

doi: 10.47877/0234-0623_2021_08_73

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ (ВТОРИЧНЫХ) АНТИТЕЛ К ПРОИЗВОДНЫМ МОРФИНА В КАЧЕСТВЕ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ПРОЯВЛЕНИЙ ЗАВИСИМОСТИ ОТ МОРФИНА У КРЫС

Гамалея Н.Б., Климова Т.А., Берзина А.Г., Еганов А.А., Носырев А.Е.

natgam@mail.ru

Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского
Национальный научный центр наркологии
г. Москва, Россия

Статья поступила 24.06.2021

Изучена эффективность антиидиотипических (вторичных) антител к двум производным морфина (6-гемисукцинильному и 3-О-карбоксиметильному эфирам) в качестве профилактического средства по предотвращению развития зависимости от морфина в экспериментах на крысах. До начала принудительной хронической морфинизации животные были вакцинированы антиидиотипическими антителами лошади или кролика в смеси с адъювантом Фрейнда, полученными в результате иммунизации упомянутых животных первичными антителами к тем же производным морфина. Тяжесть зависимости от морфина оценивали в тесте «Открытое поле» по появлению специфических поведенческих признаков опийной абстиненции в ответ на инъекцию налоксона гидрохлорида. В группе крыс, прошедших морфинизацию без предварительной иммунизации антиидиотипическими антителами, были отмечены поведенческие признаки, характерные для опийной абстиненции у грызунов, такие как встряхивание передними лапами и/или головой и скрежет зубами ($P < 0,05$). У крыс этой группы также наблюдалось значительно большее число прыжков и повышение как горизонтальной, так и вертикальной двигательной активности. У двух предварительно иммунизированных групп крыс отмеченные поведенческие признаки не отличались от признаков в контрольной группе животных, которым вместо инъекций антител вводили физиологический раствор и адъювант. Полученные результаты свидетельствуют о способности антиидиотипических антител к производным морфина

Об авторах:

Гамалея Наталия Борисовна – д-р мед. наук, профессор, заведующая лабораторией иммунохимии ННЦ наркологии, филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России.

Климова Татьяна Андреевна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории иммунохимии ННЦ наркологии, филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России.

Берзина Ася Григорьевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории иммунохимии ННЦ наркологии, филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России.

Еганов Александр Анатольевич – специалист лаборатории аналитической токсикологии ННЦ наркологии, филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России.

предотвращать развитие зависимости от опиатов у грызунов.

Ключевые слова: антиидиотипические антитела, вакцинация, морфин, зависимость от опиатов, профилактика, крысы.

Носырев Александр Евгеньевич – канд. хим. наук, главный специалист лаборатории аналитической токсикологии ННЦ наркологии, филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России.

ВВЕДЕНИЕ

Злоупотребление наркотиками представляет собой глобальную проблему для здоровья человека. Методы фармако- и психотерапии не всегда являются достаточными для облегчения проявлений абстинентного синдрома и снижения частоты рецидивов. К примеру, в США рецидивы в течение одного года после проведения терапии наблюдались у ~40–60% пациентов, злоупотребляющих опиатами [16]. В связи с этим в последние годы разрабатываются методы иммунотерапии как многообещающий подход к лечению болезней зависимости от наркотиков и других психоактивных веществ (ПАВ).

Иммунотерапия зависимости от наркотиков и других ПАВ включает в себя использование вакцины и специфических антител против этих веществ. Разрабатываемые за рубежом вакцины для активной иммунотерапии состоят из гаптена (производного наркотика), соединенного химическим путем с высокомолекулярным носителем (белком бактериального, вирусного или иного происхождения). Для усиления иммунного ответа такие конъюгаты смешиваются с адъювантом или адсорбируются на нем. После внутримышечного или подкожного введения вакцина стимулирует системы врожденного и приобретенного иммунитета с последующей выработкой специфических антител, которые избирательно связываются в кровяном русле с веществом-мишенью, уменьшая его проникновение в ЦНС. В результате происходит снижение физиологических эффектов, вызываемых наркотиком или иным ПАВ.

Пассивная иммунотерапия включает в себя антитела, как поли-, так и моноклональные, которые способны связывать ПАВ с высокой эффективностью. Такие антитела могут защитить пациента от действия летальной дозы употребленного наркотика или другого ПАВ.

Важными преимуществами вакцинации перед другими видами терапии зависимости от наркотиков и других ПАВ, в частности фармакотерапии, являются: 1) отсутствие аддитивных свойств, 2) отсутствие необходимости проведения предварительной детоксикации (в случае зависимости от опиатов); 3) долговременный терапевтический эффект даже в отсутствие мотивации больного на лечение, поскольку время полужизни антител в кровяном русле достаточно длительное, к тому же здесь участвует механизм иммунологической памяти; 4) меньшее количество побочных эффектов, так как ни сама вакцина, ни вырабатываемые в ответ

на ее введение антитела не проникают в ЦНС; 5) отсутствие межлекарственного взаимодействия и возможность сочетания с другими видами терапии [15].

Проведенные в мире до сегодняшнего дня клинические испытания фазы III конъюгированных вакцин первого поколения от кокаиновой и никотиновой зависимости не привели к удовлетворительным результатам и не получили одобрения Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) США [9]. Основным недостатком этих вакцин явилась ограниченная клиническая эффективность из-за больших индивидуальных различий и недостаточного уровня образующихся антител, хотя у отдельных индивидов удавалось достичь высокого уровня антител и хорошего клинического эффекта, что указывало на целесообразность примененного данного подхода. В настоящее время за рубежом ведутся исследования по усовершенствованию конъюгированных вакцин с использованием различных адъювантов и наночастиц с целью получения более высоких титров первичных антител против конъюгатов наркотика или другого ПАВ с высокомолекулярным носителем в организме вакцинированного животного [13; 17]. Результаты клинических испытаний новых вакцин от никотиновой и кокаиновой зависимостей пока не опубликованы [15].

Исследование возможности вакцинации против наркотиков опиоидного ряда, таких как морфин, героин, кодеин, оксикодон, гидрокодон, фентанил, а также психостимуляторов метамфетамина и катинонов находятся до настоящего времени еще на доклиническом этапе как в нашей стране, так и за рубежом [3; 11; 12].

Во всех зарубежных исследованиях вакцина против ПАВ состоит из производного ПАВ (гаптена), конъюгированного с высокомолекулярным носителем, и адъюванта. В литературе отсутствуют сведения о стабильности таких вакцин в организме человека. Кроме того, получение подобных вакцин связано с необходимостью использования наркотических веществ, что налагает режимные ограничения на процесс производства. С учетом этих обстоятельств нами был разработан другой подход – вакцинация антиидиотипическими (вторичными, Ат2) антителами, которые обладают структурным сходством с используемым наркотическим веществом и в организме вызывают образование третичных антител (Ат3), способных связать поступающий наркотик в кровяном русле подобно первичным антителам (Ат1). В сравнении с конъюгированными вакцинами антиидиотипические вакцины более стабильны, так как представляют собой молекулу иммуноглобулина класса G.

В наших предыдущих работах показано, что у морфин-зависимых крыс, вакцинированных Ат2 антителами, полученными в результате иммунизации мини-свиньи поликлональными Ат1 антителами кролика к двум производным морфина, снижалось потребление наркотика в условиях свободного выбора (двухпоилочный питьевой тест), а также смягчались проявления зависимости после введения налоксона гидрохлорида [3]. Это снижение было обусловлено, в частности,

как показал иммуноферментный анализ, присутствием в сыворотке крови иммунизированных животных третичных антител (Ат3), связывающих производные морфина. Нами была разработана также вакцина, основанная на Ат2 антителах к двум производным морфина (Ат2-М), аффинно выделенных из гипериммунной лошадиной сыворотки. Сыворотка была получена в результате иммунизации лошади моноклональными Ат1 антителами мыши к производным морфина [1].

Полученные антиидиотипические антитела лошади в смеси с адъювантом Фрейнда вызывали в организме иммунизированных животных (крыс, кроликов и мини-свиней) Ат3-иммунный ответ, т.е. в крови животных появлялись третичные антитела к производным морфина [2; 4]. Третичные антитела (Ат3), подобно первичным антителам (Ат1), обладают способностью блокировать активность опиатов в кровяном русле, что должно приводить к снижению проникновения опиатов в мозг и, как следствие, уменьшению их физиологических эффектов.

Цель настоящего исследования – оценка эффективности предварительной иммунизации крыс антиидиотипическими антителами к производным морфина для предотвращения развития зависимости от морфина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проводилась на 40 крысах-самцах линии Wistar (питомник лабораторных животных «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства») с соблюдением международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th ed., 2010) и Принципов надлежащей лабораторной практики (приказ Министерства здравоохранения РФ №199н от 01.04.2016, ГОСТ Р 53434-2009). Животных содержали в условиях естественного освещения при температуре 23 ± 1 °С. В качестве пищевого рациона использовали воду и гранулированный корм (ГОСТ Р 50258-92) в свободном доступе. Эксперимент проводили с ноября по февраль. Начальная масса тела крыс составляла 150–170 г.

Крысы были разделены на 5 групп по 8 животных в каждой группе. Животные группы 1 были иммунизированы аффинно-очищенными Ат2, выделенными из гипериммунной сыворотки лошади, иммунизированной моноклональными Ат1 мыши к двум производным морфина (6-гемисукцинильному и 3-карбоксиметильному эфирам). Методика иммунизации лошади и предварительного истощения лошадиной сыворотки от антимышиных антител описана нами ранее [9]. В экспериментах использовали сыворотку, полученную на 10-й день после третьей иммунизации лошади (на 60-й день от проведения первой инъекции). После истощения лошадиной сыворотки от антимышиных антител Ат2-М аффинно очищали на иммуносорбенте CNBr-сефароза 4В (Sigma-Aldrich). В качестве лиганда использовали полученные ранее поликлональные первичные антитела

кролика к тем же производным морфина (Ат1-М), конъюгированным с бычьим сывороточным альбумином.

Животные группы 2 были иммунизированы Ат2-М, полученными из сыворотки крови кролика, иммунизированного поликлональными Ат1-М свиньи. Цикл иммунизаций состоял из трех инъекций с последующей бустерной инъекцией. Схемы иммунизации кроликов и свиней описаны нами ранее [3]. На 10-й день после последней инъекции у кролика проводили забор крови из вены. Сыворотку крови истощали от антисвинных антител на иммуносорбенте CNBr-сефарозе 4В, в качестве лиганда использовали нормальный IgG свиньи.

Животные групп 3, 4 и 5 вместо инъекций иммуногенов (антиидиотипических антител) получали в те же сроки инъекции физиологического раствора и адьюванта. Животные группы 5 получили в дополнение перед тестированием в «Открытом поле» одну инъекцию налоксона гидрохлорида в дозе 1 мг/кг массы тела внутривентриально.

Крысы групп 1 и 2 получили 4 инъекции антител по схеме, представленной в табл. 1.

Таблица 1. Схема иммунизации крыс антиидиотипическими антителами к производным морфина

Номер иммунизации	Доза (мг/кг массы тела)	Способ введения
1	0,3	Подкожно в 2 точки вдоль хребта без адьюванта
через 14 дней 2	0,5	Внутримышечно в 2 точки в задние лапы с ПАФ
через 14 дней 3	0,5	Подкожно в 2 точки вдоль хребта с НАФ
через 30 дней 4 бустерная	0,5	Подкожно в 2 точки вдоль хребта с НАФ

Примечание: ПАФ – полный адьювант Фрейнда, НАФ – неполный адьювант Фрейнда.

Через 14 дней после последней (бустерной) инъекции иммуногенов крысы групп 1, 2, а также группы 3 (после инъекции физиологического раствора и адьюванта) были подвергнуты принудительной наркотизации внутривентриальными инъекциями морфина гидрохлорида в течение 5 дней. Инъекции проводили два раза в сутки в возрастающих дозах от 20 до 100 мг/кг в день в стерильном физиологическом растворе. Утром 6-го дня крысы получали одну инъекцию морфина гидрохлорида в дозе 60 мг/кг. Через 2 часа после этой инъекции крысам из групп 1, 2, 3 поочередно вводили налоксона гидрохлорид в дозе 1 мг/кг внутривентриально, после чего сразу высаживали животных в установку «Открытое поле» (диаметр круглого поля серого цвета 100 см, высота борта 40 см) с видеореги-

страцией и автоматической обработкой результатов с помощью программного обеспечения «Минотавр» (ООО «Нейроботикс», Россия). Наблюдение вели в течение 9 мин (540 с), отмечая визуально появление признаков, характерных для опийного абстинентного синдрома, таких как встряхивание передними лапами и/или головой, скрежет зубами прыжки [8; 14]. Также подсчитывали количество стоек, заглядываний в лунки, реакций чистки (груминга). После окончания тестирования в установке «Открытое поле» проводили анализ видеозаписи двигательной активности. Отдельно оценивали показатели за 1–2-ю (120 с) и 3–9-ю (420 с) минуты. Регистрировали следующие показатели: длительность активного перемещения животных по горизонтали ($T_{гор}$, с), скорость движения (м/с) и пройденное расстояние (S , м). Учитывали также число посещений центральной зоны.

Уровень третичных (At3) и четвертичных (At4) антител в сыворотках крови крыс определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа.

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов исследований проведена с помощью методов вариационной статистики с учетом характера распределения признаков с применением пакета программ Statistica 10 и Biostatistics. Характер распределения признаков оценивали с помощью критерия W Шапиро-Уилка. Оказалось, что некоторые признаки (переменные) имели нормальное распределение, тогда как распределение других отличалось от нормального ($p < 0,05$). Поэтому для всех изученных признаков вычисляли выборочное среднее \bar{x} , выборочное стандартное отклонение s , медиану (Me), нижний квартиль (25-й перцентиль) и верхний квартиль (75-й перцентиль) – в таблицах даны в скобках в виде интерквартильного размаха. Сравнение трех и более независимых групп животных по одному признаку проводили с помощью непараметрического метода – дисперсионного анализа по Краскелу-Уоллису, применяемого для количественных признаков независимо от вида распределения. При наличии значимых отличий проводили последующие множественные сравнения групп между собой по критерию Ньюмена-Кейлса [6; 7].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 2 представлена частота встречаемости исследованных поведенческих признаков, визуально наблюдаемых в течение 9 мин (540 с) после введения животным налоксона гидрохлорида и помещения их в центр поля. Как видно из представленных данных, для крыс, прошедших принудительную морфинизацию без предварительной вакцинации (группа 3), отмечена более частая регистрация таких признаков как встряхивание передними лапами и/или головой и скрежет зубами ($P < 0,05$). Для крыс этой группы также было характерно появление большого количества прыжков. Высота прыжков доходила иногда до 70 см. Многие крысы пытались выпрыгнуть из поля. Прыжки наблюдались, как правило, спустя 2 мин (120 с) после введения налоксона гидрохлорида. А

у двух предварительно иммунизированных групп крыс (группы 1 и 2) отмеченные показатели не отличались от показателей в контрольных группах (группы 4 и 5) и были близки к нулевым значениям, что свидетельствовало о защитном действии предварительной вакцинации антиидиотипическими антителами к производным морфина (Ат2-М).

Следует отметить, что в проведенном нами отдельном исследовании было показано, что восстановление двигательной активности у крыс через 2 часа после однократного введения им дозы морфина гидрохлорида, которая вызывала обездвиживание (60 мг/кг), происходит через 2–5 мин после введения налоксона гидрохлорида. Таким образом, максимальное действие налоксона по времени совпадало с развитием одного из наиболее ярких проявлений опийного абстинентного синдрома у крыс – прыжков, что может указывать на высокую специфичность этого признака.

Для крыс группы 3 было характерно также повышенное количество стоек, по сравнению с вакцинированными группами 1 и 2 и контрольными группами 4 и 5. Однако у крыс групп 1 и 2 количество стоек было снижено, по сравнению с контрольными группами (4 и 5), особенно это было выражено у крыс, вакцинированных Ат2 лошади. Отмеченный факт можно объяснить возможным недостаточным образованием третичных антител (Ат3-М) в процессе иммунизации, которые не смогли полностью нейтрализовать действие вводимого наркотика. У всех морфинизированных групп крыс наблюдалось снижение груминга (реакции чистки), что могло отражать испытываемый ими дискомфорт.

Значения показателей двигательной активности, зарегистрированные видеокамерой и автоматически обработанные программой «Минотавр», приведены в табл. 3. После введения налоксона гидрохлорида горизонтальная двигательная активность в установке «Открытое поле», зарегистрированная в течение 9 мин наблюдения (540 с), была значимо повышена у невакцинированных крыс (группа 3), в сравнении с контрольной группой 4 и вакцинированными группами 1 и 2. Увеличение горизонтальной двигательной активности в первые две минуты наблюдения после введения налоксона гидрохлорида отмечено только в группе 3. Можно заключить, что этот эффект связан с началом действия налоксона и вызван выраженной опийной абстиненцией. Повышенная горизонтальная активность у крыс группы 3 сочеталась с увеличенной скоростью перемещения по полю. Крысы с опийной абстиненцией также проходили наибольшее расстояние и чаще перебежали в центральную зону, что отражало большое количество радиальных перебежек. Приведенные выше факты свидетельствуют о сильном двигательном возбуждении крыс группы 3.

ВОПРОСЫ НАРКОЛОГИИ • № 8 (203) • 2021

Таблица 2. Частота встречаемости поведенческих признаков, оцененных визуально, в группах обследованных крыс; M (s); Me (25%–75%)

Поведенческие признаки	Исследованные группы крыс				
	1. Вакцинация Ат2 лошади + морфинизация + налоксон	2. Вакцинация Ат2 кролика + морфинизация + налоксон	3. Физ. р-р + морфинизация + налоксон	4. Физ. р-р	5. Физ. р-р + налоксон
Встряхивание передними лапами и/или головой	0,4 (0,7); 0 (0–0,5)	0,1 (0,4); 0 (0–0)	4,8 (3,5); 4,5 (2,0–7,5) * Отличие от групп 1, 2, 4, 5	0,8 (1,2); 0 (0–1,5)	0,9 (1,2); 0 (0–2,0)
Скрежет зубами	0,8 (1,4); 0 (0–1,5)	1,0 (1,2); 0,5 (0–2,0)	4,0 (2,9); 3,5 (1,5–6,0) * Отличие от групп 1, 2, 4, 5	0,1 (0,4); 0 (0–0)	0,3 (0,5); 0 (0–0,5)
Стойки	6,0 (3,5); 6,0 (4,5–8,5) * Отличие от групп 4, 5	8,8 (6,4); 6,0 (5,5–13,5)	21,3 (10,2); 20,5 (12,5–31,0) * Отличие от групп 1, 2, 4, 5	11,8 (5,0); 11,5 (9,5–14,5)	10,3 (4,1); 10,5 (8,0–13,0)
Прыжки	0,1 (0,4); 0 (0–0)	0,5 (1,1); 0 (0–0,5)	9,3 (9,4); 7,0 (1,0–16,0) * Отличие от групп 1, 2, 4, 5	0,1 (0,4); 0 (0–0)	0,1 (0,4); 0 (0–0)
Заглядывание в лунки	0,9 (0,9); 1,0 (0–1,5)	0,6 (0,9); 0 (0–1,5)	1,4 (2,3); 0 (0–2,5)	2,1 (1,6); 2,5 (0,5–3,5)	4,3 (3,2); 3,5 (2,0–7,0) * Отличие от групп 1, 2
Грумлинг	2,6 (1,8); 2,0 (1,5–4,0)	2,1 (2,0); 1,0 (1,0–4,0)	3,5 (2,9); 3,5 (1,5–4,5)	9,1 (2,9); 8,5 (7,0–10,5) * Отличие от групп 1, 2, 3	10,8 (5,4); 10 (6,5–15,0) * Отличие от групп 1, 2, 3

Примечание: * – дисперсионный анализ по Крускалу-Уоллису, множественные сравнения по критерию Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$.

Таблица 3. Значения поведенческих признаков, оцененных аппаратно-программным комплексом «Минотавр» в группах обследованных крыс; М (s); Me (25%-75%)

Поведенческие признаки	Исследованные группы крыс					
	1. Вакцинация Аг2 лошади + морфинизация + налоксон	2. Вакцинация Аг2 кролика + морфинизация + налоксон	3. Физ. р-р + морфинизация + налоксон	4. Физ. р-р	5. Физ. р-р + налоксон	
Тгор, с	1-9 мин (540 с)	123,2 (10,5) 120,5 (117,2-126,2) * Отличие от групп 3, 5	125,4 (22,1) 125,3 (117,8-139,2) * Отличие от групп 3, 5	164,2 (28,0) 156,2 (150,7-178,9) * Отличие от групп 1, 2, 4	127,9 (26,2) 131,2 (99,8-153,8) * Отличие от групп 3, 5	169,3 (23,5) 172,4 (151,7-188,6) * Отличие от групп 1, 2, 4
	1-2 мин (120 с)	59,7 (7,7) 60,3 (55,3-63,2)	63,4 (13,3) 64,8 (53,7-74,4)	80,9 (12,8) 82,2 (70,0-91,80) * Отличие от групп 1, 2, 4, 5	61,3 (7,1) 63,5 (60,0-64,7)	60,0 (14,9) 60,4 (46,8-73,4)
V _{акт} , м/с	3-9 мин (420 с)	64,3 (11,6) 64,2 (57,1-73,5) * Отличие от групп 3, 4, 5	64,7 (22,1) 66,8 (44,2-73,3) * Отличие от групп 3, 4, 5	97,5 (31,3) 89,2 (75,7-126,9) * Отличие от групп 1, 2, 5	83,9 (11,3) 79,5 (76,0-95,0) * Отличие от групп 1, 2, 5	113,3 (21,4) 111,0 (97,3-124,4) * Отличие от групп 1, 2, 3, 4
	1-9 мин (540 с)	0,244 (0,147) 0,175 (0,155-0,290) * Отличие от групп 3, 4	0,209 (0,048) 0,200 (0,180-0,255) * Отличие от групп 3, 4	0,314 (0,133) 0,295 (0,235-0,320) * Отличие от групп 1, 2, 4, 5	0,384 (0,069) 0,365 (0,350-0,450) * Отличие от групп 1, 2, 3, 5	0,143 (0,055) 0,135 (0,105-0,145) * Отличие от групп 3, 4
1-2 мин (120 с)	0,211 (0,051) 0,195 (0,170-0,255) * Отличие от групп 2, 3, 4, 5	0,274 (0,120) 0,255 (0,185-0,315) * Отличие от групп 1, 3, 4, 5	0,321 (0,140) 0,320 (0,195-0,400) * Отличие от групп 1, 2, 4, 5	0,374 (0,100) 0,405 (0,315-0,425) * Отличие от групп 1, 2, 4, 5	0,166 (0,027) 0,170 (0,150-0,185) * Отличие от групп 1, 2, 3, 4	
	3-9 мин (420 с)	0,195 (0,102) 0,165 (0,135-0,240) * Отличие от групп 2, 3, 4, 5	0,139 (0,059) 0,140 (0,090-0,195) * Отличие от групп 1, 3, 4, 5	0,326 (0,103) 0,310 (0,275-0,370) * Отличие от групп 1, 2, 5	0,329 (0,096) 0,340 (0,270-0,385) * Отличие от групп 1, 2, 5	0,230 (0,081) 0,220 (0,170-0,290) * Отличие от групп 1, 2, 3, 4

		Исследованные группы крыс				
Поведенческие признаки		1. Вакцинация Ат2 лошади + морфинизация + налоксон	2. Вакцинация Ат2 кролика + морфинизация + налоксон	3. Физ. р-р + морфинизация + налоксон	4. Физ. р-р	5. Физ. р-р + налоксон
		S, M	1-9 мин 540 с	34,6 (16,4) 28,9 (23,4-41,0) * Отличие от групп 3, 4	29,5 (6,8) 28,5 (23,4-34,8) * Отличие от групп 3, 4	55,7 (30,0) 53,2 (35,5-56,1) * Отличие от групп 1, 2, 5
	1-2 мин (120 с)	14,3 (3,4) 14,4 (11,3-17,6) * Отличие от групп 3, 4	17,7 (6,2) 16,3 (13,9-20,2) * Отличие от групп 3, 4	26,9 (13,5) 21,2 (17,8-33,1) * Отличие от групп 1, 2, 5	23,1 (6,3) 22,1 (20,0-27,1) * Отличие от групп 1, 2, 5	13,9 (5,2) 11,8 (10,6-15,1) * Отличие от групп 3, 4
	3-9 мин (420 с)	17,5 (7,7) 15,8 (12,3-22,1) * Отличие от групп 2, 3, 4, 5	16,4 (7,1) 18,3 (9,1-21,4) * Отличие от групп 1, 3	35,8 (17,0) 32,3 (22,8-46,8) * Отличие от групп 1, 2	30,6 (8,3) 31,7 (29,1-36,5) * Отличие от групп 1	25,1 (15,0) 18,0 (15,7-31,7) * Отличие от групп 1
N посе- щений центральной зоны	1-9 мин (540 с)	4,1 (1,6) 4,0 (3,0-5) * Отличие от групп 2, 3	5,4 (1,8) 5,0 (4,0-7,0) * Отличие от групп 1, 3, 4, 5	7,9 (4,2) 6,0 (5,5-10,5) * Отличие от групп 1, 2, 4, 5	2,8 (1,0) 3,0 (2,0-3,5) * Отличие от групп 2, 3	3,1 (1,6) 2,5 (2,0-5,0) * Отличие от групп 2, 3
	1-2 мин (120 с)	3,4 (0,9) 3,0 (3,0-4,0)	3,4 (1,8) 3,0 (2,0-5,0)	3,0 (1,5) 3,5 (1,5-4,0)	2,5 (1,0) 2,0 (1,5-3,0)	1,9 (1,0) 2,0 (1,0-2,0)
	3-9 мин (420 с)	1,8 (2,4) 1,0 (0-2,5)	2,1 (2,2) 2,0 (0,5-2,5)	6,5 (4,3) 5,0 (3,5-11,0) * Отличие от групп 1, 2, 4, 5	0,8 (0,7) 1,0 (0,0-1,0)	1,6 (1,7) 1,5 (0,0-3,0)

Примечание: * – дисперсионный анализ по Крускалу-Уоллису, множественные сравнения по критерию Ньюмена-Кейлса, $p < 0,05$.

В вакцинированных группах 1 и 2 в первые 2 мин (120 с) наблюдения после введения налоксона двигательная активность не отличалась от групп 4 и 5. Однако в последующие 7 мин (420 с.) наблюдения горизонтальная двигательная активность в иммунизированных группах оказалась сниженной по сравнению со всеми другими группами. Это указывает на ее более быстрое затухание и может быть связано как с влиянием самой вакцинации, так и с недостаточным количеством Ат3 в крови для предотвращения действия больших доз морфина.

После тестирования в тесте «Открытое поле» крыс декапитировали и собирали кровь для определения титра третичных (Ат3) и четвертичных (Ат4) антител к производным морфина. Для определения Ат3-М использовали непрямой вариант ИФА: в лунках полистирольного планшета для ИФА сорбировали 2-фенилазо-производное морфина, конъюгированное с лизоцимом. Реакцию проявляли антикрысиными IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma). Для выявления Ат4-М применяли «сэндвич»-вариант ИФА: на планшете сорбировали первичные моноклональные антитела к производным морфина, а проявляли реакцию теми же антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (собственного производства). Третичные антитела (Ат3-М) были выявлены в вакцинированных группах в титрах от 1:100 до 1:1600, однако не у всех крыс. Это может быть объяснено тем, что Ат3-М связывали вводимый животным морфин в кровяном русле, а примененный вариант ИФА мог выявлять только свободные антитела. Кроме того, у большинства крыс вакцинированных групп также были обнаружены антитела четвертого порядка (Ат4), которые образуются в ответ на появление Ат3 антител. Титры таких антител варьировали у разных крыс от 1:60 до 1:240, что ожидаемо для антител более высокого порядка. Как мы показали ранее, Ат4-М обладают морфиноподобным действием на опиатные рецепторы [5]. С этим фактором также может быть связано ослабление проявлений абстинентного синдрома у крыс, иммунизированных Ат2-М.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования подтвердили возможность предотвращать проявления зависимости от опиатов у грызунов предварительной вакцинацией антиидиотипическими (Ат2) антителами к производным морфина, в ответ на введение которых в организме иммунизированных животных образуются третичные антитела (Ат3). Такие антитела способны связывать наркотик в кровяном русле, препятствовать его проникновению в мозг и ослаблять тем самым действие наркотика. О снижении признаков синдрома отмены после введения антагониста опиатных рецепторов налоксона гидрохлорида свидетельствовало практически полное отсутствие у морфинизированных крыс, прошедших предварительную иммунизацию Ат2-М антителами, специфических признаков опийной абстиненции: встряхивания передними лапами и/или головой, скреже-

та зубами, прыжков, а также отсутствие резко выраженного двигательного возбуждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берзина А.Г., Гамалея Н.Б., Сергеева В.Е., Трофимов А.В., Кротов Г.И., Ульянова Л.И. Получение поликлональных и моноклональных антител к двум производным морфина // Вопросы наркологии. – 2016. – №11-12. – С. 39–53.
2. Берзина А.Г., Ульянова Л.И., Гамалея Н.Б., Климова Т.А., Трофимов А.В., Станкова Н.В. Особенности биологических свойств антиидиотипических и третичных антител к двум производным морфина // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т. 13 (22). – №2. – С. 162–164. – doi: 10.31857/S102872210006436-4.
3. Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Ульянова Л.И. Методологические основы создания вакцины для иммунотерапии зависимости от опиатов // Вопросы наркологии. – 2017. – №4-5. – С. 23–56.
4. Гамалея Н.Б., Климова Т.А., Берзина А.Г., Ульянова Л.И., Фокин Ю.В., Капанадзе Г.Д. Оценка болевой чувствительности крыс, иммунизированных экспериментальной антиидиотипической вакциной от опиатной зависимости // Наркология. – 2018. – №8. – С. 61–66. – doi: 10.25557/1682-8313.2018.08.61-66.
5. Гамалея Н.Б., Ульянова Л.И., Берзина А.Г., Климова Т.А. Возможный механизм терапевтического действия вакцинации антиидиотипическими антителами к производным морфина при опиатной зависимости в эксперименте у крыс // Вопросы наркологии. – 2020. – №6. – С. 36–47. – doi: 10.47877/0234-0623_2020_6_36.
6. Гланц С. Медико-биологическая статистика / пер. с англ. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: Медиа Сфера, 2003. – 305 с.
8. Судаков С.К., Борисова Е.В., Русаков Д.Ю. Метод количественной оценки синдрома отмены у морфин-зависимых крыс // Эксперим. и клинич. фармакол. – 1994. – Т. 57. – №2. – С. 60–63.
9. Трофимов А.В., Атанесян В.А., Ищенко А.М., Карabanова Е.А., Рак А.Я., Симбирцев А.С., Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Станкова Н.В., Капанадзе Г.Д., Ульянова Л.И., Климова Т.А. Получение поликлональных и моноклональных антиидиотипических антител к морфин-специфическим иммуноглобулинам // Медицинская иммунология. – 2020. – Т. 22. – №1. – С. 187–196. – doi: 10.15789/1563-0625-POP-1658.
10. Bremer P.T., Janda K.M. Conjugate vaccine immunotherapy for substance use disorder // Pharmacol. Rev. – 2017. – Vol. 69. – P. 298–315. – doi: 10/1124/pr.117.013904.
11. Bremer P.T., Schlosburg J.E., Banks M.L., Steele F.R., Zhou B., Poklis J.L., Janda K.D. Development of a clinically viable heroin vaccine // J. Am. Chem. Soc. – 2017. – Vol. 139. – N25. – P. 8601–8611. – doi: 10.1021/jacs.7b03334.
12. Hwang C.S., Bremer P.T., Wenthur C.J., Ho S.O., Chiang S., Ellis B., Zhou B., Fujii G., Janda K.D. Enhancing efficacy and stability of an antiheroine vaccine: examination of antinociception, opioid binding profile, and lethality // Mol. Pharm. – 2018. – Vol. 15. – N3. – P. 1062–1072. – doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00933.
13. Kinoshita A., Olson M.E., Natori Y., Janda K.M. Efficient syntheses of cocaine vaccines and their in vivo evaluation // ACS Med. Chem. Lett. – 2018. – Vol. 9. – P. 411–416. – doi: 10.1021/acsmchemlett.8b00051.
14. Nakagawa T., Minami M., Katsumata S., Ienaga Y., Satoh M. Suppression of naloxone-precipitated withdrawal jumps in morphine-dependent mice by stimulation of prostaglandin EP₃ receptor // Br. J. Pharmacol. – 1995. – Vol. 116. – N6. – P. 2661–2666. – doi: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb17223.x.

15. Pravetoni M., Comer S.D. Development of vaccines to treat opioid use disorders and reduce incidence of overdose // *Neuropharmacology*. – 2019. – Vol. 158. – Pt. 2. – doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.06.001.
16. Xiaoshan T., Junjie Y., Wenqing W., Yunong Z., Jiaping L., Shanshan L., Kutty Selva N., Kui C. Immunotherapy for treating methamphetamine, heroin and cocaine use disorders // *Drug Disc Today*. – 2020. – Vol. 25. – N3. – P. 610–619. – doi: 10.1016/j.drudis.2019.07.009.
17. Zhao Z., Harris B., Hu Yun., Harmon T., Pentel P.R., Ehrich M., Zhang C. Rational incorporation of molecular adjuvants into a hybrid nanoparticle-based nicotine vaccine for immunotherapy against nicotine addiction // *Biomaterials*. – 2018. – Vol. 155. – P. 165–175. – doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.11.021.

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF ANTI-IDIOTYPIC (SECONDARY) ANTIBODIES TO MORPHINE DERIVATIVES AS PROPHYLACTIC AGENTS FOR PREVENTING MORPHINE DEPENDENCE IN RATS

Gamaleya N.B., Klimova T.A., Berzina A.G., Eganov A.A., Nosyrev A.E.

V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology
National Scientific Research Centre on Addictions
Moscow, Russia

The effectiveness of anti-idiotypic (secondary) antibodies to two derivatives of morphine (6-hemisuccinyl and 3-O-carboxymethyl ethers) as an agent to prevent the development of morphine dependence was studied in experiments on rats. Prior to the start of forced chronic morphinization, the animals were vaccinated with horse or rabbit anti-idiotypic antibodies mixed with Freund's adjuvant, obtained as a result of immunization of the above mentioned animals with primary antibodies to the same morphine derivatives. The severity of morphine dependence was assessed in the open field test by the appearance of specific behavioral signs of opiate withdrawal in response to naloxone hydrochloride injection. In the group of rats that underwent morphinization without prior immunization with anti-idiotypic antibodies, behavioral signs of opiate withdrawal in rodents were noted, such as shaking the front paws and/or head and teeth grinding ($P < 0.05$). In rats of this group, a significantly greater number of jumps and an increase in both horizontal and vertical locomotor activity were also observed. In two pre-immunized groups of rats, the observed behavioral signs did not differ from those in the control group of animals, which were injected with saline and an adjuvant instead of antibody injections. These findings suggest that anti-idiotypic antibodies to morphine derivatives have the ability to prevent the development of opiate dependence in rodents.

Keywords: *anti-idiotypic antibodies, vaccination, morphine, opiate dependence, prevention, rats.*