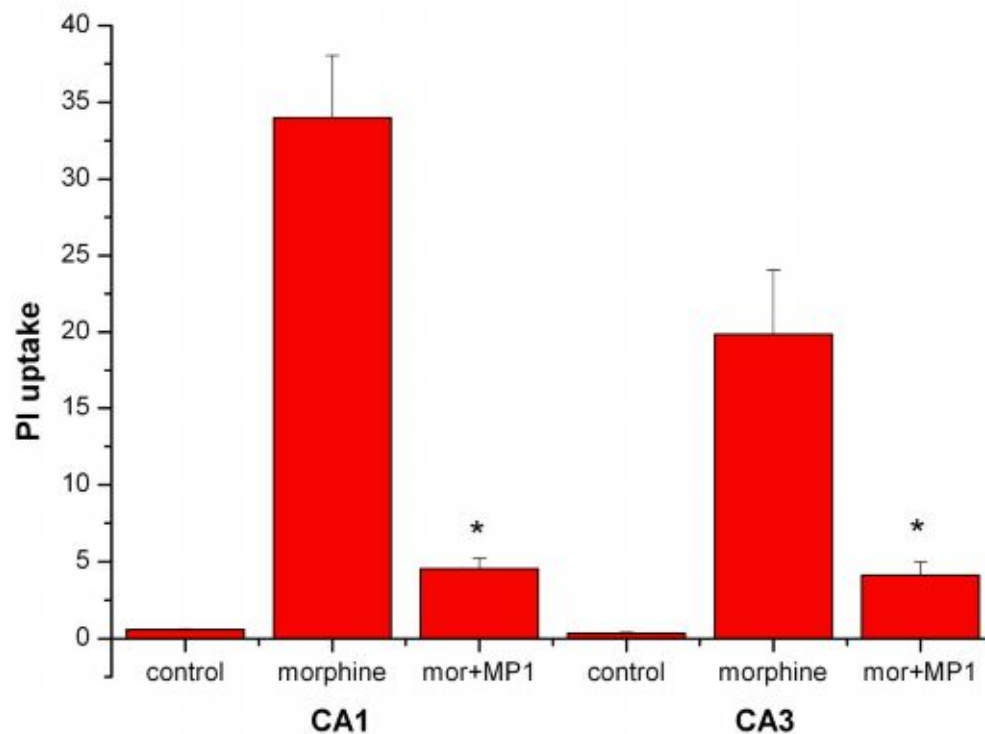
**Протекторный эффект миелопептида 1 при токсическом действии морфина на  
органотипическую культуру гиппокампа крыс**  
**Protective effect of myelopепptide 1 in hippocampal slice culture treated with toxic morphine dose**



Культивирование с морфином, 2 мМ, 72 час. МП1 – 0,01 мкг/мл. Окрашивание иодидом пропидия  
Изображение получено на конфокальном микроскопе LSM 510 (Zeiss). 2D реконструкция

## Протекторный эффект миелопептида 1 при токсическом действии морфина на органотипическую культуру гиппокампа крыс

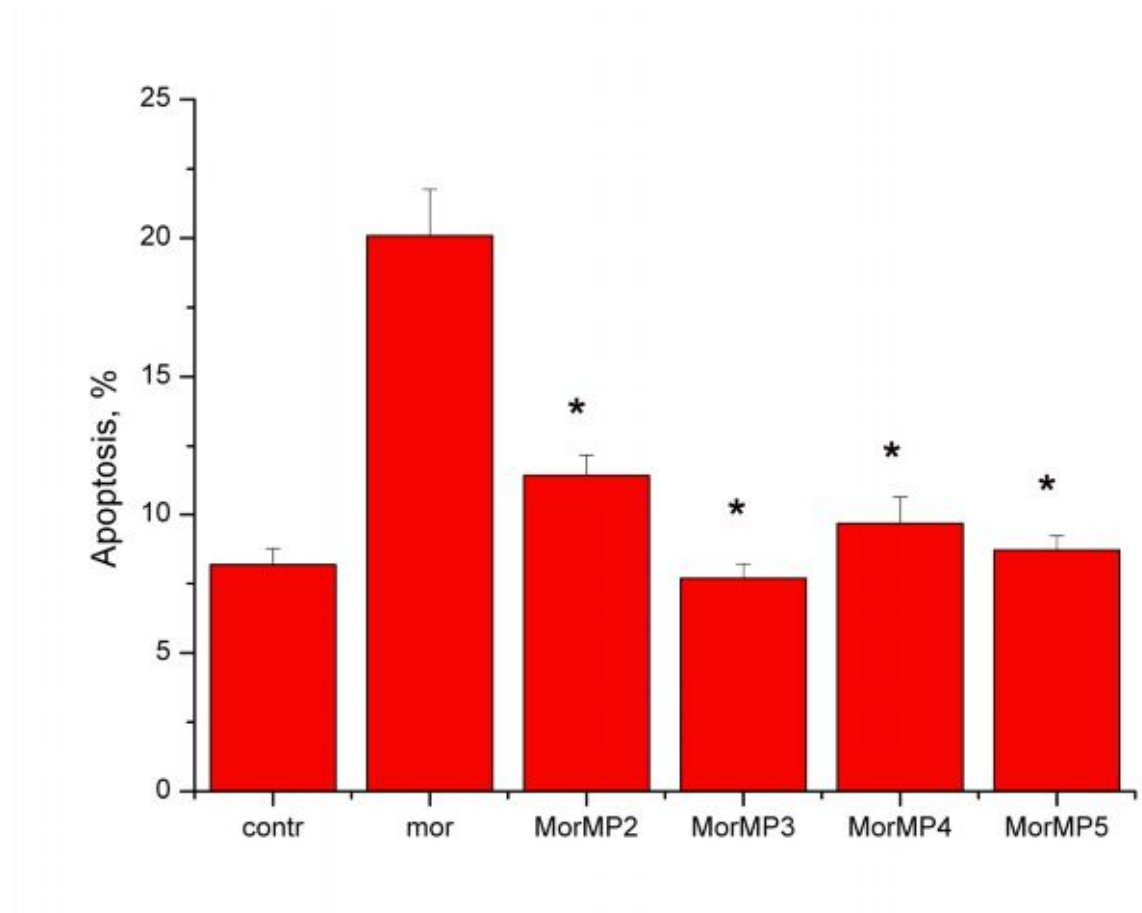
### Protective effect of myelopeptide 1 in hippocampal slice culture treated with toxic morphine dose



Интенсивность свечения иодида пропидия в областях гиппокампа CA1 и CA3 измеряли при помощи NIH Image J software (version 1.46). \* - достоверные различия между культурами при токсическом воздействии морфина и культивированными в присутствии морфина и миелопептида1 ( $p < 0,05$ ).

## Влияние миелопептидов на индуцированный морфином апоптоз клеток нейробластомы C-1300

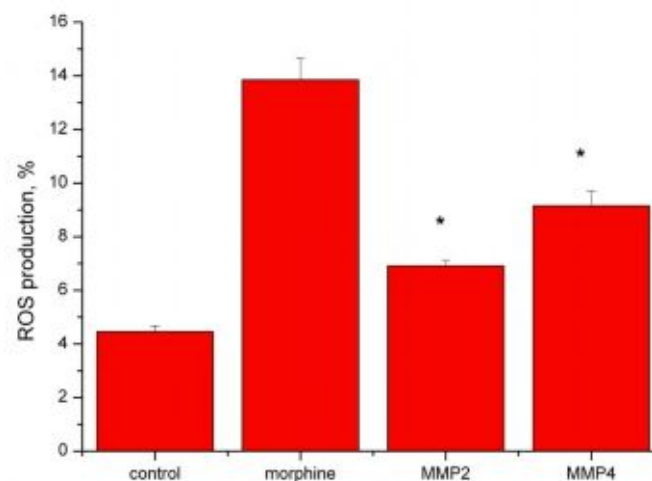
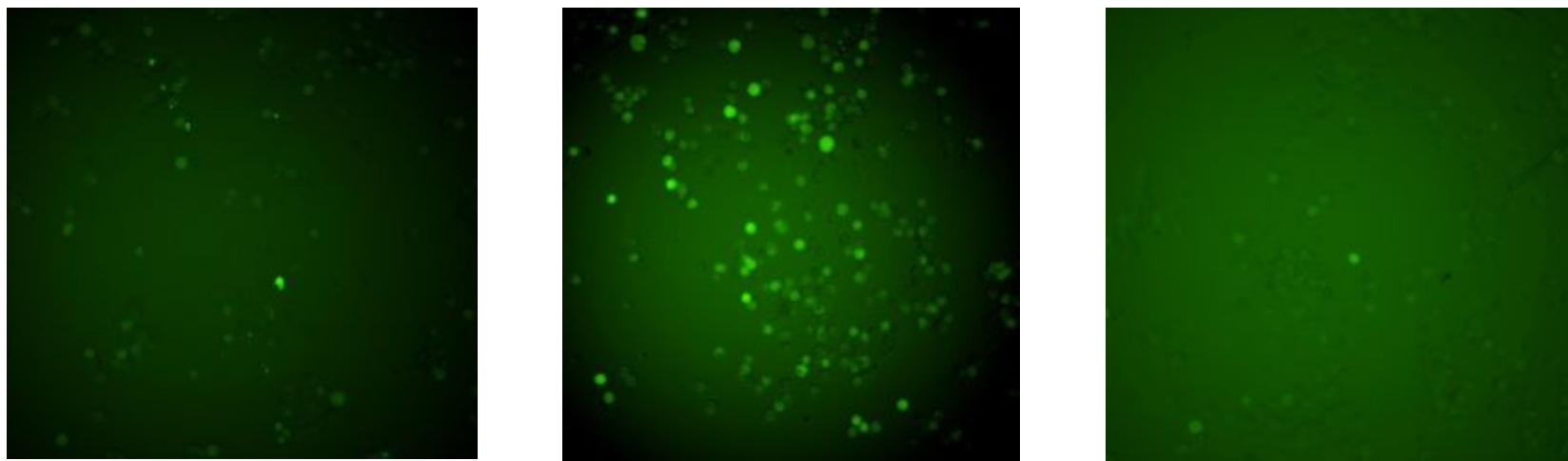
### Effect of myelopeptides on morphine-induced apoptosis in neuroblastoma C-1300 cell culture



mor – инкубация с 1 мМ морфином, 6 час; MorMP - совместная инкубация с морфином и миелопептидами (0,01 мкг/мл). \* - достоверное отличие от mor,  $p < 0,05$

## Действие миелопептидов на вызванный морфином окислительный стресс в клетках нейробластомы C-1300

Effect of myelopeptides on morphine-induced oxidative stress in neuroblastoma C-1300

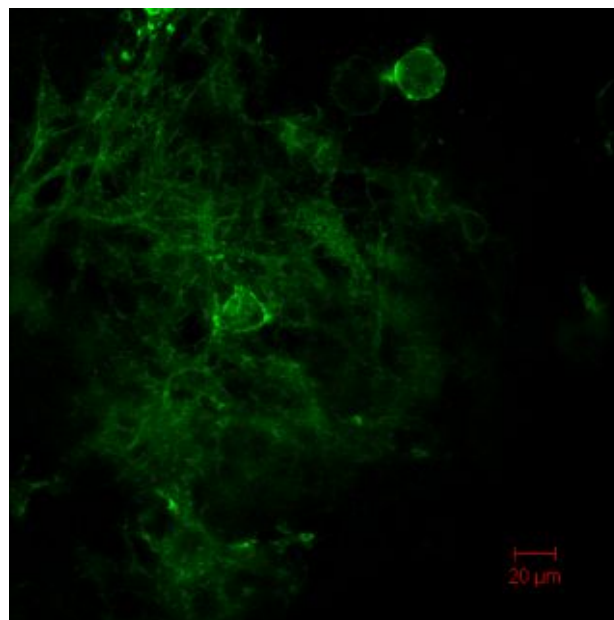
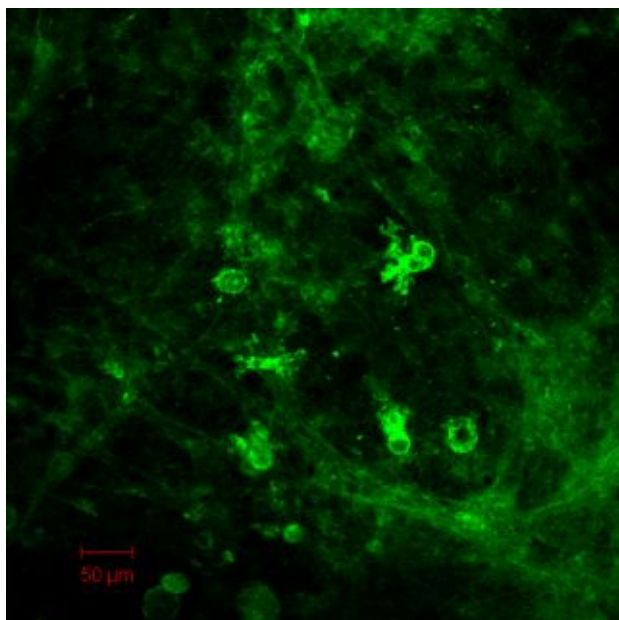
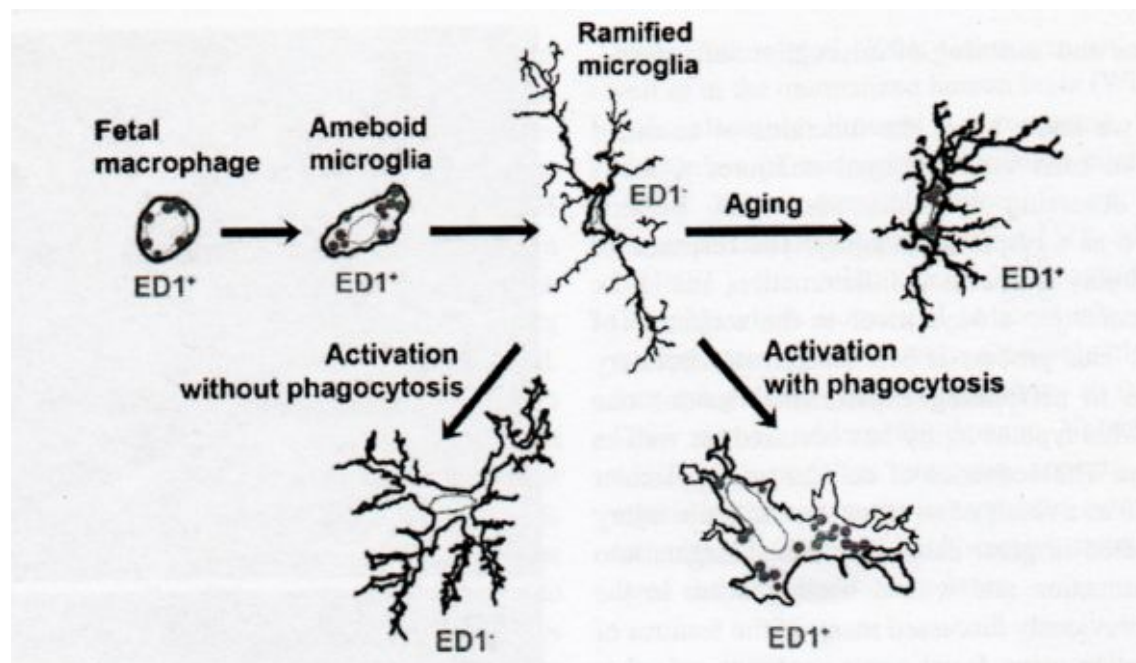
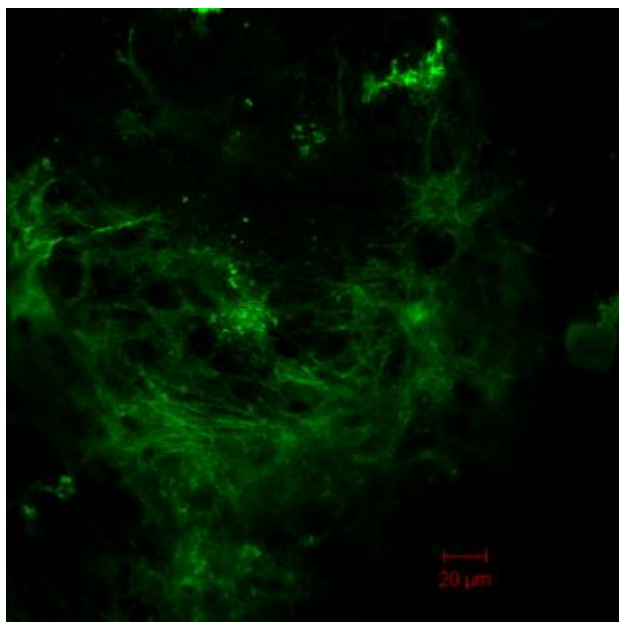


Изображения получены на клеточном анализаторе In Cell Analyzer 2200 (GE). Окрашивание DCFH-DA. Слева направо: контроль; инкубация с морфином (1 мМ, 5 час); инкубация с морфином и МП5, 0,05 мкг/мл. На гистограмме - \* -  $p < 0,05$

- Myelopeptides are able to act directly on the nerve cells and serve as neuroprotectors in morphine toxicity preventing apoptotic cell death and development of oxidative stress damage.



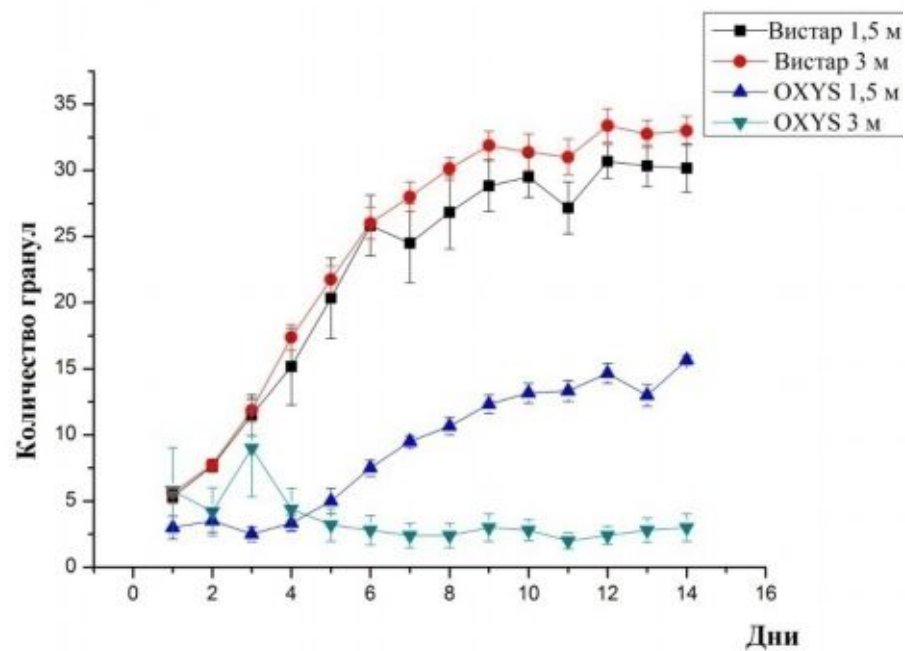
Автор выражает благодарность  
проф. Сапожникову Александру Михайловичу (Институт  
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.  
Овчинникова)  
и сотрудникам лаборатории, участвовавшим в выполнении работы:  
Михневич Н.В., Панковой Т.М., Сорокиной Н.С. и Береговому Н.А.



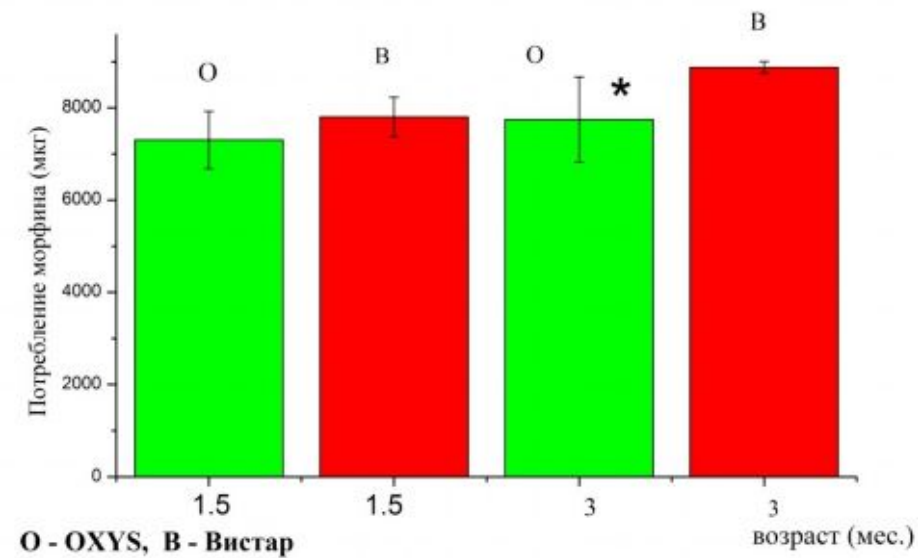
Streit W.J. and Xue Q.S.,  
2009

Активация клеток микроглии при инкубации с морфином (2 мМ, 72 час) и эффект совместной инкубации с морфином и МП2 (0,01 мкг/мл). Зона СА3 – хилус органотипической культуры гиппокампа. Окрашивание IB4- Alexa Fluor-488.



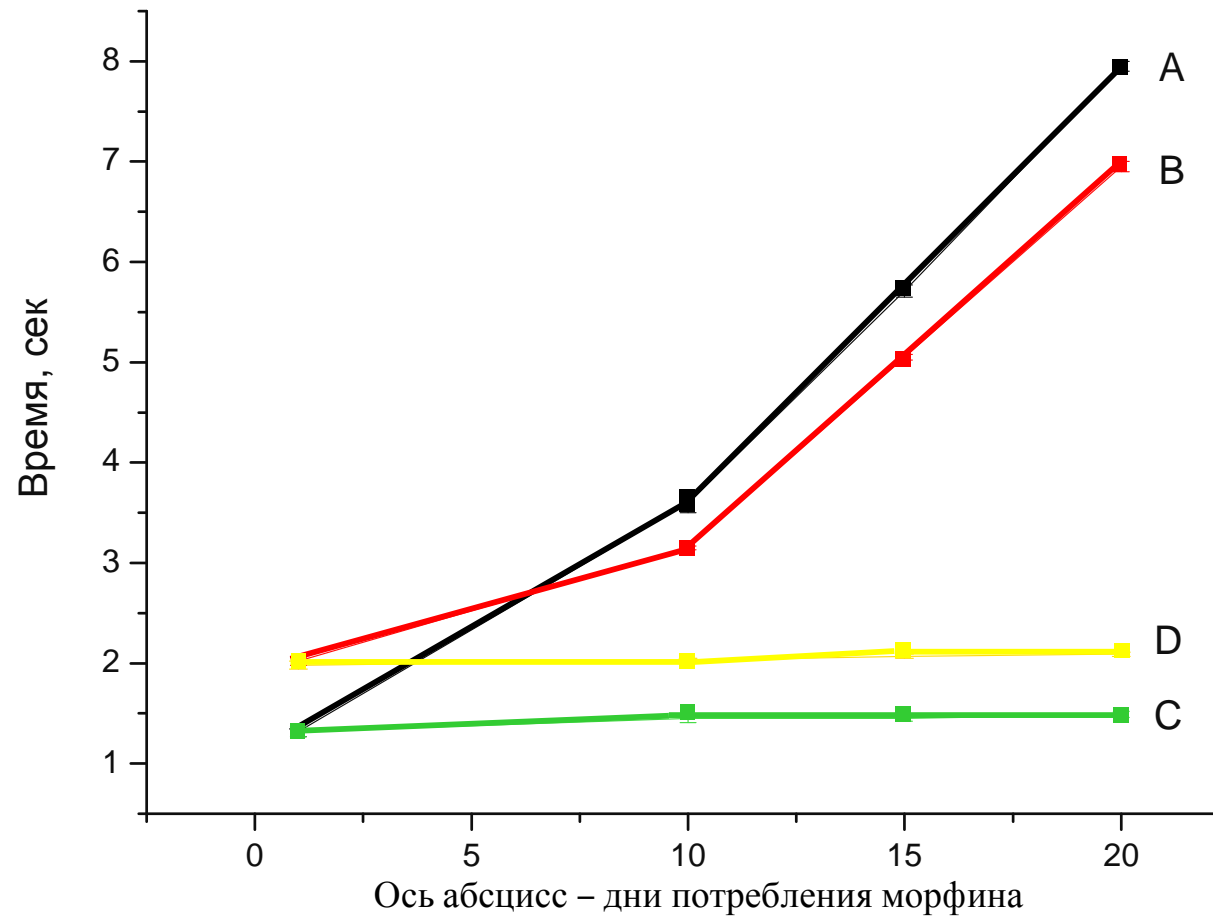


**Выработка условного  
пищевого рефлекса у  
крыс OXYS и Вистар**



**Потребление морфина  
(самовведение)**

# Определение болевой чувствительности у крыс линии OXYS и крыс Вистар в тесте «горячая пластина»



А - OXYS, В – Вистар, потребляющие морфин; С - OXYS, D - Вистар, контроль