

ЛИТВИНОВ РОМАН АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ФАРМАКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
НОВОГО КАППА-ОПИОИДНОГО АГОНИСТА –
ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗИМИДАЗОЛОВ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоград – 2016

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Академик РАН, Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор,
Спасов Александр Алексеевич

Научный консультант:

Доктор медицинских наук **Гречко Олеся Юрьевна**

Официальные оппоненты:

1. Воронина Татьяна Александровна, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией психофармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В.Закусова»

2. Шабанов Петр Дмитриевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии Российской Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова МО РФ.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства».

Адрес (индекс, город, улица, дом): 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1

телефон (код+номер): (812) 365-06-80

e-mail организации: institute@toxicology.ru

web-сайт организации: <http://www.toxicology.ru/>

Защита состоится «___» _____ 2016 г. в _____ ч. на заседании Диссертационного Совета _____ при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru) ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации»

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Разработка новых обезболивающих препаратов, сочетающих в себе высокую эффективность опиоидных анальгетиков с более благоприятным профилем респираторной и наркологической безопасности, является важным направлением развития современной фармакологии и медицины [Звартау, Э. Э., 2008; Pasternak, G., 2011; Игнатов, Ю.Д., 2006; Тюренков, И.Н., 2009].

Наиболее опасные и часто встречаемые в клинической практике эффекты морфиноподобных анальгетиков являются сопутствующими реакциями мю- и дельта-опиоидной активации, и включают в себя респираторную депрессию, наркогенный потенциал, седацию, нарушение моторики желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [Игнатов, Ю.Д., 2001; Звартау, Э.Э., 2007; Воронина, Т.А., 2010; Петров, В.И., 2009; Shabanov, P.D., 2011 (2); Khansari, M., 2013; Aldrich, J., 2009; Johnson, S.M., 2010; Ono, H., 2014; Boom, M., 2012; Holzer, P., 2009; Al-Hasani, R., 2011]. С этой точки зрения субпопуляция каппа-рецепторов представляется одной из наиболее привлекательных мишеней для создания нового поколения обезболивающих препаратов без побочных эффектов, характерных для клинического профиля мю- и дельта-опиоидных агонистов [Mangel, A.W., 2012; Chamouard, P., 1998; Giuliani, S., 1996; Elizabeth, L., 2008; Kivell, B., 2010; Zvartau, E.E., 2006]. Известно, что каппа-рецепторные лиганды наряду с высокой антиноцицептивной активностью не будут стимулировать дофаминергическую систему «награды», а также вызывать ряд сопутствующих и нежелательных морфиноподобных побочных эффектов, характерных для мюопиоидных агонистов, что связано с различной локализацией мю- и каппа-опиоидных рецепторов в мозге и на периферии [Pasternak, G.W., 2011; Lemos, J.C. 2011].

Ранее, в соответствии с Федеральной целевой программой «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» в рамках государственного контракта № 11411.1008700.13.090 от 13.09.2011, выполнено доклиническое исследование специфической фармакологической активности нового производного имидазо[1,2-а]бензимидазола – соединения под лабораторным шифром РУ-1205, сочетающего фармакологические свойства каппа-опиоидного агониста и эффективного анальгетика, превосходящего по силе и продолжительности обезболивающего действия буторфанол [Anisimova, V.A., 2010; Анисимова, В.А., Пат.РФ № 2 413 512 С1 от 29.07.2009 г.; Спасов, А.А., 2013; Спасов, А.А., 2014; Спасов, А.А., 2014(1)].

На следующем этапе доклинических исследований представлялось целесообразным изучить сопутствующие и нежелательные эффекты соединения РУ-1205, а также провести анализ его общетоксических свойств и некоторых аспектов механизма действия.

Степень разработанности проблемы. Создание высокоизбирательных каппа-рецепторных лигандов решило проблему наличия негативных сопутствующих эффектов, активации мю-опиоидных рецепторов. Однако большинство представителей данного класса веществ могут провоцировать развитие дисфории и седации. Это послужило предпосылкой для дальнейшего поиска эффективных и безопасных избирательных агонистов каппа-опиоидных рецепторов. В настоящее время накоплен материал, указывающий на перспективность класса производных бензимидазола в качестве основы для создания веществ с каппа-агонистической активностью. Совокупная оценка испытаний различных производных бензимидазола, проведенная на кафедре фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета (ВолгГМУ) позволяет полагать, что данный класс соединений является перспективным для разработки новых веществ с данным видом активности. В результате предварительных исследований было выявлено вещество, оказывающее избирательное каппа-агонистическое и обезболивающее действие – дигидрохлорид 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-а]-бензимидазола (соединение с лабораторным шифром РУ-1205). Представленные данные послужили предпосылкой к поиску и изучению эффектов соединения РУ-1205, сопутствующих каппа-, мю- и дельта-рецепторной активации.

Целью работы явилось изучение перехода фармакологических эффектов соединения РУ-1205 в токсические, и появление побочных эффектов, характерных для высоких доз.

Для достижения поставленной цели были сформулированы задачи:

1. Оценить обезболивающие эффекты соединения РУ-1205 в тестах *in vivo* в возрастающих дозах.
2. Изучить влияние исследуемого соединения в возрастающих дозах на эффекты, характерные для активации мю- и дельта-опиоидных рецепторов (развитие респираторной депрессии, толерантности к анальгетическому эффекту, физической зависимости, аддикции, нарушения моторики ЖКТ).
3. Оценить воздействие вещества РУ-1205 в возрастающих дозах на специфические побочные эффекты, характерные для каппа-опиоидных агонистов (развитие дисфории, седации, увеличение диуреза).
4. Изучить влияние вещества РУ-1205 в возрастающих дозах на основные нейромедиаторные системы мозга.

5. Исследовать нейротоксикологический профиль соединения РУ-1205 с использованием схемы многотестового наблюдения по Ирвину.

Научная новизна исследования. Впервые экспериментально подтверждено, что соединение РУ-1205 оказывает выраженное обезболивающее действие в широком диапазоне доз: от минимально эффективных до субтоксических. Установлено, что вещество РУ-1205 не вызывает сопутствующие нежелательные эффекты мю- и дельта-опиоидной активации в условиях *in vivo* (респираторная депрессия, толерантность к анальгетическому эффекту, угнетение моторики ЖКТ). Впервые показано, что в условиях *in vivo* соединение РУ-1205 не проявляет первичной и вторичной стимульной активности, свойств провокаторов дисфории, а также депрессогенного действия, характерных для селективных агонистов каппа-опиоидного рецептора. Впервые установлено, что вещество РУ-1205 оказывает диуретическое действие. Впервые проведен анализ воздействия вещества РУ-1205 на эффекты основных нейромедиаторных анализаторов в широком диапазоне доз, от максимально-эффективной анальгетической до субтоксической.

Теоретическая и практическая значимость. Представитель структурно нового класса селективных каппа-опиоидных агонистов – соединение РУ-1205 – не проявляет в условиях *in vitro* и *in vivo* эффектов мю- и дельта-опиоидной активации. В то же время подтвержден каппа-опиоидный механизм обезболивающей активности данного вещества и доказано отсутствие способности провоцировать каппа-опосредованные психоэмоциональные расстройства. Показано, что обезболивающее действие тестируемого соединения может сопровождаться увеличением диуреза.

Реализация результатов исследования. Данные о фармакологической активности каппа-опиоидных агонистов включены в лекционные курсы на кафедре фармакологии, кафедре фармакологии и биофармации ФУВ, кафедре фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета, на кафедре фармакологии Кубанского государственного медицинского университета. В работе НИИ фармакологии ВолгГМУ, Волгоградского медицинского научного центра применяется комплексный подход для поиска и изучения свойств новых соединений с каппа-агонистической активностью.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Соединение РУ-1205 в диапазоне доз 0,001-100 мг/кг оказывает анальгетическое действие с максимально обезболивающим эффектом в дозе 1 мг/кг и превосходит по этому показателю препарат сравнения буторфанол в 1,8 раза.

2. Вещество РУ-1205, в отличие от буторфанола, не вызывает признаков мю-агонистической активности: развитие респираторной депрессии, толерантности к анальгетическому эффекту, физической зависимости, аддикции, нарушения моторики ЖКТ.

3. Соединение РУ-1205 не проявляет аверсивных свойств. Седация развивается в дозах, многократно превосходящих анальгетические. При этом вещество РУ-1205 оказывает диуретическое действие, присущее селективным каппа-рецепторным агонистам.

4. Вещество РУ-1205 в дозе 10 мг/кг подавляет фенаминовую гиперлокомоцию, 5-гидрокситриптофан-индуцированный гиперкинез и пикротоксин-индуцированные судороги.

5. Соединение РУ-1205 в диапазоне доз 0,1-50 мг/кг в многотестовом наблюдении по Ирвину не оказывает нейротоксикологического действия. В дозах 50 мг/кг и более вызывает неспецифическое угнетение ЦНС.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на 71-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2013), 72-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2014), XVIII региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2013), научной конференции с международным участием «Фармакология экстремальных состояний» (Санкт-Петербург, 2015 г.); XVII региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2012 г), 73-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2015); XIX Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Личный вклад автора. Автором проведен поиск и анализ отечественных и зарубежных источников литературы. Вклад автора заключается в непосредственном участии в исследовании фармакологической активности соединения РУ-1205. Автором изучено обезболивающее действие соединения РУ-1205 в широком диапазоне доз (0,1-100 мг/кг), проведены исследование и анализ сопутствующих эффектов мю- и каппа-рецепторной активации вещества в условиях *in vivo*, включая оценку респираторной депрессии, толерантности к анальгетическому эффекту и физической зависимости, аверсивных и депрессогенных свойств, воздействия на двигательную активность, диуретическое действие и влияние на транзиторную

функцию ЖКТ. Автором изучены неспецифические нейротоксикологические свойства вещества РУ-1205 в широком диапазоне доз (0,1-100 мг/кг). Также исследовано взаимодействие соединения РУ-1205 в широком диапазоне доз (0,1-100 мг/кг) с эффектами анализаторов нейромедиаторных систем. Оценка механизма действия соединения РУ-1205 и физической зависимости была проведена совместно со Штаревой Д.М. и Рашенко А.И. Аддитивные свойства вещества РУ-1205 были изучены на базе НИИ фармакологии имени А.В. Вальдмана при ПСПбГМУ имени И.П. Павлова, под руководством Эдвина Эдуардовича Звартау. Основополагающий вклад автором внесен в обсуждение результатов и разработку практических рекомендаций. При написании диссертационной работы автором проведены сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и оформление рукописи.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 194 страницах машинописного текста и состоит из введения, 9 глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 306 отечественных и зарубежных источников. Работа иллюстрирована 39 таблицами и 18 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 диссертационной работы представлен **литературный обзор**, отражающий последовательные изменения взглядов научно-медицинского сообщества на проблему разработки эффективных и безопасных опиоидных анальгетиков с каппа-рецепторным механизмом действия.. В первой подглаве рассмотрены активность и нежелательные сопутствующие эффекты неселективных каппа-опиоидных агонистов. Показана взаимосвязь неизбирательности действия с развитием мю-опосредованных побочных эффектов. Во второй подглаве описаны сопутствующие и нежелательные эффекты избирательной каппа-рецепторной активации на примере селективных каппа-опиоидных агонистов, а также приводятся данные о каппа-опиоидных лигандах, способных к независимой активации различных пострецепторных сигнальных каскадов и не проявляющих негативных сопутствующих свойств. В заключительной подглаве класс соединений на основе бензимидазола рассмотрен как потенциальная основа для создания структурно-нового класса каппа-опиоидных анальгетиков.

В главе 2 приведены материалы и методы диссертационной работы.

Материалы. Исследовалось соединение под лабораторным шифром РУ-1205 – дигидрохлорид 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-а]бензимидазола. Вещество синтезировано и предоставлено ЗАО «ЭМПИС-ФОХ» (г.Ростов-на-Дону).

В качестве реактивов, препаратов и веществ сравнения использовались: буторфанола тартрат (ОАО «Московская фармацевтическая фабрика», Россия), U-50,488 («SIGMA», США), морфина гидрохлорид (ОАО «Московская фармацевтическая фабрика», Россия), налоксон (ОАО «Московская фармацевтическая фабрика», Россия), норбиналторфимин («Sigma», США), ареколин («Фармакон», Россия), никотин («Sigma», США), резерпин («Sigma», США), галоперидол («Мосхимфармпрепараты», Россия), апоморфин («ICN Biomedical», США), 3,4-диокси-L-фенилаланин («Sigma», США), 5-гидрокси-L-триптофан («Sigma», США), пикртоксин («Sigma», США), натрия хлорида раствор 0,9% («Эском», Россия), а также химически чистые натрия хлорид, калия хлорид, кальция хлорид, магния хлорид, магния сульфат, натрия гидрокарбонат, калия дигидрофосфат, глюкоза и трис-(оксиметил)-аминометана гидрохлорид производства «Мосреактив» (Россия).

Эксперименты проводились на 15 кроликах-самцах породы «Шиншилла» массой 4000-4500 г, 698 аутбредных половозрелых белых мышах массой 20-25 г и 132 нелинейных белых крысах массой 200-250г. Питомники-предоставители животных: ООО «Питомник РАМТН» (г. Москва), ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАМН (Ленинградская обл., д. Рапполово), ФГУП "НИИ ГТП" ФМБА России (г. Волгоград). Содержание животных и методы экспериментальных работ реализованы в соответствии с международными правовыми и этическим нормами, а так же требованиями государственных стандартов РФ (ГОСТ Р 50258-92), требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях от 22.09.2010 г, приказом Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н и приказом Минздравсоцразвития России протокол №6 от 22.12.2012 г. Манипуляции над животными одобрены экспертной комиссией регионального этического комитета (Протокол №177-2013 от 17.05.2013 г.). Экспериментальная работа с наркотическими веществами проведена по лицензии на осуществление деятельности по обороту наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, культивирование наркосодержащих растений ЛО-34-04-000022 от 12.10.2012г., а также в соответствии с приказом ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России «О назначении лиц, допущенных к работе с наркотическими средствами и психотропными веществами, внесенными в Список I, прекурсорами и культивируемыми наркосодержащими растениями (Приказ № 1351-КМ от 12.11.2013 г.).

Методы. Экспериментальные методики подобраны в соответствии с «Методическими рекомендациями по изучению анальгетической активности лекарственных средств» [Ворониной, Т.А., 2012]. Исследование анальгетической эффективности соединения РУ-1205 в широком диапазоне доз проведено по методу «горячая пластина» [Le Bars, D., 2001]. Детализация и подтверждение механизма обезболивающего действия выполнены с

применением методов *in vitro* подавления электроиндуцированных сокращений семявыносящего протока кролика (СПК) и подвздошной кишки крысы (ППК), валидных для выявления каппа- и мю-рецепторной активности соответственно [Soupar, I.M., 1995; Oka, T., 1981], а также в тесте «горячая пластина» в условиях предварительного введения селективных и не селективных опиоидных анатагонистов [Воронина, Т.А., 2012].

Для исключения формирования нежелательных сопутствующих эффектов мю-опиоидных агонистов в условиях целостного организма, фармакологические эффекты, сопутствующие возможной активации мю-опиоидного рецептора оценивались в тестах определения влияния на частоту дыхания ненаркотизированных грызунов [Воронина, Т.А., 2012], формирования толерантности к анальгетическому эффекту в терапевтической и десятикратно превышенной терапевтической дозах при двухнедельном подкожном и пероральном введении с оценкой изменения анальгетического действия на модели «горячая пластина», развития физической зависимости при введении веществ по схеме Ворониной Т.А. и Гузевых Л.С. (2012), с последующей провокацией абстиненции налоксоном и выявлением «доминантных» (прыжки) и «рецессивных» (тремор по типу «барабанный бой», полуптоз, встряхивания головы, стук зубами) признаков синдрома отмены [Fernandes, M., 1977]. Выявление первично-подкрепляющих и стимульных свойств, соответствующих формированию патологического пристрастия, проведено в тестах лекарственной дифференцировки, электрической самостимуляции зон «награды» головного мозга, внутривенного самовведения, условной реакции избегания места (УРИМ) [Shabanov, P.D., 2011 (1); Prus, A. J., 2008; Mallet, P.E., 1998; Bespalov, A.Yu., 1996; Кузьмин, А.В., 1991]. Влияние на моторику желудочно-кишечного тракта оценено по методу гастроэнтеральных «меткок» [Varamini, P., 2013].

Неанальгетические эффекты, сопровождающие каппа-рецепторную активацию изучались в тестах лекарственной дифференцировки, электрической самостимуляции зон «награды» головного мозга, поведенческой реакции внутривенного самовведения и УРИМ, валидных для оценки первично-подкрепляющих и стимульных свойств, эквивалентных клиническим проявлениям дисфории [Bruchas, M., 2007; Stoker, A., 2011; Diotte, M., 2001; Cahill, C. M., 2014]. Общий депрессивный компонент, ассоциированный с дисфорическими проявлениями, исследовался на модели форсированного неизбежного плавания [McLaughlin, J.P., 2003]. Выявления седативного действия проведено по методам актометрии и «удержания на вращающемся стержне» [Careau, V., 2012; Vanderah, T.W., 2004]. Диуретическое действие оценивалось в условиях предварительной водной нагрузки с последующим забором мочи в течение 5 часов [Inan, S., 2008].

С целью установления изменений нейромедиаторных передач, происходящих в ЦНС вследствие возможного влияния тестируемого вещества, было оценено взаимодействие с эффектами основных нейромедиаторных анализаторов (резерпина, пикротоксина, никотина, ареколина, фенамина, L-ДОФА, 5-ГТФ, апоморфина и галоперидола) [Андреева, Н.И., 2005; Воронина, Т.А., 2012]. Дополнительные нейрорепрессивные свойства изучались в модифицированном комплексе нейротоксикологических тестов Ирвина [Irwin, S., 1968].

При статистическом анализе данных применялись критерий Стьюдента, критерий Манна-Уитни (парный независимый анализ), критерий Вилкоксона (многофакторное сравнение зависимых данных), критерий Краскела-Уоллиса и двухфакторный вариационный анализ (с пост-тестом Данна) (для многофакторных сравнений), регрессионный анализ (метод наименьших квадратов). Работа проведена с применением пакетов программ «GraphPad Prism 5.0» и «Microsoft Excel 2002».

В главе 3 приведены результаты сравнения анальгетической активности соединения РУ-1205 и буторфанола в широком диапазоне доз. Для вещества РУ-1205 отмечено прогрессивное нарастание антиноцицептивного действия с максимально возможной эффективностью (МВЭ) в дозе 1 мг/кг. Увеличение дозы до 10 мг/кг сопровождалось снижением анальгетического эффекта в 2,1 раза и выходом кривой зависимости «доза-эффект» на плато в нарастающих дозах (10-100 мг/кг). МВЭ буторфанола проявлялась при введении 10 мг/кг и полностью нивелировалась в дозах 25 мг/кг и выше. Кроме того, в максимально эффективной дозе соединение РУ-1205 (1 мг/кг) превосходило по антиноцицептивному действию буторфанол в аналогичной дозе (1 мг/кг) в 1,8 раза (рис.1). При сопоставлении МВЭ исследуемого вещества и референтного препарата (1 мг/кг и 10 мг/кг соответственно) установлено, что данный показатель соединения РУ-1205 выше такового для буторфанола в 1,6 раза.

На основе данных об анальгетической эффективности был определен показатель ЭД₅₀ обезболивающей эффективности (табл. 1). Величина ЭД₅₀ для соединения РУ-1205 была в 10 раз ниже, чем таковая у буторфанола (0,02 мг/кг и 0,2 мг/кг соответственно).

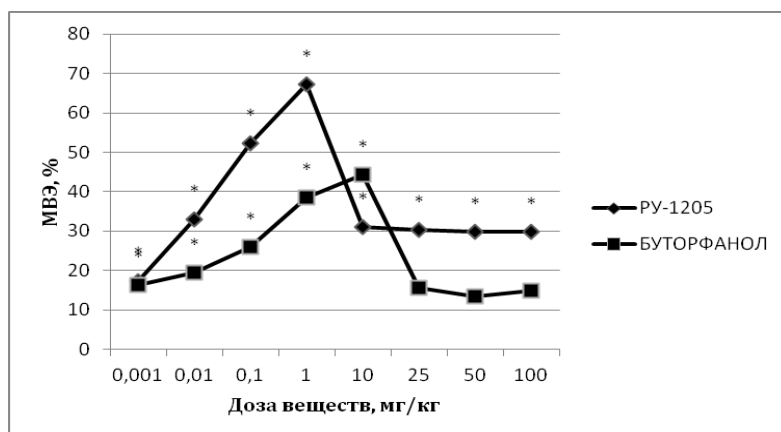


Рисунок 1. Зависимость анальгетической эффективности соединения РУ-1205 и буторфанола в тесте «горячая пластина» от дозы (0,001-100 мг/кг, при внутрибрюшинном введении), выраженная через показатель максимально-возможного эффекта% (МВЭ%**).

Примечание: * - статистически значимые различия с данными контрольной группы (на данном графике соответствуют значению 0 по оси МВЭ%) (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна, $p \leq 0,05$). Определение показателя МВЭ% проводилось по формуле: $\%МВЭ = \frac{ЛПо - ЛПк}{30 - ЛПк} \times 100\%$, где ЛПо – латентный период ноцицептивной реакции в опытной группе; ЛПк - латентный период ноцицептивной реакции в группе контроля; 30 – максимальное время экспозиции в секундах [Karami R., 2011].

С целью оценки терапевтической широты соединения РУ-1205 и буторфанола было проведено сравнительное изучение острой токсичности. Острая токсичность исследовалась при внутрибрюшинном введении. Избранным критерием была 50% летальность подопытных мышей (ЛД₅₀). При сопоставлении значений ЛД₅₀ для тестируемого вещества и референтного препарата выявлено, что при внутрибрюшинном введении вещество РУ-1205 в 1,5 раза менее токсично, а терапевтический индекс выше в 16 раз, чем у буторфанола (табл. 1).

Таблица 1

Среднее значение ЭД₅₀ для анальгетической эффективности соединения РУ-1205 и буторфанола по показателю МВЭ в тесте «горячая пластина», ЛД₅₀ соединения РУ-1205 и буторфанола (при внутрибрюшинном введении мышам), и терапевтический индекс (ТИ=ЛД₅₀/ЭД₅₀)

Вещество	ЭД ₅₀ (мг/кг)	ЛД ₅₀ (мг/кг)	ТИ
РУ-1205	0,02	306,0	15300,0
Буторфанол	0,2	192,0*	960,0

Примечание:*- ЛД₅₀ буторфанола тартрата (в/бр, мыши) по данным BBPSDY Pharmacology and Biochemical Properties of Drug Substances, 2, 19 (1979);

В главе 4 приведены результаты детализации механизма обезболивающего действия вещества РУ-1205 в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Установлено, что соединение РУ-1205 норбиналторфимин-обратимо угнетало стимулированные электрическими импульсами сокращения семявыносящего протока кролика (СПК) в диапазоне наномолярных концентраций (ЭК₅₀ $2 \cdot 10^{-9}$ М). По данному показателю соединение РУ-1205 было сопоставимо с веществом сравнения, селективным каппа-опиоидным

агонистом U-50488 ($ЭК_{50} 7 \cdot 10^{-9}$) и превосходило референтный препарат буторфанол ($ЭК_{50} 9,8 \cdot 10^{-5} M$). Тестируемое вещество не было эффективно на модели электроиндуцированных сокращений изолированного отрезка подвздошной кишки крысы (ПКК). В то же время морфин концентрационно-зависимо и налоксонообратимо подавлял сокращения отрезка кишечника ($ЭК_{50} 2,6 \cdot 10^{-7} M$). Указанные эффекты не устранялись в условиях преинкубации препарата ПКК с норбинаторфимин. В условиях *in vivo* соединение РУ-1205 и вещество сравнения U-50488 оказывали обезболивающее действие, увеличивая продолжительность латентного периода ноцицептивной реакции грызунов в 1,9 раза (табл. 2). При этом норбинаторфимин (10 мг/кг подкожно) предупреждал развитие анальгезии тестируемого и референтного веществ.

Из полученных результатов сделан вывод о том, что соединение РУ-1205 оказывает каппа-агонистическое действие, и не проявляет такового в отношении мю-опиоидных рецепторов. При этом, опираясь на данные литературы о высоком соответствии между результатами модели трансфекции человеческих клонированных каппа-рецепторов в культуры клеток и модели электроиндуцированных сокращений изолированного СПК [Zhu, J., 1997], можно предположить воспроизведение каппа-рецепторной активности соединения РУ-1205 в условиях человеческого организма.

Таблица 2

Влияние соединений РУ-1205 и U-50488 в дозе $ЭД_{80}$ (при внутрибрюшинном введении) при предварительном введении норбинаторфимина в дозе 10 мг/кг (подкожно) на величину болевого порога в тесте «горячая пластина» ($M \pm m$)

Вещество/группа	Доза, мг/кг	Латентный период, сек
Контроль	–	11,3 $\pm$ 1,8
РУ-1205	0,02	21,9 $\pm$ 2,3*
Норбинаторфимин + РУ-1205	10,0 + 0,02	9,6 $\pm$ 1,7
U-50488	8,0	20,9 $\pm$ 2,4*
Норбинаторфимин + U-50,488	10,0 + 8,0	13,0 $\pm$ 1,4

Примечание:*- статистически значимые различия по отношению к контрольной группе животных (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна, $p \leq 0,05$).

Ранее проведенные испытания фармакокинетических свойств соединения РУ-1205 позволили установить, что вещество образует метаболиты с собственным анальгетическим действием [Спасов, А.А., 2014], теоретически способные обладать мю-агонистической активностью. Исходя из этого представлялось целесообразным подтвердить каппа-рецепторную селективность соединения РУ-1205 в комплексе тестов *in vivo* на возможное наличие сопутствующих эффектов наркотических анальгетиков, опосредованных мю-рецепторной

активацией: угнетение дыхания, лекарственная зависимость, замедление транзиторной активности ЖКТ. Поиску данного вида активности вещества РУ-1205 посвящена **глава 5**.

При оценке респираторно-депрессивного воздействия тестируемого вещества и референтного препарата установлено, что показатели групп грызунов, получавших соединение РУ-1205 во всем диапазоне доз (1-100 мг/кг), статистически значимо не отличались от частоты дыхания в группе контроля и соответствовали физиологической норме (160-170 движений в минуту). В то же время буторфанол уменьшал ЧДД грызунов начиная с дозы 25 мг/кг, максимально в дозах 50 и 100 мг/кг на 20,1 и 27,4% соответственно (рис. 2).

При оценке толерантности к анальгетическому эффекту на модели «горячая пластина» вещество РУ-1205 в дозах 1 и 10 мг/кг при однократном подкожном введении вызывало статистически значимое увеличение порога болевой реакции относительно контроля в 2,2 и 2,3 раза соответственно. Показано, что соединение РУ-1205 при 14-дневном подкожном введении в данных дозах статистически значимо не изменяло латентный период ноцицептивной реакции по сравнению с эффектом однократной инъекции. В то же время латентный период ноцицептивной реакции после введения буторфанола буторфанол-толерантным грызунам отчетливо снижался относительно показателей для этого же препарата при однократном введении в дозах 1 и 10 мг/кг на 72,2 и 71,9% соответственно (рис. 3). Результаты экспериментальной работы согласуются с данными Gringauz, M (2001).

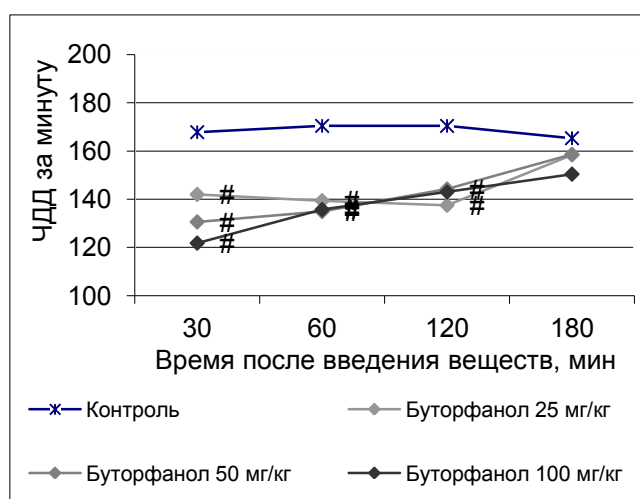


Рисунок 2. Влияние буторфанола (25-100мг/кг) на частоту дыхательных движений мышей.

Примечание: # — статистически значимые различия с контрольной группой при $p < 0,05$ (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна, $p \leq 0,05$).

При однократном введении внутрь, соединение РУ-1205 в дозах 5 и 50 мг/кг вызывало статистически значимое увеличение порога ноцицептивной реакции относительно контроля в 2,2 и 1,7 раза соответственно, а при 14-дневном введении в этих же дозах — в 2 и 1,6 раза соответственно. Морфин в дозах 5 мг/кг и 50 мг/кг при однократном введении вызывал статистически значимое увеличение порога ноцицептивной реакции относительно контроля в

1,9 и 2 раза соответственно. Тогда как латентный период ноцицептивной реакции морфин-толерантных грызунов в ответ на морфин, отчетливо снижался относительно однократного применения препарата в дозах 5 и 50 мг/кг на 67,8% и 98,6% соответственно (рис. 4).

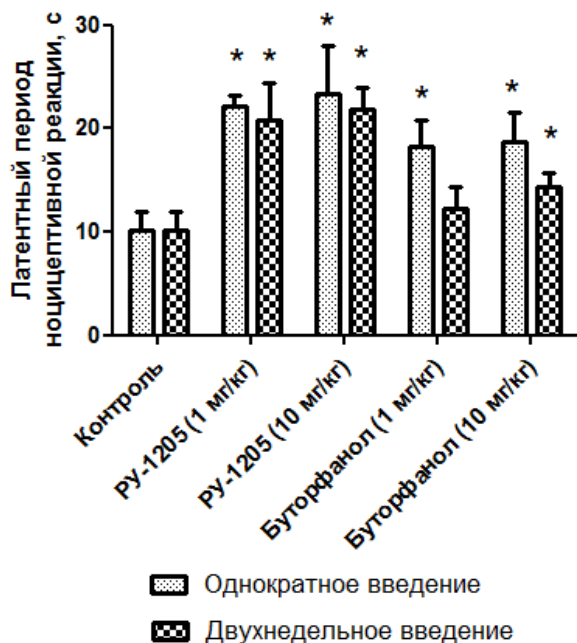


Рисунок 3. Влияние соединения РУ-1205 и буторфанолол при однократном и 14-дневном введении (подкожно) на болевой порог мышей в тесте «Горячая пластина» ($M \pm m$).

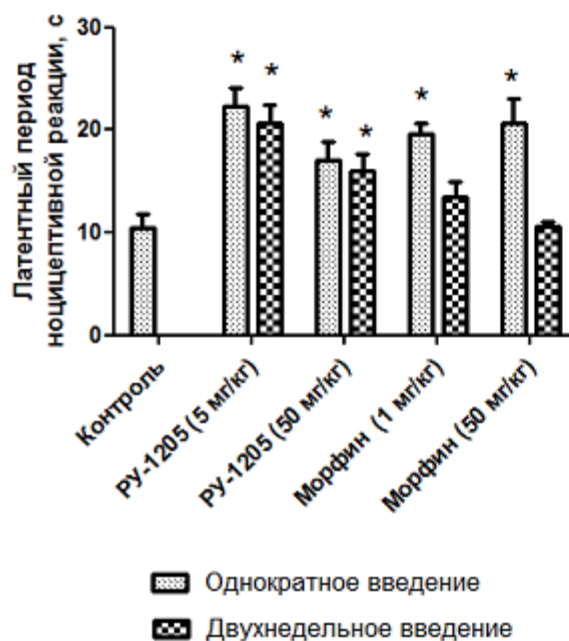


Рисунок 4. Влияние соединения РУ-1205 и морфина при однократном и 14-дневном введении (перорально) на болевой порог мышей в тесте «Горячая пластина» ($M \pm m$).

Примечание: * - статистически значимо по отношению к контрольной группе животных (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна, $p \leq 0,05$).

Соединение РУ-1205 при введении в нарастающих дозах по схеме Ворониной Т.А. и Гузевых Л.С. (2012) не вызывало развития «доминантных» (прыжки) и «рецессивных» признаков синдрома отмены. В то же время на фоне введения морфина налоксон вызывал прыжковую активность (среднее количество прыжков в группе $31,6 \pm 4,0$), тремор по типу «барабанный бой» и птоз у 100% животных. В 40% случаев отмечались встряхивания и диарея, и у 20% морфин-зависимых животных – стук зубами. Кроме этого, через 2 ч после провокации налоксоном у грызунов наблюдалась потеря в весе, соответствовавшая 10,3%. В группе мышей, получавших буторфанол, также регистрировались признаки синдрома отмены: прыжки и тремор у 100% животных. Среднее количество прыжковой активности составляло $2,4 \pm 1,1$. Изменений массы мышей, получавших буторфанол не наблюдалось.

Таким образом, соединение РУ-1205 не вызывало признаков физической зависимости, тогда как препараты морфин и буторфанол приводили к формированию абстиненции, более выраженному в группе, получавшей морфин.

Далее в главе 5 показано, что вещество РУ-1205 в дозах 0,1-10 мг/кг не влияло на продвижение угольной «метки» по ЖКТ, тогда, как морфин в дозах 1 и 10 мг/кг дозозависимо замедлял ее продвижение по кишечнику на 27,7% и 68,6% соответственно, что хорошо согласуется с данными литературы [Gallantine, E.L., 2008]. Буторфанол на данной экспериментальной модели проявил выраженную активность и статистически значимо угнетал моторику ЖКТ на 77,1% и 45,5% соответственно (рис. 5).

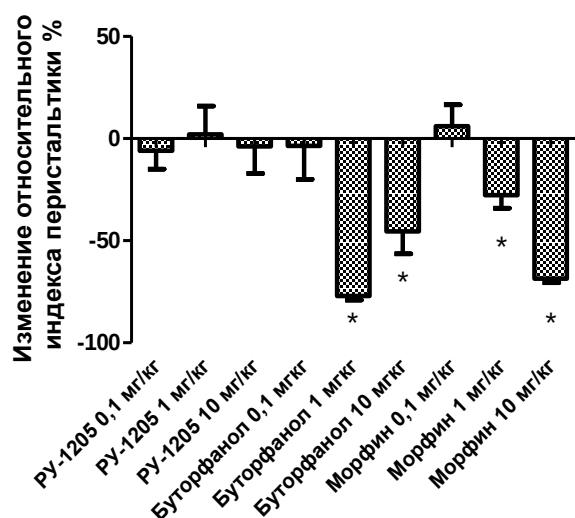


Рисунок 5. Влияние соединения РУ-1205, буторфанола и морфина (при внутрибрюшинном введении) на моторику желудочно-кишечного тракта мышей ($M \pm m$).

Данные представлены в виде относительного индекса перистальтики (ИП%), рассчитываемого по формуле

$ИП = 100 - ((O)/(P)) * 100\%$, где 100 – ИП группы контроля, условно принятый за 100%, О – общая длина кишечника (см), П – длина отрезка кишечника, заполненного активированным углем (см).

Примечание:* – статистически значимые различия с группой контроля (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна, $p \leq 0,05$).

По результатам экспериментальной работы сделан вывод о том, что вещество РУ-1205, в отличие от морфина и буторфанола, не проявляет сопутствующих нежелательных эффектов, характерных для мю-рецепторной активации.

В главе 6 рассмотрены сопутствующие эффекты соединения РУ-1205, характерные для активации каппа-опиоидного рецептора. К неанальгетическим эффектам избирательных каппа-рецепторных лигандов относятся дисфория, седация и увеличение диуреза [Ehrich, J. M., 2015]. Дисфория включена в структуру каппа-рецептор-опосредованных депрессивно-дисфорических расстройств, у грызунов проявляется в виде аверсивной реакции и оценивается в комплексе тестов по изучению стимульной активности, к которым относятся тесты формирования поведенческой реакции «внутривенного самовведения», «лекарственной дифференцировки», самостимуляция зон «награды» головного мозга и УРИМ, также валидные для выявления способности формировать патологическое пристрастие, характерное для мю-опиоидных агонистов [Cahill, C. M., 2014; Stoker, A., 2011; Bruchas, M.R., 2008, 2007; Prus, A. J., 2008].

В результате установлено, что тестируемое вещество в дозах 0,01-3 мг/кг не оказывало влияния на систему «награды» и выраженность мотивации в тесте самостимуляции головного

мозга крыс, при этом показатель относительной пороговой интенсивности стимуляции статистически значимо не изменялся и оставался на уровне 100% (рис. 6).

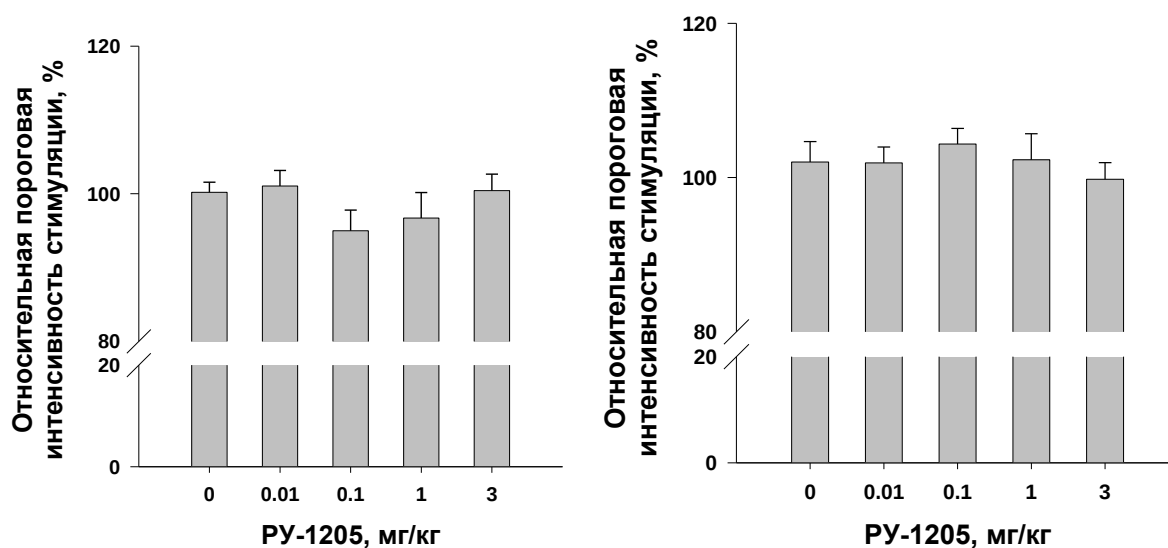


Рисунок 6. Влияние соединения РУ-1205 на пороги электрической самостимуляции системы «награды» у крыс через 30 минут (слева), и через 120 минут (справа) после введения вещества РУ-1205 ($M \pm m$).

Также установлено, что соединение РУ-1205 в эксперименте «внутривенного самовведения» с концентрацией рабочего раствора 0,01-1 мг/мл, не вызвало выработку поведенческой реакции, значимо отличающейся от самовведения растворителя, и, следовательно, не оказывало подкрепляющего действия (R-критерий - $F(6,58)=0,618$, $P=0,715$) (табл. 3).

Таблица 3

Влияние соединения РУ-1205 на показатели реакции внутривенного самовведения у мышей ($M \pm m$).

Концентрация вещества (мг/мл)	R- критерий	Кумулятивная доза (мг/кг)
0 (изот. р-р NaCl)	-0,03±0,05	—
0,01	-0,12±0,08	0,02±0,00
0,03	-0,04±0,09	0,10±0,02
0,1	0,00±0,08	0,33±0,06
0,3	-0,09±0,06	0,83±0,16
0,56	-0,02±0,09	1,77±0,28
1,0	0,08±0,09	4,31±0,52

Тестируемое вещество не проявляло сходных с буторфанолом дифференцировочных interoцептивных стимульных свойств. При проведении тестов увеличение дозы буторфанола дозозависимо повышало вероятность выбора крысами педали, ассоциированной с препаратом

(рис. 8 (А)) ($F(4,24)=11,321$, $P<0,01$), однако значимо снижало частоту оперантной реакции в дозах 0,1 и 0,3 мг/кг ($F(4,24)=19,125$, $P<0,01$). Соединение РУ-1205 не обладало сходными аналогичными дифференцировочными interoцептивными стимульными свойствами (рис. 8 (Б)). После введения соединения РУ-1205 за экспериментальную сессию процент выбора педали, ассоциированной с введением буторфанола не отличался от такового после введения растворителя ($F(5,52)=0,923$, $P=0,474$). Также вещество РУ-1205 не оказывало влияния на частоту оперантной реакции ($F(5,52)=1,114$, $P=0,364$).

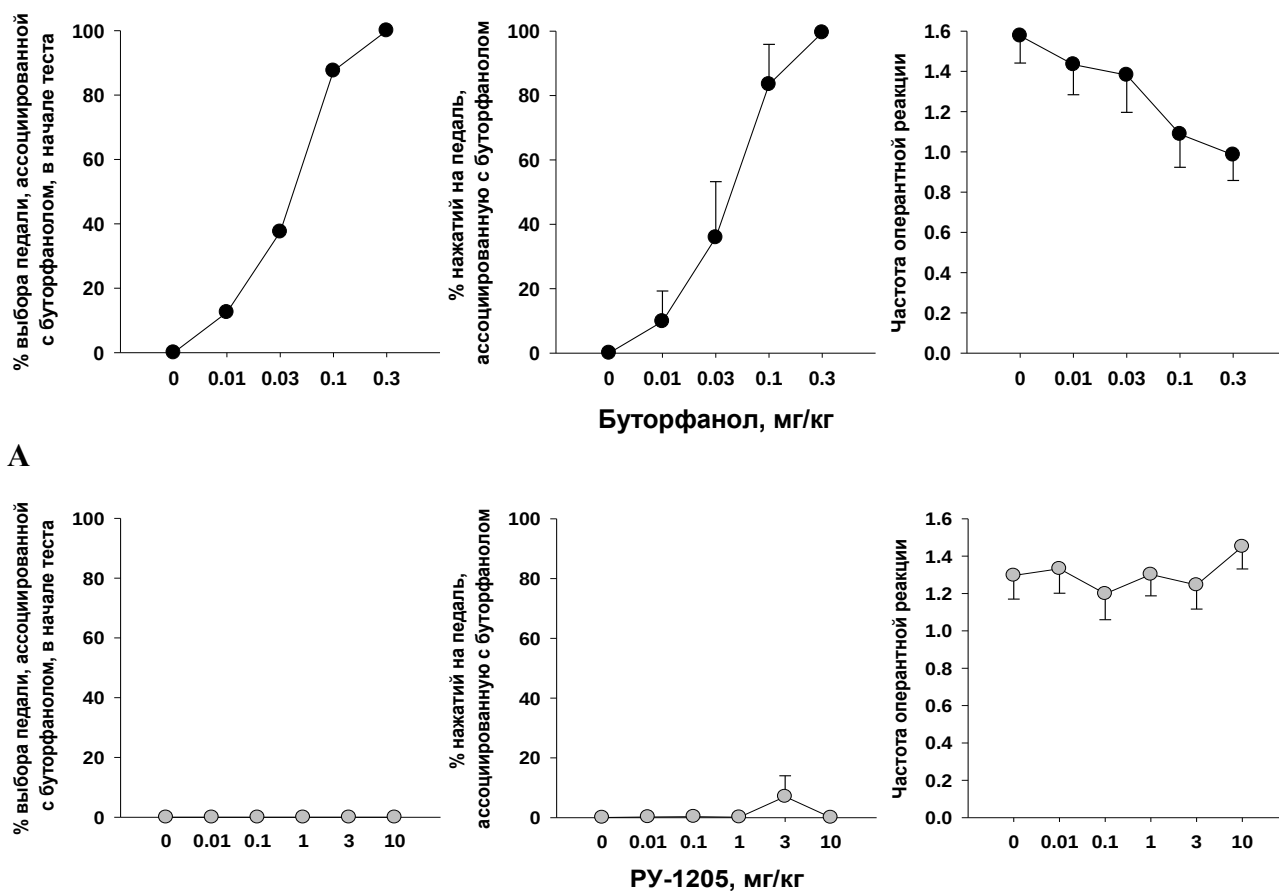


Рисунок 8. Дифференцировочные стимульные свойства буторфанола (А) и соединения РУ-1205 (Б).

Далее показано, что тестируемое вещество, в отличие от селективного каппа-рецепторного агониста, соединения U-50488, не вызывало аверсивной реакции у грызунов в тесте УРИМ (табл. 4; рис. 9). Мыши, изначально стратифицированные по признаку отсутствия «предпочтений» к камерам, обуславливаемым в ходе обучающих сессий с веществами и физиологическим раствором, и различающимся между собой по цвету и фактуре пола и стенок, после введения соединения РУ-1205 в течение 4-х дней в дозах (0,1-50 мг/кг), не избегали камер

экспериментальной установки, проводя в каждой из них в среднем равное количество времени (приблизительно 450 с в каждой) (табл. 4).

Таблица 4

Влияние соединения РУ-1205 (при внутрибрюшинном введении) на время нахождения мышей в отсеках установки для исследования реакции избегания места ($M \pm m$).

	Контроль	РУ-1205 (мг/кг)			
		0,1	1	10	50
Отсек А, сек	457,3 $\pm$ 13,8	445,5 $\pm$ 30,0	455,0 $\pm$ 49,0	427,5 $\pm$ 53,4	459,4 $\pm$ 54,0
Отсек Б, сек	442,7 $\pm$ 13,8	454,5 $\pm$ 30,0	445,0 $\pm$ 49,0	472,5 $\pm$ 53,4	440,6 $\pm$ 54,0

В отличие от тестируемого вещества, соединение U-50488 в дозе 10 мг/кг вызывало формирование аверсивных реакций. Грызуны, получавшие референтное вещество, проводили на 29% больше времени в камере, ассоциированной с физиологическим раствором.

В тесте форсированного неизбежного плавания установлено, что соединение РУ-1205, статистически значимо не влияло на проявления тревожности. Методом двухфакторного вариационного анализа при $p \leq 0,05$ было установлено, что время активного сопротивления животных, получавших тестируемое вещество, статистически значимо не отличалось от показателей группы контроля, для четырех сессий равного значениям 221,0 $\pm$ 12,7; 206,4 $\pm$ 17,9; 194,0 $\pm$ 10,3 и 188,7 $\pm$ 13,7 с.

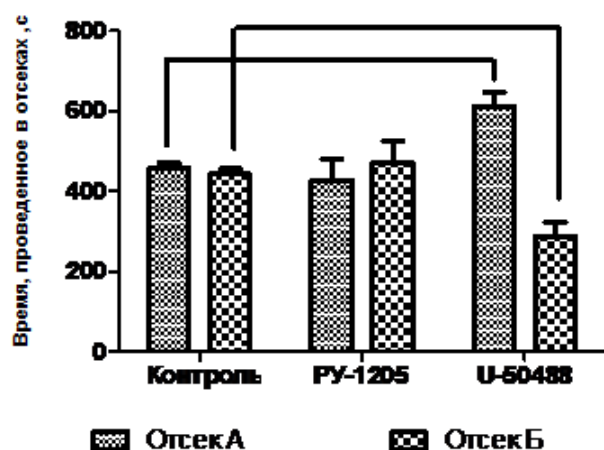


Рисунок 9. Влияние соединений РУ-1205 и U-50488 в дозах 10 мг/кг (при внутрибрюшинном введении) на время нахождения животных в отсеках установки для исследования реакции избегания места ($M \pm m$).

Обозначения: Отсек А ассоциирован с физиологическим раствором, отсек Б – с веществами.

Примечание: отмечены статистически значимые различия между группой, получавшей соединение U-50488 и контролем (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна, $p \leq 0,05$);

Все приведенные данные могут служить благоприятным прогностическим признаком отсутствия дисфории в клинических испытаниях.

Помимо дисфорического компонента действия соединения РУ-1205, в главе 6 рассмотрена седативная активность вещества РУ-1205. Исследование проводилось по методу актометрии и в тесте «удержания на вращающемся стержне».

В данных тестах было установлено, что выраженная седация в ответ на соединение РУ-1205 и буторфанол формировалась в дозах 50 мг/кг и более, а показатели ЭД₅₀ для седативной активности по методу актометрии составляли 24,55 и 17,66 мг/кг для тестируемого вещества и референтного препарата соответственно. Терапевтический индекс (ТИ) соединения РУ-1205 и референтного препарата в отношении седативной и анальгетической активностей был определен в соответствии с описанием, данным в научной работе Endoh, Т., (1999). Показатель рассчитывался по формуле:

$ТИ = ЭД_{50}(\text{седации}) / ЭД_{50}(\text{анальгезии})$, где

ЭД₅₀(седации) – доза, соответствующая 50% седативной активности исследуемых веществ в тесте актометрии, ЭД₅₀(анальгезии) – доза, соответствующая 50% анальгетической активности соединения РУ-1205 и буторфанола на модели «горячая пластина» (0,02 мг/кг и 0,2 мг/кг соответственно).

Установлено, что дозы соединения РУ-1205, в которых проявляется седативная активность, во много раз выше максимальных анальгетических, а по показателю ТИ седативной активности, вещество превосходит референтный препарат в 14 раз (табл. 5).

Таблица 5

Среднее значение ЭД₅₀ для анальгетической эффективности соединения РУ-1205 и буторфанола по показателю МВЭ в тесте «горячая пластина», ЭД₅₀ и терапевтический индекс для седативной активности соединения РУ-1205 и буторфанола

Вещество	ЭД ₅₀ (анальгетическая) (мг/кг)*	ЭД ₅₀ (седативная) (мг/кг)	ТИ (седативный)
РУ-1205	0,02	24,55	1227,5
Буторфанол	0,2	17,66	88,3

При дальнейшей оценке эффектов соединения РУ-1205, сопутствующих каппа-опиоидной активации установлено, что вещество обладает диуретическим действием (табл. 6). Диуретическое действие характерно для каппа-опиоидных агонистов, и связано с влиянием на активность гипоталамо-гипофизарной оси [Pietrzak, R. H., 2014; Scott, V., 2009; Inan, S., 2008]. В контрольной группе крыс средний суммарный диурез (за 5 часов эксперимента) составил 2,95 мл с пиком мочевыделения на 120 минуте после водной нагрузки. Для соединения РУ-1205 экспериментально было отмечено, что при пероральном пути введения вещества в дозе 5 мг/кг, уровень диуреза у грызунов статистически значимо не отличался от показателя группы контроля. Средний суммарный уровень диуреза составлял 2,85 мл. В то же время, при подкожном пути введения выявлено статистически значимое повышение объема диуреза в исследованных дозах (1 и 10 мг/кг). При этом в меньшей дозе вещества РУ-1205 наблюдалось

более выраженное возрастание объема диуреза по сравнению более высокой. Максимальное мочеотделение в указанных дозах наблюдалось на 120 минуте после водной нагрузки. Средний суммарный диурез за 5 часов наблюдения составлял 9,48 и 6,38 мл для доз 1 и 10 мг/кг.

Таблица 6

Влияние соединения РУ-1205 на диуретическую активность крыс при водной нагрузке 1мл на 100г массы тела ($M \pm m$).

Доза, мг/кг	Путь введения	Время измерения после введения соединения, мин				
		60	120	180	240	300
Объем мочи, мл						
Контроль	—	0,74±0,25	1,02±0,23	0,48±0,18	0,41±0,15	0,30±0,13
1	Подкожно	0,9±0,08	2,44±0,44*	1,95±0,33*	2,07±0,37*	2,12±0,35*
10		1,30±0,26	1,99±0,30*	1,18±0,25	0,86±0,30*	1,05±0,26*
5	Перорально	0,70±0,02	1,10±0,06	0,29±0,07	0,36±0,08	0,40±0,07

Примечание: *-статистически значимо по отношению к контрольной группе животных (двухфакторный вариационный анализ, пост-тест Туке, $p \leq 0,05$); представленные результаты зафиксированы через 60 минут после введения веществ.

Совокупность полученных результатов дает основание предполагать, что соединение РУ-1205 не обладает способностью вызывать дисфорию или формировать патологическое пристрастие. Седативное действие вещества РУ-1205 может проявляться в дозах, многократно превышающих анальгетические. Диуретическая активность тестируемого соединения проявляется в дозах 1-10 мг/кг при подкожном пути введения (среднее увеличение диуреза в 2 раза). При этом соединение РУ-1205 не оказывает диуретического действия в дозе 5 мг/кг при пероральном введении.

В главе 7 рассмотрено влияние соединения РУ-1205 на эффекты анализаторов нейромедиаторных систем *in vivo*. Известно, что центральные эффекты опиоидергических веществ связаны с изменением нейромедиации [Smith, M.A., 2003; Pietrzak, R.H., 2014; Cahill, C.M., 2014]. Было оценено влияние соединения РУ-1205 в широком диапазоне доз (1-100 мг/кг) на дофаминергическую, норадренергическую, холинергическую и ГАМК-ергическую нейромедиаторные передачи. В качестве анализаторов использованы резерпин, пикротоксин, никотин, ареколин, фенамина, L-ДОФА, 5-ГТФ, апоморфин и галоперидол. Результаты представлены в сводной таблице 7.

Таблица 7

Влияние соединения РУ-1205 на эффекты нейромедиаторных анализаторов.

Эффект анализатора \ Доза РУ-1205 (мг/кг)	1	10	100
Норадреналинергическая нейροпередача			
Резерпиновая гипотермия, блефароптоз	0	0	↓↓
Холинергическая нейροпередача			
Ареколиновый тремор, интенсивность, длительность	0	0	0
Никотиновый тремор, судороги	0	0	0
ГАМК-эргическая нейροпередача			
Пикртоксин-индуцированный тремор, судороги	0	↓	↓↓
Серотонинергическая нейροпередача			
5-ГТФ-индуцированный гиперкинез	0	↓	↓↓
Дофаминергическая нейροпередача			
Фенамин-индуцированная гиперактивность	0	↓	↓↓
Апоморфиновая стереотипия	0	0	0
Галоперидол-индуцированная катаlepsия	0	0	↓↓
L-ДОФА-зависимый гиперкинез	0	0	0
Резерпиновая гипокинезия	0	0	0

Обозначения: «0» отсутствие эффекта, «↓» умеренное угнетение нейромедиаторной передачи, «↓↓» выраженное угнетение нейромедиаторной передачи.

Установлено, что соединение РУ-1205 в дозе 10 мг/кг, оказывает значимое угнетающее воздействие на дофаминовую нейротрансмиссию мезолимбической и мезокортикальной системы (тест с фенамином, статистически значимое угнетение спонтанной локомоции на 65%), подавляет серотонинергическую нейροпередачу на уровне медиальной префронтальной коры (тест с 5-ГТФ, статистически значимое подавление стереотипии веществом на 39%), угнетает эффекты пикртоксина (увеличение продолжительность латентного периода наступления судорог на 29%). Выраженное угнетающее воздействие соединения РУ-1205 в дозе 100 мг/кг, отмеченное в тестах с фенамином, пикртоксином, резерпином и 5-ГТФ, может быть связано с неспецифическим угнетением ЦНС.

В результате сделано заключение о том, что действие вещества на нейромедиаторный сигналинг ЦНС сходно с таковым влиянием селективных каппа-опиоидных агонистов [Chavkin, С., 2011].

Глава 8 посвящена изучению неспецифической нейротоксичности вещества РУ-1205 в комплексном многотестовом наблюдении на основе тестов Ирвина [Irwin, S., 1968; Iezhitsa, I.N., 2002]. Установлено, что соединение РУ-1205 в дозах 50 мг/кг и более угнетает локомоторную и поисковую активность, бессознательную реактивность, вызывает мышечную

гипотонию и гипорефлексию, не проявляет неспецифического активирующего влияния на ЦНС. Также отмечено, что вещество РУ-1205 при предварительном введении не изменяет моторики ЖКТ и частоты дыхательных движений. В дозах вещества РУ-1205 50 мг/кг и более отмечается выраженная гипотермия. Соединение РУ-1205 в дозах 0,1-1 мг/кг оказывает незначительное анксиолитическое действие.

По результатам комплекса тестов сделан вывод о том, что вещество РУ-1205 не обладает значимым нейротоксикологическим влиянием в дозах 0,1-50 мг/кг. В высоких дозах (50 мг/кг и более) отмечается неспецифическое угнетение ЦНС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основываясь на результатах всех проведенных исследований, можно заключить, что соединение РУ-1205 оказывает обезболивающее действие в широком диапазоне доз. При этом максимально возможный эффект исследуемого вещества развивается в дозе 1 мг/кг, и по этому показателю в 1,8 раза превосходит буторфанол (10 мг/кг). Анальгезия в ответ на предварительное введение соединения РУ-1205 сохраняется до субтоксических доз (100 мг/кг), тогда как буторфанол утрачивает свою эффективность в дозах 25 мг/кг и более. По показателю ЭД₅₀ и ТИ соединение РУ-1205 превосходит референтный препарат в 10 и 16 раз соответственно. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* установлен каппа-рецепторный механизм обезболивающего действия соединения РУ-1205.

В условиях *in vivo* вещество РУ-1205, в отличие от буторфанола, не вызывает эффекты, присущие агонистам мю-опиоидных рецепторов, такие, как респираторная депрессия, толерантность к анальгетическому действию, физическая зависимость, аддикция и нарушение моторики ЖКТ. В тестах формирования условной реакции избегания места, «внутривенного самовведения», «лекарственной дифференцировки», «форсированного неизбегаемого плавания», электической самостимуляции зон «награды» головного мозга соединение РУ-1205 не проявляет аверсивных свойств и депрессогенного действия, характерных для селективных каппа-опиоидных агонистов. Тестируемое вещество вызывает седацию на моделях «удержания на вращающемся стержне» и актометрии только в дозах, многократно превосходящих анальгетические, а также обладает диуретическим действием. Соединение РУ-1205 подавляет фенаминовую гиперлокомоцию, 5-гидрокситриптофан-индуцированный гиперкинез и пикротоксин-индуцированные судороги, что указывает на подавление дофаминергической, серотонинергической и активацию ГАМК-ергической нейротрансмиссии. Также соединение РУ-1205 не оказывает негативного влияния на центральную нервную систему, в дозах менее 50

мг/кг, что установлено в комплексном многотестовом наблюдении по Ирвину. В более высоких дозах отмечается общее угнетение психоневрологического статуса с сохранением респираторной функции в пределах нормы, а также мышечная гипотония и гипорефлексия.

Совокупность полученных результатов позволяет сделать заключение, что соединение РУ-1205 является каппа-селективным анальгетиком без негативных сопутствующих эффектов, характерных для мю- и каппа-опиоидных агонистов.

ВЫВОДЫ

1. Соединение РУ-1205 в диапазоне доз 0,001-100 мг/кг при внутрибрюшинном введении мышам в тесте «горячая пластина» оказывает анальгетическое действие с максимально обезболивающим эффектом в дозе 1 мг/кг и превосходит по этому показателю препарат сравнения буторфанол в 1,8 раза. По значениям ЭД₅₀ анальгетической эффективности и ТИ вещество РУ-1205 превосходит буторфанол в 10 и 16 раз соответственно.

2. Вещество РУ-1205, в отличие от буторфанола, не обладает эффектами, присущими агонистам мю-опиоидных рецепторов, такими, как респираторная депрессия, толерантность к анальгетическому эффекту, физическая зависимость, аддикция и нарушение моторики ЖКТ.

3. Соединение РУ-1205 в тестах электрической самостимуляции зон «награды» головного мозга, внутривенного самовведения, лекарственной дифференцировки, формирования условной реакции избегания места и форсированного неизбежного плавания, не оказывает авersive и депрессогенного действия, присущего селективным каппа-опиоидным агонистам. Вещество РУ-1205 вызывает седацию в тестах «удержания на вращающемся стержне» и актометрии в дозах, многократно превосходящих максимальные анальгетические, и по показателю ТИ седативной активности превосходит буторфанол в 14 раз.

4. Соединение РУ-1205 проявляет диуретические свойства в дозах 1-10 мг/кг при подкожном введении, наиболее выраженное в дозе 1 мг/кг, и не эффективно при приеме внутрь.

5. Вещество РУ-1205 в дозе 10 мг/кг подавляет фенаминовую гиперлокомоцию (на 65%), 5-гидрокситриптофан-индуцированный гиперкинез (на 39%) и пикротоксин-индуцированные судороги (увеличивает продолжительность латентного периода судорог на 29%), и не влияет на эффекты ареколина, никотина, галоперидола, резерпина галоперидола, апоморфина и L-ДОФА.

6. Соединение РУ-1205 в диапазоне доз 0,1-50 мг/кг при внутрибрюшинном введении не проявляет значимого негативного влияния на функциональную активность ЦНС. В дозах 50 мг/кг и более отмечается общее угнетение психоневрологического статуса с сохранением респираторной функции в пределах нормы, а также гипорефлексия и мышечная гипотония.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Дигидрохлорид 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2- α]-бензимидазола – соединение РУ-1205 – рекомендуется для дальнейших исследований в качестве потенциального обезболивающего средства.

2. Рекомендуется продолжить синтез и исследование замещенных имидазо[1,2- α]бензимидазола, как соединений с избирательной каппа-рецепторной агонистической активностью.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Спасов, А.А. Изучение взаимодействия соединения РУ-1205 с анализаторами нейромедиаторных систем / А.А. Спасов, О.Ю. Гречко, Д.М. Штарева, А.И. Ращенко, К.Ю. Калитин, **Р.А. Литвинов** // Журнал «Вестник Волгоградского государственного медицинского университета», 2014. – № 2 (50). – С. 120-122.

2. Гречко, О.Ю. Анальгетическая активность производного бензимидазола на моделях воспалительной боли / О.Ю. Гречко, Н.В. Елисеева, А.А. Спасов, **Р.А. Литвинов** // Журнал «Вестник Волгоградского государственного медицинского университета». – 2016. – №2 (57). – С. 101-103.

3. Гречко, О.Ю. Изучение физической зависимости и толерантности к антиноцицептивному действию соединения РУ-1205 / О.Ю. Гречко, Д.М. Штарёва, А.А. Спасов, **Р.А. Литвинов**, А.И. Ращенко // Журнал «Экспериментальная и клиническая фармакология». – 2016. – Т. 79. - № 4. – С. 83-86.

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций

1. Изучение обезболивающей активности и развития толерантности к анальгетическому эффекту каппа-опиоидных агонистов соединения РУ-1205 и препарата буторфанола / **Литвинов Р.А.**, Штарёва Д.М. // Вестник ВолгГМУ. Прил. -2013. – С.70-71.

2. Изучение нейротоксикологического профиля нового производного морфолинэтилбензимидазола / **Литвинов Р.А.**, Штарева Д.М. // Материалы 71-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». – Волгоград 24-27 апреля 2013 г. – С. 260.

3. Изучение физической зависимости соединения РУ-1205 на модели налоксон-индуцированного синдрома отмены / **Литвинов Р.А.**, Штарева Д.М., Ращенко А.И. //

Материалы 72-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». – Волгоград, 16-19 апреля 2014 г. – С. 225-226.

4. Изучение обезболивающей активности и развития толерантности к анальгетическому эффекту каппа-опиоидных агонистов соединения РУ-1205 и препарата буторфанола / **Литвинов Р.А.**, Штарева Д.М. // Сборник тезисов «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств» Волгоград, 6-8 ноября 2013 г. – С. 70.

5. Острое влияние на дыхание и хроническая анальгетическая толерантность при интروперитонеальном введении нового каппа-агониста РУ-1205 и буторфанола / **Литвинов Р.А.**, Калитин К.Ю. // Сборник тезисов «XVIII региональная конференция молодых исследователей волгоградской области» Волгоград, 5-8 ноября 2013 г. – С. 24.

6. Изучение анальгетической толерантности нового обезболивающего соединения, производного бензимидазолов, РУ-1205, и анальгетического препарата буторфанола / **Литвинов Р.А.** // Сборник тезисов «V международная научная конференция Science4health 2013» Москва, 29 октября – 2 ноября 2013 г. – С. 169.

7. Изучение противосудорожного действия нового производного бензимидазола РУ-1205 на модели генерализованных судорог, вызванных бикукуллином / Калитин К.Ю., **Литвинов Р.А.** // Сборник тезисов «XVIII региональная конференция молодых исследователей волгоградской области» Волгоград, 5-8 ноября 2013 г. – С. 20.

8. Наркогенный потенциал у каппа-опиоидных агонистов / Гречко О.Ю., **Литвинов Р.А.**, Штарева Д.М., Ращенко А.И., Звартау Э.Э., Драволлина О.А., Спасов А.А., Анисимова В.А. // Материалы конференции «Фармакология экстремальных состояний», Санкт-Петербург, 29 июня – 2 июля 2015 г. – С. 51.

9. Нейротоксикологический профиль нового соединения, производного бензимидазола, обладающего каппа-опосредованным механизмом опиатной анальгезии, и сопоставление данных с нейротоксикологическим профилем буторфанола тартрата / **Литвинов Р.А.**, Штарева Д.М. // Материалы 72-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» Волгоград, 24-27 апреля 2013г., с. – 260.

10. Изучение тканевой биодоступности соединения РУ-1205 при различных путях введения / Ращенко А.И., Сучков Е.А., **Литвинов Р.А.**, Пронин И.А. // Сборник тезисов «XVII региональная конференция молодых исследователей Волгоградской области» Волгоград, 6-9 ноября 2012 г., с – 67-68.

11. Выявление аверсивного действия соединения РУ-1205 на модели условной реакции избегания места / **Литвинов Р.А.** // Материалы 73-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» Волгоград, 22-25 апреля 2015 г.

12. Изучение влияния соединения РУ-1205 на моторику ЖКТ в сравнении с буторфанолом и морфином / **Литвинов Р.А.** // XIX Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области. – Волгоград, Волгоград, 11-14 ноября 2014 г.

13. Оценка толерантности к анальгетическому действию препаратов морфина, буторфанола и агониста каппа-опиоидных рецепторов соединения РУ-1205 / Гречко О.Ю., **Литвинов Р.А.**, Штарева Д.М., Ращенко А.И., Анисимова В.А. // Фармация и фармакология. 2015. Т. 3. № S1. С. 39-40.