

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**На правах рукописи**

**ЛИТВИНОВ РОМАН АЛЕКСАНДРОВИЧ**

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

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель

Академик РАН, З.д.н. РФ,

доктор медицинских наук,

профессор А.А. Спасов

Научный консультант

Доктор медицинских наук

О.Ю. Гречко

**ВОЛГОГРАД, 2016**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>6</b>
<b>ГЛАВА 1. Фармакологические и токсикологические особенности каппа-опиоидных агонистов (обзор литературы).....</b>	<b>13</b>
1.1 Неизбирательные каппа-рецепторные лиганды.....	16
1.2 Селективные агонисты каппа-опиоидного рецептора.....	25
1.3. Каппа-опиоидные агонисты среди производных бензимидазола.....	31
<b>ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования.....</b>	<b>33</b>
2.1 Материалы исследования.....	33
2.2 Общие подходы к изучению фармакологических свойств агонистов каппа-опиоидного рецептора.....	34
2.3 Методика оценки обезболивающей активности.....	34
2.4 Методика изучения механизма обезболивающей активности.....	37
2.5 Изучение сопутствующих и нежелательных эффектов, связанных с активацией мю- и дельта-опиоидных рецепторов <i>in vivo</i> .....	40
2.6 Изучение сопутствующих эффектов, связанных с активацией каппа-опиоидных рецепторов <i>in vivo</i> .....	43
2.7 Методика изучения взаимодействия с эффектами анализаторов нейромедиаторных систем <i>in vivo</i> .....	51
2.8 Выявление неспецифического нейротоксикологического действия.....	57
2.9 Методы статистической обработки данных.....	61
<b>ГЛАВА 3. Изучение обезболивающей активности соединения РУ-1205..</b>	<b>62</b>

3.1 Обезболивающее действие соединения РУ-1205 на модели «горячая пластина».....	62
3.2 Заключение.....	65

#### **ГЛАВА 4. Изучение механизма обезболивающего действия соединения РУ-1205.....66**

4.1 Оценка каппа-агонистической активности вещества РУ-1205 на модели электроиндуцированных сокращений изолированного семявыносящего протока кролика.....	67
4.2 Выявление мю- и дельта-опиоид-агонистического действия соединения РУ-1205 на модели на модели электроиндуцированных сокращений изолированной подвздошной кишки крысы.....	69
4.3 Изучение механизма анальгетического действия вещества РУ-1205 <i>in vivo</i> .....	70
4.4 Заключение.....	71

#### **ГЛАВА 5. Выявление сопутствующих эффектов соединения РУ-1205, опосредованных возможной активацией мю-рецепторов .....73**

5.1 Влияние соединения РУ-1205 на дыхание.....	74
5.2 Действие соединения РУ-1205 на моторику желудочно-кишечного тракта.....	75
5.3 Изучение наркотического потенциала вещества РУ-1205.....	77
5.4 Заключение.....	85

#### **ГЛАВА 6. Выявление сопутствующих эффектов соединения РУ-1205, опосредованных каппа-рецепторной активацией.....87**

6.1 Оценка свойств соединения РУ-1205, сопряженных с формированием дисфорических расстройств.....	87
6.2 Седативное действие соединения РУ-1205.....	95
6.3 Изучение диуретического действия соединения РУ-1205.....	98
6.4 Заключение.....	101

## **ГЛАВА 7. Взаимодействие соединения РУ-1205 анализаторами нейромедиаторных систем.....103**

7.1 Влияние соединения РУ-1205 на функциональную активность ЦНС....	103
7.2 Влияние соединения РУ-1205 на эффекты фенамина у мышей.....	105
7.3 Действие соединения РУ-1205 на эффекты L-ДОФА у мышей.....	106
7.4 Влияние соединения РУ-1205 на каталептогенный эффект галоперидола у мышей.....	109
7.5 Действие соединения РУ-1205 на стереотипное поведение крыс, вызванное апоморфином.....	110
7.6 Воздействие соединения РУ-1205 на гиперкинез мышей, вызванный 5-гидрокситриптофаном.....	111
7.7 Влияние соединения РУ-1205 на депрессивный эффект резерпина...	113
7.8 Воздействие соединения РУ-1205 на ареколиновый тремор у мышей.....	118
7.9 Влияние соединения РУ-1205 на никотиновый тремор у мышей.....	119
7.10 Влияние соединения РУ-1205 на судорожный эффект пикротоксина.....	120
7.11 Заключение.....	121

## **ГЛАВА 8. Выявление неспецифических нейротоксикологических свойств соединения РУ-1205.....125**

8.1 Исследование влияния соединения РУ-1205 на локомоторную окомоторную и поисковую активности.....	126
8.2 Влияния соединения РУ-1205 на бессознательные реакции.....	127
8.3 Изучение действия вещества РУ-1205 на нервно-мышечную возбудимость.....	128
8.4 Оценка влияния соединения РУ-1205 на координацию и общий тонус скелетных мышц.....	129
8.5 Исследование влияния вещества РУ-1205 на рефлекторную активность мышей.....	131
8.6 Влияние соединения РУ-1205 на функции вегетативной нервной системы.....	134
8.7 Влияние вещества РУ-1205 на эмоциональное состояние мышей.....	135
8.8 Заключение.....	137
<b>ГЛАВА 9. Заключение.....</b>	<b>139</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>156</b>
Практические рекомендации.....	158
Список литературы.....	160

## ВВЕДЕНИЕ

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]. Каппа-рецепторные лиганды, наряду с высокой антиноцицептивной активностью не будут стимулировать дофаминергическую систему «награды», так как это делают мю- или дельта-агонисты, а также вызывать ряд нежелательных морфиноподобных побочных эффектов, что связано с различной локализацией мю-, дельта- и каппа-опиоидных рецепторов в мозге [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-*a*]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 актуальным представлялось изучение сопутствующих и нежелательных эффектов соединения РУ-1205, а также 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-*a*]бензимидазола (соединение с лабораторным шифром РУ-1205). Представленные данные послужили предпосылкой к поиску и изучению эффектов соединения РУ-1205, сопутствующих каппа- и мю-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, увеличения 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).

---

Работа по синтезу вещества РУ-1205 проведена на базе НИИ ФОХ ЮФУ при непосредственном участии к.фарм.н Веры Алексеевны Анисимовой, за что выражаем ей благодарность и глубокую признательность.

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.** Исследования проведены в рамках государственного контракта № 11411.1008700.13.090 от 13.09.2011 «Доклинические исследования лекарственного средства с каппа-опиоидной агонистической активностью на основе производного имидазобензимидазола». Представитель структурно нового класса селективных каппа-опиоидных агонистов – соединение РУ-1205 не проявляет в условиях *in vitro* и *in vivo* эффектов мю-опиоидной активации. В то же время подтвержден каппа-опиоидный механизм обезболивающей активности данного вещества и доказано отсутствие способности вещества провоцировать каппа-опосредованные психоэмоциональные расстройства. Показано, что обезболивающее действие вещества может сопровождаться увеличением диуреза.

**Методология работы.** На базе Волгоградского государственного медицинского университета был подобран информативный методологический комплекс, отвечающий современным стандартам, и позволяющий решить поставленные в данной работе задачи. В экспериментальных исследованиях использованы инбредные половозрелые мыши и крысы обоих полов, а также кролики-самцы породы «шиншилла». Работа по исследованию свойств вещества РУ-1205 выполнена в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению свойств новых фармакологически активных веществ, под общей редакцией Миронова А.Н. (2012).

**Внедрение результатов работы.** 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 научного медицинского 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 17 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 депрессорных свойств, воздействия на двигательную активность, диуретической активности и влияния на транзиторную активность 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 Ращенко

А.И. Аддиктивные 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 195 страницах машинописного текста и состоит из введения, 9 глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 326 отечественных и зарубежных источников. Работа иллюстрирована 39 таблицами и 18 рисунками.

## **Глава 1. Фармакологические и токсикологические особенности каппа-опиоидных агонистов (обзор литературы).**

Острый болевой синдром является распространенной причиной экстренной и плановой госпитализации. В то же время хроническая боль способна осложнить течение основного заболевания и стать причиной коморбидности [Звартау, Э.Э., 2007; Воронина, Т.А., 2010; Dietis, N., 2009; Cahill, C. M., 2014].

В настоящее время наркотические анальгетики считаются препаратами выбора для купирования выраженных полиэтиологических болевых синдромов [Kivell, B., 2010; Zvartau, E.E., 2006; Khansari, M., 2013; Aldrich, J., 2009]. Высокая обезболивающая эффективность данных препаратов связана с многоуровневым действием на периферическую и центральную системы проведения, анализа и восприятия болевой стимуляции через активацию опиоидной нейромодуляторной системы [Pasternak, G.W., 2011]. Однако опиоидная нейромодуляция, помимо ноцицепции, регулирует психоэмоциональный и гормональный фон, вегетативные реакции, иммунный статус [Lemos, J.C. 2011; Spasov, A.A. 2014; Gray, A.C., 2006; Carlezon, J.W.A., 2009]. Опиоидные рецепторы представлены как в центральной, так и в периферической нервных системах [Lemos, J.C. 2011].

Опиоид-рецепторные белки являются «серпентинными» G-белок-ассоциированными (GPCR) мембранными комплексами, и подразделяются на 4 типа: мю-, дельта-, каппа- и ноцицептин/орфаниновый рецепторы (MOR, DOR, KOR и NOP соответственно – по номенклатуре IUPHAR), каждый из которых клонирован [Pasternak, G.W., 2011; IUPHAR-DB, 2016]. Для всех рецепторов идентифицированы эндогенные лиганды (табл. 1).

Все представители опиоидного рецепторного семейства на молекулярно-биологическом уровне обладают общими (ингибиторными) влияниями, однако между рецепторами имеются различия в анатомическом распределении [Aldrich, J., 2009; Knoll, A.T., 2010]. Таким образом, эффекты активации рецепторов внутри представителей семейства частично различаются, и могут быть разнонаправленными (табл. 2).

**Физиологические лиганды опиоидных рецепторов [IUPHAR, 2016]**

<b>Опиоидный рецептор</b>	<b>Эндогенные лиганды</b>
мю (MOP)	$\beta$ -эндорфин; Энкефалины; Эндоморфин-1; Эндоморфин-2
дельта (DOP)	Энкефалины; $\beta$ -эндорфин
каппа (KOP)	Динорфин А; Динорфин В; $\alpha$ -неоэндорфин
ноцицептиновый рецептор (NOP)	Ноцицептин/орфанин FQ

Таблица 2

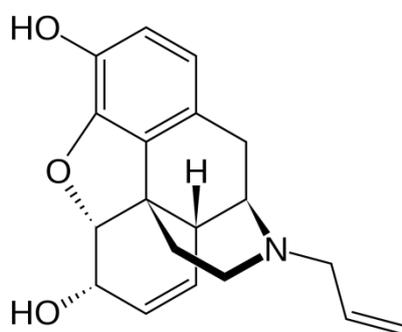
**Общая локализация и функции опиоидных рецепторов в человеческом организме** [Corbett, A.D., 2006; Gear, R.W., 2014; Маслов, Л.Н., 2003; Маслов, Л.Н. (1), 2003; Lemos, J.C., 2010; Stein, C., 2003]

<b>Опиоидный рецептор (тип/подтип)</b>	<b>Расположение</b>	<b>Эффекты</b>
<p>мю (MOP);</p> <p>Подтипы: мю-1 мю-2 мю-3</p>	<p><b>головной мозг:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• кора (слои III и IV)</li> <li>• таламус</li> <li>• стриосомы</li> <li>• околотоводопроводное серое вещество</li> </ul> <p><b>спинной мозг:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• студенистое вещество</li> </ul> <p><b>периферические чувствительные нейроны</b></p> <p><b>ЖКТ</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• анальгезия</li> <li>• физическая зависимость</li> <li>• эйфория</li> <li>• седация</li> <li>• респираторная депрессия</li> <li>• миоз</li> <li>• ослабление продольной и усиление поперечной перистальтики ЖКТ</li> </ul>
<p>дельта (DOP);</p> <p>Подтипы: дельта-1 дельта-2</p>	<p><b>головной мозг:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ядра моста</li> <li>• миндалевидное тело</li> <li>• зрительный бугор</li> <li>• глубокие слои коры</li> </ul> <p><b>периферические чувствительные нейроны</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• анальгезия</li> <li>• антидепрессантные эффекты</li> <li>• физическая зависимость</li> <li>• тахикардия</li> <li>• судороги</li> <li>• психотомиметическое действие</li> </ul>
<p>каппа (KOP)</p> <p>Подтипы: каппа-1 каппа-2 каппа-3</p>	<p><b>головной мозг:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• гипоталамус</li> <li>• околотоводопроводное серое вещество</li> <li>• ограда</li> </ul> <p><b>спинной мозг</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• студенистое вещество</li> </ul> <p><b>периферические чувствительные нейроны</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• анальгезия</li> <li>• седация</li> <li>• миоз</li> <li>• угнетение выработки АДГ</li> <li>• дисфория</li> </ul>
<p>Ноцицептиновый рецептор (NOP, ORL-1)</p> <p>Подтипы: предполагается наличие подтипов</p>	<p><b>головной мозг:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• кора</li> <li>• миндалевидное тело</li> <li>• гиппокамп</li> <li>• перегородочные ядра</li> <li>• поводок</li> <li>• гипоталамус</li> </ul> <p><b>спинной мозг</b></p> <p><b>ЖКТ</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• гиперальгезия</li> <li>• тревожность</li> <li>• депрессия</li> <li>• усиление аппетита</li> <li>• развитие толерантности к мю-агонистам</li> <li>• угнетение перистальтики ЖКТ</li> </ul>

## 1.1 Неизбирательные каппа-рецепторные лиганды

Действие опиоидных анальгетиков, используемых в повседневной клинической практике, как правило, сопряжено с влиянием на мю-опиоидные рецепторы [Molenveld, P., 2015]. В связи с этим, для данных препаратов с различной частотой встречаемости и выраженностью отмечаются сопутствующие нежелательные эффекты мю-опиоидной активации: угнетение дыхания, наркогенный потенциал, обстипация, что существенно ограничивает их клиническую значимость [Kivell, B., 2010; Hee Sock Park, 2006; Khansari1, M., 2013; Aldrich, J., 2009; Pattinson, K.T.S., 2008; Johnson, S.M., 2010; Ono, H., 2014].

Первая удачная попытка создания структурно-нового препарата с опиоидной активностью, лишённого указанных негативных сопутствующих эффектов была реализована в 1942 г. В результате был получен препарат – N-аллилнорморфан (налорфин), являющийся замещённым N-норморфаном (рис. 1), и относится к структурному классу морфинанов (рис. 2).



**Рисунок 1.** Структура налорфина.

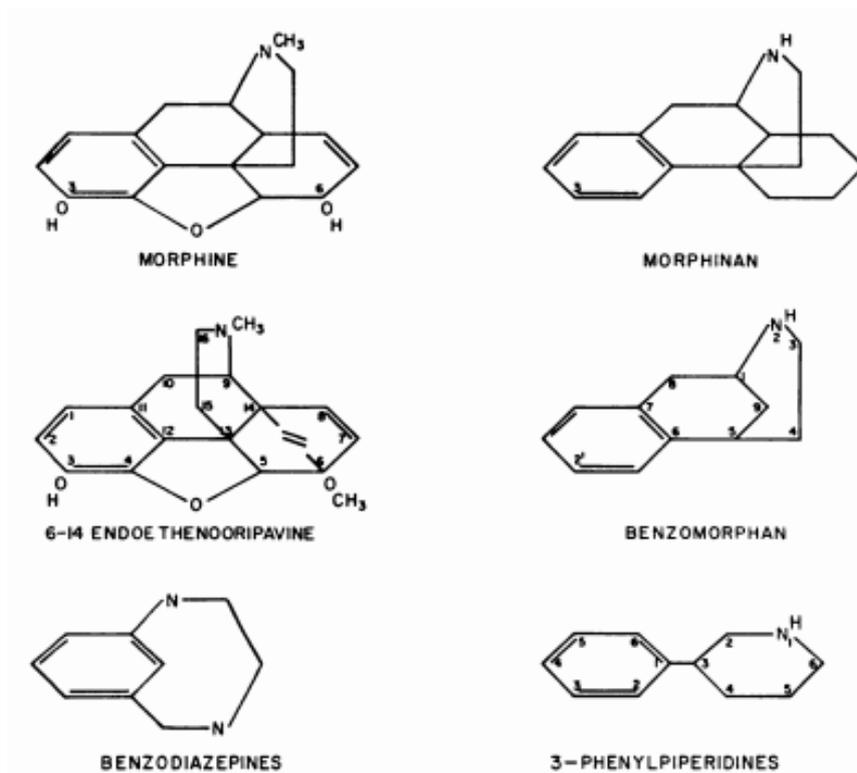
Налорфин обладает антагонистической активностью в отношении мю-опиоидных рецепторов в низких дозах, на фоне каппа агонистической активности в более высоких дозах [Schmidt, W.K., 1985]. При этом установлено, что препарат обладает афинностью преимущественно к каппа-3 подтипу опиоидных рецепторов [Goldfrank, L.R., 2006] (предполагается существование каппа-G-белок-сопряженных кластеров, составленных из каппа- и дельта-опиоидных рецепторов,

формирующих олигогетеротетрамеры, проявляющие фармакологический профиль каппа-3-опиоидных рецепторов [Rosenfeld, R., 2011]).

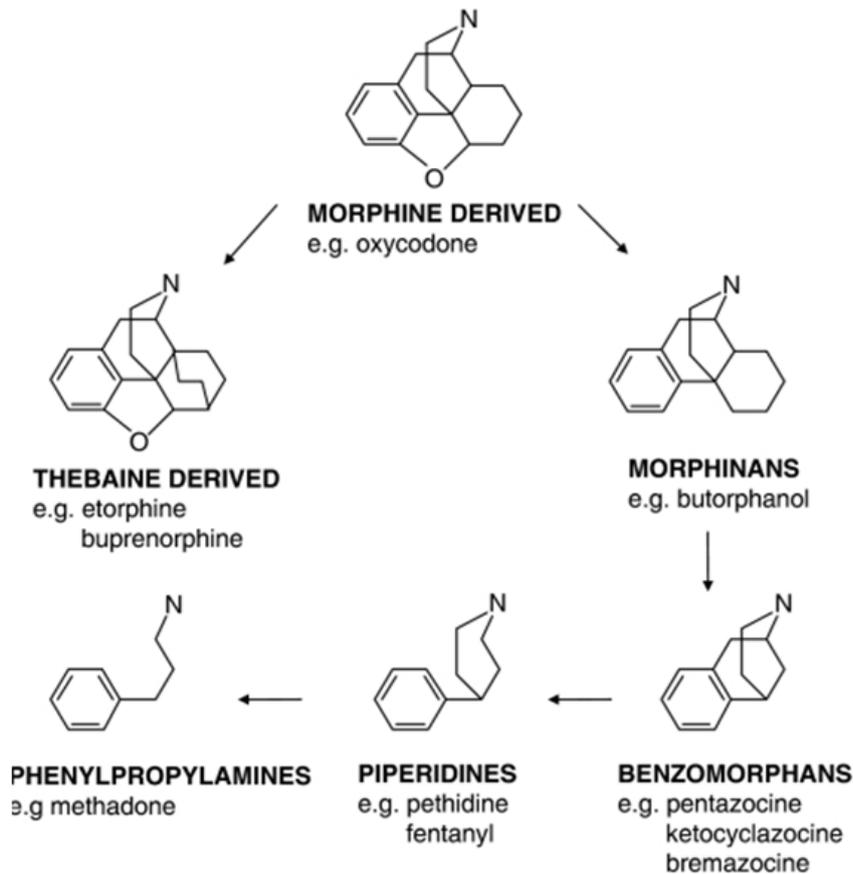
ЭД<sub>50</sub> обезболивающей активности налорфина составляет в среднем 13,4 мг/кг в тесте укусных корчей и 39,5 мг/кг в тесте электрического раздражения корня хвоста [Paul, D., 1991]. Налорфин не угнетает дыхание в отличие от агонистов мю-рецептора, даже в высоких дозах, не имеет выраженного наркогенного потенциала, и при этом способен устранять проявления морфиновой абстиненции [Reynolds, J.E.F., 1982]. Благодаря этому препарат использовался в качестве терапии острой интоксикации мю-агонистами [Woods, L.A., 1956], и в качестве обезболивающего средства при родах для предупреждения развития гипоксии плода [Reynolds, J.E.F., 1982]. Первоначально предполагалось использовать препарат в смеси с морфином для получения более мощной анальгезии. Однако у налорфина было установлено наличие собственных побочных эффектов. Одним из них явилось острое психотомиметическое действие, развивающееся вскоре после введения препарата [Hardman, J.G., 2006]. Помимо этого, у пациентов, принимавших препарат отмечались развитие сонливости и головных болей, потливость, тошнота, дезориентация, и, наиболее часто – дисфория [Goodman, L.S., 1975]. Таким образом, еще до открытия каппа-опиоидного рецептора, были получены первые сведения о неблагоприятных эффектах, сопутствующих каппа-рецепторной активации.

В 1967 г, в результате ретроспективного анализа, был сделан вывод о том, что молекулярные преобразования с вовлечением N-метильной группы морфина могут приводить к потере анальгетической эффективности препарата и приобретению морфин-антагонистического воздействия [Martin, W.R., 1967]. Было определено, что таковым действием могут обладать производные бензоморфана, морфинана и 2-фенил-пиперидина (рис.2). В результате развития идеи замещенных гомологов морфина данные структуры стали основой для дальнейшего создания структурно-новых классов опиоидных агонистов (рис. 3) [Corbett, A.D., 2006].

Martin (1967), при разработке соединения для терапии морфиновой интоксикации, предположил, что замена N-метильной группы на N-аллил или N-циклопропилметил, может устранять негативные сопутствующие эффекты морфина, оказывая антагонистическое действие. Однако при оценке активности N-аллил-гомолога морфина, было показано, что вещество не только оказывает антагонистическое морфину действие, устраняя респираторную депрессию, но при этом обладает собственной болеутоляющей активностью [Reynolds, J.E.F., 1982]. Это замечание породило предположение о наличии нескольких опиоидных рецепторов в организме – опиоидном дуализме [Martin, W. R., 1979].



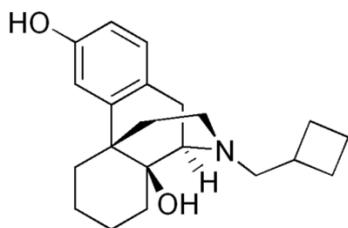
**Рисунок 2.** Соединения, обладающие морфин-антагонистической активностью (правый ряд), [Martin, W.R., 1967], ставшие основой для создания опиоидных агонистов.



**Рисунок 3.** Молекулярные модификации морфина, приведшие к разработке основ структурно-новых классов опиоидных агонистов [Corbett, A.D., 2006].

Молекулярные модификации структуры морфина привели не только к появлению налорфина. Как сказано выше, результатом химического преобразования данной структуры стало получение морфинана и бензоморфана, оказывающих морфин-антагонистическое действие [Corbett, A.D., 2006].

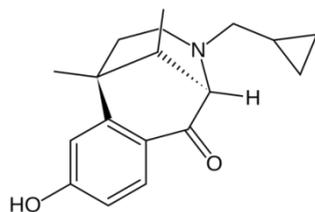
В результате работы по созданию опиоидных анальгетиков с минимальными морфиноподобными эффектами, в 1973 году был синтезирован препарат смешанного типа действия – производное морфинана – буторфанол (рис. 4) [Greenwald, M.K., 1998].



**Рисунок 4.** Структура буторфанола.

В результате радиолигандного анализа было установлено, что буторфанол обладает афинностью к мю-, дельта- и каппа-опиоидными рецепторами в соотношении 1:4:25 соответственно [Chang, K.J., 1981; Chang K.J., 1981 (1)]. В терапевтических дозах буторфанол оказывает выраженную анальгезию, и превосходит морфин в 5 раз. Препарат обладает наркотическим потенциалом, провоцирует развитие физической зависимости [Mamoan, A.M., 1995; Hogan, P., 1991; Jaw, S.P., 1993; Brown, G.R., 1985; Evans, W.S., 1985]. При этом, аддиктивные свойства препарата более низкие, чем у морфина [Peaschey, J.E., 1987; Gillis, J.C., 1995]. Commissey описал способность мю-агонистического действия буторфанола подавлять каппа-опосредованное влияние в условиях целостного организма, несмотря на то, что в тестах *in vitro* буторфанол обладает свойствами каппа-рецепторного лиганда [Commissey, S., 2005].

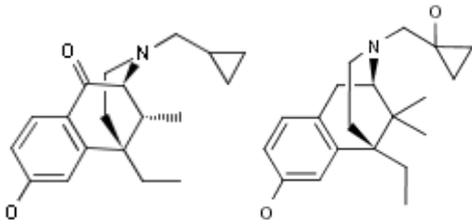
Дальнейшее развитие каппа-опиоидергических соединений на основе структурной аналогии с морфином было получено путем разработки веществ на основе бензоморфана (рис. 3) [Pasternak, G.W., 2013; Gharagozlou, P., 2006; Corbett, A.D., 2006]. К данному классу соединений относятся кетоциклозоцин, этилкетциклозоцин, бремасоцин, циклозоцин, пентазоцин. Данные препараты обладают парциальной опиоид-рецепторной активностью. Кетоциклозоцин был одним из первых препаратов данного структурного ряда (рис. 5) и сыграл большое значение в изучении опиоидной рецепторной системы. К 1970 г были представлены доказательства наличия 3-х типов опиоидных рецепторов [Martin, W.R., 1979]. Данные доказательства были получены при сопоставлении различных профилей фармакологической активности трех опиоидов: морфина, кетоциклозоцина и N-аллил-пентазоцина (соединение SKF 10047). Таким образом, рецепторы, предположительно активируемые данными веществами, были обозначены как мю-, каппа- и дельта-рецепторы, и свое наименование каппа-опиоидный рецептор получил в честь одного из первых препаратов на основе бензоморфана [Corbett, A.D., 2006]. Кетоциклозоцин, кроме выраженного обезболивания, оказывает диуретическое действие, и не вызывает респираторной депрессии [Lemos, J.C., 2011].



**Рисунок 5.** Структура кетоциклазоцина.

Также было выявлено, что кетоциклазоцин способен вызывать сонливость, паранойю, галлюцинации, дисфорию, а также повышать диурез [Kapusta, D.R., 1989; Kumor, K.M., 1986]. Подобные эффекты были общими для представителей класса производных бензоморфана и существенно ограничивали клиническое применение препаратов. Основной гипотезой, объясняющей возникновение большинства описанных эффектов считалась недостаточная рецепторная селективность [Corbett, A.D., 2006].

Молекулярное изменение 6,7-бензоморфанового ядра кетоциклазоцина позволило создать этилкетациклазоцин и бремазоцин (рис. 6). Данные вещества не имеют достаточной каппа-рецепторной селективности, в тестах *in vitro* проявляя свойства агонистов мю- и дельта-рецепторов [Dortch-Carnes, J., 2008]. Обезболивающая активность этилкетациклазоцина в 40 раз превосходит морфин [Coor, A., 2002]. Бремазоцин изучался в качестве потенциального анальгетика, при этом обезболивающая активность препарата в 3-4 раза превосходит морфин [Dortch-Carnes, J., 2008]. Несмотря на это, из-за выраженного побочного действия на ЦНС, оба препарата не нашли применения в медицине. Препараты вызывают ряд психотомиметических эффектов: нарушение ориентировки в пространстве и времени, искажение визуального восприятия, нарушения «схемы тела», деперсонализацию и утрату самоконтроля. В эксперименте с самовведением на приматах бремазоцин снижает психическую зависимость у экспериментальных животных для таких веществ, как кокаин, фенциклидин, этанол [Cosgrove, K.P., 2002], и оказывает выраженное диуретическое действие [Salas, S.P., 1989]. В отличие от морфина, данные препараты не вызывают респираторной депрессии, физической и психической зависимости [Dortch-Carnes, J., 2005].



**Рисунок 6.** Структуры этилкетациклозацина (слева) и бремазоцина (справа).

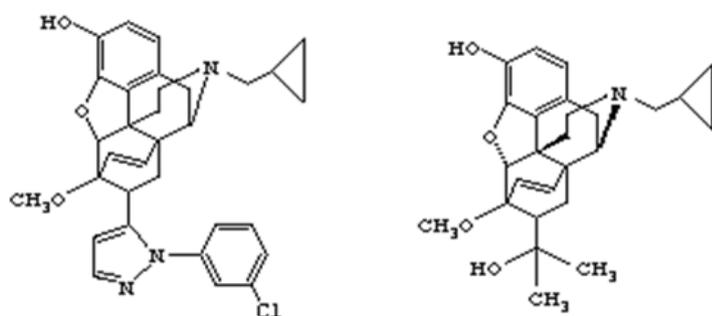
Из данных литературы [Rusovici, D.E., 2004; Neubert, Y.K., 2007; Knoll, A.T., 2010] известно, что производные бензоморфанов (bremazocin, этилкетациклозацин), проявляет высокое сродство к каппа-2-подтипу опиоидных рецепторов (в литературе описана возможность ко-экспрессии каппа- и дельта-опиоидных рецепторов с формированием каппа-дельта-рецепторного гетеродимера, проявляющего свойства каппа-2-рецептора с собственным профилем активности [Bhushan, R.G., 2004; Bulenger, S., 2005; Rosenfeld, R., 2011]). Существенный прогресс в области получения новых опиоидергических веществ был сделан в 1960-х годах Bentley и Hardy [Casy, A.F., 1986]. Предполагалось за счет большей структурной жесткости молекулы-опиоидного лиганда, основанной на структуре тебаина (рис. 3), в сравнении с морфином, повысить рецепторную селективность и снизить количество нежелательных сопутствующих эффектов. Результатом было создание неселективных соединений, агонистов и антагонистов высокой аффинности ко всем типам опиоидных рецепторов [Corbett, A.D., 2006]. На основе тебаина были получены ципренорфин (соединение M-285), эторфин (соединение M-99), соединение CI-110393, бупренорфин и др.

Эторфин обладает обезболивающим действием, в несколько тысяч раз превосходящим морфин [Corbett, A.D., 2006]. Однако выраженное обезболивающее действие препарата сочетается с угнетением дыхания [Roerig, S.C., 1987].

Бупренорфин – еще одно производное тебаина, в разработку которого значительный вклад внесли Reckitt и Colman. Данный препарат проявляет антагонистические свойства к дельта- и каппа-опиоидным рецепторам на фоне

частичной активации мю-опиоидных рецепторов. Внутримышечные и сублингвальные лекарственные формы препарата эффективны для устранения послеоперационных болей. Также бупренорфин проявляет высокую эффективность при раковой боли [Houde, R.W., 1979]. В источниках литературы сообщается, что бупренорфин может вызывать тошноту, рвоту [Umbricht, A., 2004], а также сонливость, головную боль, расстройство когнитивных функций, зуд, сухость слизистой полости рта, снижение либидо, обстипацию и олигурию [Budd, K., 2005]. При передозировке препарат способен угнетать дыхание и вызывать функциональные нарушения ЦНС [Hayes, B.D., 2008]. При этом в нормальном режиме дозирования нарушения в работе ЦНС развиваются реже, чем при применении морфина [Budd, K., 2005].

Однако ряд других производных тебаина (ципренорфин, CI-110393) оказались более токсичными, чем эторфин и бупренорфин. Ципренорфин (рис. 7) проявляет галлюциногенную активность, в 35 раз более выраженную, чем у налорфина. В дозе от 1 мкг/кг препарат способен вызывать выраженные и продолжительные психотические реакции [Lowe, G., 1969]. Кроме галлюциногенного эффекта, для ципренорфина характерны вегетативные нарушения (птоз, потливость), дисфория, раздражительность и неразборчивость речи. При этом ципренорфин не угнетает дыхание, а также оказывает морфин-антагонистическое действие [Bentley, K.W., 1965].



**Рисунок 7.** Структура соединения CI-110393 (слева), и ципренорфина (справа).

В целом, замещенные структурные аналоги морфина оказались достаточно эффективным классом опиоидных анальгетиков. У большинства препаратов не

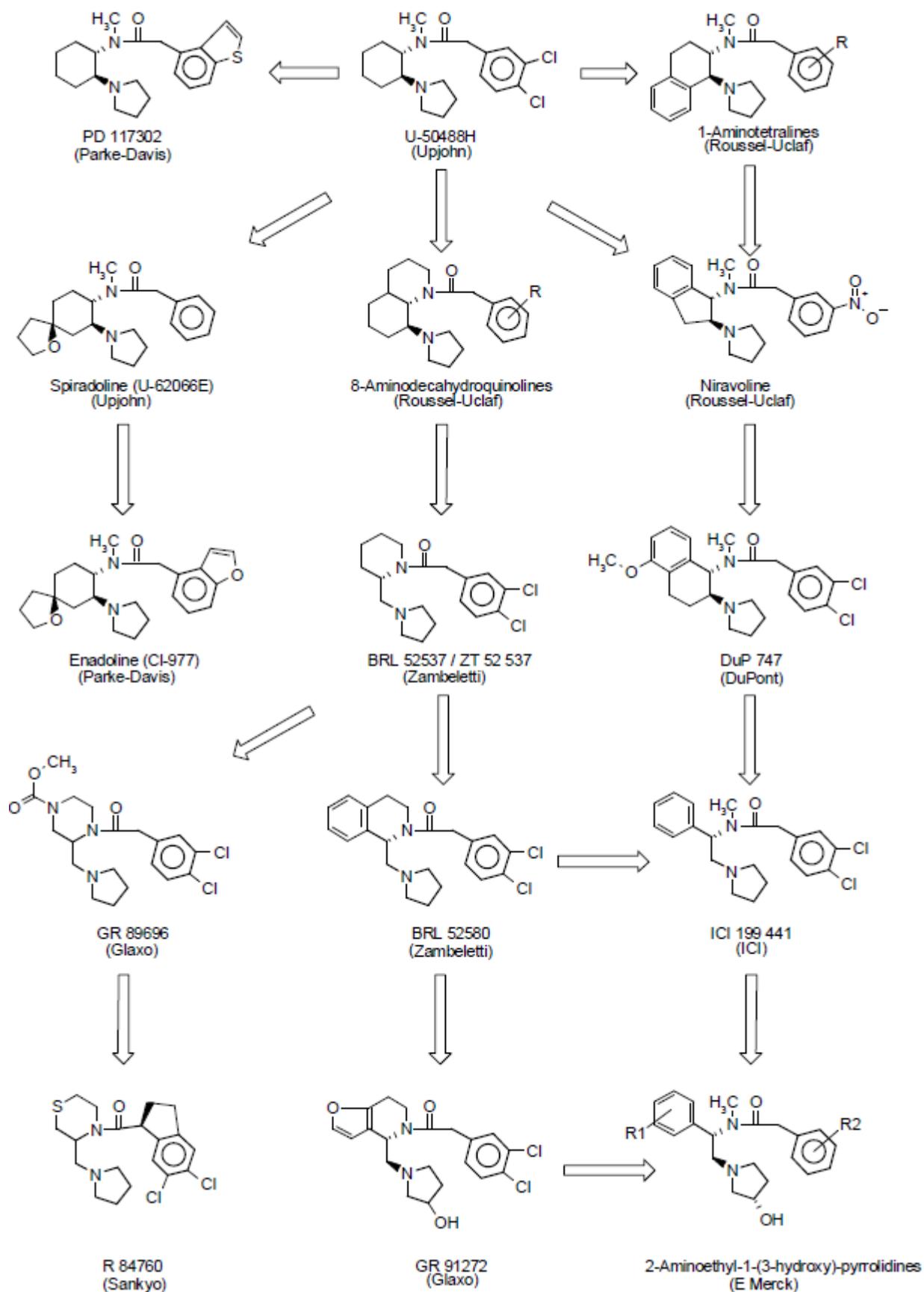
были представлены такие токсические свойства, как респираторная депрессия и наркотическая зависимость. Однако соединения данной группы не являлись селективными агонистами каппа рецепторов. Недостаточный уровень селективности этих соединений приводил к тому, что проникающие в мозг каппа-агонисты стимулировали различные подтипы каппа-опиоидных рецепторов, в том числе и гетеродимерные рецепторные структуры (результат гетеродимеризации каппа- и дельта-рецепторов). Считается, что взаимодействие с гетеромерными каппа-сопряженными рецепторными образованиями может влиять на формирование дисфорических и галлюциногенных свойств каппа-опиоидных агонистов [Le Naour, M., 2014]. Из побочных эффектов отмечались седация, дисфория и нарушения моторики ЖКТ. В качестве анальгетиков ограниченное применение в клинической практике нашли бупренорфин, буторфанол и налбуфин. Также было установлено, что препараты, производные бензоморфана и морфинана с каппа-агонистической активностью, оказывают более выраженное обезболивающее действие у женщин [Craft, R.M., 2003]. Совокупность приведенных данных стала основанием для дальнейшего поиска соединений с каппа-агонистической активностью.

## 1.2 Селективные агонисты каппа-опиоидного рецептора

Значительный шаг в развитии соединений с каппа-рецепторной селективностью действия был сделан компанией Upjohn в 1982 г, с момента открытия способности производных арилацетамида избирательно активировать каппа-опиоидные рецепторы. Первым представителем считается соединение U-50488 [Piersey, M.F., 1989]. Исходя из данных, опубликованных Fletcher, G.H., (1993), вещество оказывает действие на каппа-1-подтип опиоидных рецепторов. Установлено, что ЭД<sub>50</sub> соединения U-50488 на различных экспериментальных моделях от 2 до 10 раз выше, чем у морфина [Rusovici, D.E., 2004]. При этом, вещество не проявляет морфиноподобных негативных сопутствующих эффектов: толерантностью к анальгетическому действию, наркогенным потенциалом и

респираторной депрессией [Rusovici, D.E., 2004]. Соединение U-50488, кроме обезболивания, проявляет диуретический эффект [Gavend, M., 1993], а также устраняет амнестическое действие, вызванное антихолинергическими препаратами [Hiramatsu, M., 1998]. Кроме того, побочными эффектами являются развитие седации и миорелаксирующего эффекта [Paris, J. J., 2011]. Однако клиническая значимость класса производных арилацетамида была ограничена высокой токсичностью вещества U-50488 – ЛД<sub>50</sub> соединения (мыши, внутрибрюшинное введение) равно 25 мг/кг [Kuzeff, R. M., 2004]. Исходя из высокой каппа-рецепторной селективности данное вещество считается «стандартом» при изучении активности новых каппа-опиодных агонистов [Zhou, L., 2013]. Впоследствии, были проведены исследования, направленные на модификацию структуры соединения U-50488, что привело к созданию новых избирательных каппа-рецепторных лигандов (рис. 8).

Соединение GR 89,696 (рис. 8) – синтезировано компанией Глахо в 1993г. Кроме высокой каппа-рецепторной активности, вещество оказывает мощное обезболивающее действие (на мышах, при подкожном введении, в тесте ацетилхолин-индуцированных корчей ЭД<sub>50</sub> соединения составляет 0,00052 мг/кг, выраженная анальгезия наблюдается в диапазоне доз 0,00056-0,0012 мг/кг). Соединение GR 89,696 незначительно угнетает дыхание и моторику ЖКТ в дозе 0,0004 мг/кг [Naylor, A., 1993], а увеличение диуреза вызывает в дозе 0,008 мг/кг. Также вещество проявляет противозудную активность [Ko, M. C., 2009] и выраженную седацию. Предполагается, что соединение GR 89,696 избирательно афинно к каппа-2 подтипу опиоидных рецепторов [Butelman, E.R., 2001; Но, J., 1997; Herrero, J.F., 1993].



**Рисунок 8.** Селективные каппа-опиоидные агонисты, структурно связанные с соединением U-50488 [Barber, A.,1997].

Спиродолин (соединение U-62066) – селективный каппа агонист (рис. 8) [Wadenberg, M.L., 2003], оказывает обезболивающее действие, в среднем в 13 раз более выраженное, чем у соединения U-50488 [Stachura, Z., 1994; Pugsley, M.K., 2000]. Однако вызывает седацию, дисфорию и психотомиметические эффекты, что препятствовало его дальнейшему клиническому продвижению [McDonald, J., 2013; Wadenberg, M.L., 2003]. Усиливает диурез [Rimoy, G. H., 1991].

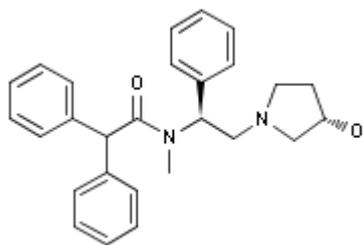
Энадолин (соединение CI-977) – представитель дальнейшей структурной модификации соединения U-50488 (рис. 8), с высокой каппа-рецепторной селективностью и сильной обезболивающей активностью [Clark, C. R., 1988; Boyle, S. J., 1990; Corbett, A. D., 1993; Friese, N., 1997]. Начиная с дозы 160мкг для человека массой 70кг, оказывает выраженное психотомиметическое действие: визуальные и тактильные (тепло, зуд, покалывание) галлюцинации, искажение звукового восприятия, нарушение походки [Walsh, S.L., 2001; Mello, N. K., 2005]. У некоторых людей под воздействием энадолина возникали беспокойство, подозрительность и даже враждебность по отношению к окружающим. Подпороговые дозы вызывают дисфорию, головокружение, визуальные искажения и деперсонализацию. Все психические нарушения полностью исчезают через 1,5-2 часа после введения препарата [Walsh, S.L., 2001].

Психотомиметические расстройства и дисфория многократно становились причиной приостановки клинических испытаний каппа-опиоидных анальгетиков. Однако было установлено, галлюциногенное действие этих веществ связано с их влиянием на дельта-опиоидные рецепторы, или олигогетеротетра/димерные кластеры, образованные из каппа- и дельта-рецепторов [Rosenfeld, R., 2011; Bhushan, R.G., 2004; Bulenger, S., 2005; Rosenfeld, R., 2011]), или влиянием на другие нейромедиаторные системы мозга.

Повышение каппа-рецепторной селективности, как предполагалось ранее, не смогло устранить центральные побочные эффекты, сопутствующие анальгезии. Следующим этапом разработки явилось создание препаратов, селективных каппа-опиоидов, не проходящих через гематоэнцефалический барьер.

Многие каппа-опиоидные агонисты проявляли достаточно хорошие анальгетические свойства в экспериментальных моделях висцеральной боли. Подобный анальгезирующий эффект опосредован периферическим действием. Молекулярные мишени, задействованные на периферии, «включают» каппа-опиоидные рецепторы и, возможно, для некоторых каппа-рецепторных агонистов, дополнительные неопиоидные мишени, такие как натриевые каналы, расположенные на первичных сенсорных афферентах [J-M Rivière, P., 2004]. Анальгезирующий эффект таких соединений усиливается в условиях воспалительной реакции. Предполагается, что это связано с повышением активности киназы PI3K/АКТ. Доказано, и подтверждено данными иммуногистохимического анализа, что ингибирование активности этой киназы ведет к нивелированию противовоспалительных свойств соединения U-50488 [Cunha, T.M., 2012].

Периферический каппа-опиоидный агонист арилацетамидной природы, – азимадолин (рис. 9) [Camilleri, M., 2008; Kivell B., 2010]. Имеет низкую проницаемость через гематоэнцефалический барьер [Camilleri, M., 2008]. Препарат находится на III фазе клинических испытаний в терапии синдрома раздраженного кишечника [Mangel, A.W., 2012]. Высокая эффективность при данной патологии объясняется вовлечением в механизм анальгетического действия, еще и противовоспалительный компонент. Также азимадолин проходит II фазу клинических испытаний как препарат для устранения функциональной диспепсии [Talley, N. J., 2008]. Препарат оказывает дозозависимое влияние на моторику кишечника, в низких дозах понижая тонус, а в высоких наоборот повышая, при этом, не влияя на транзитные свойства [Mangel, A.W., 2012].

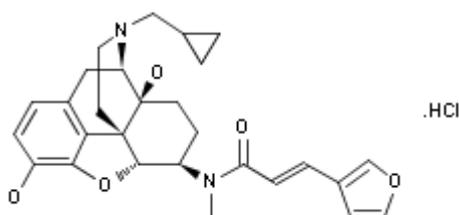


**Рисунок 9.** Структура азимадолина [Tomas & Reuter Integrity, 2011].

В целом, препараты периферического действия, хотя и являются каппа-опиоидными агонистами, характер их обезболивающего действия ограничен конкретными патологическими состояниями, и по степени выраженности существенно уступает классическим опиоидам.

Лишь единицы из множества исследованных соединений с каппа-опиоидной активностью были зарегистрированы и допущены к применению в клинической практике. Многие клинические испытания были прерваны из-за высокой частоты возникновения психоневрологических расстройств [Lemos, J. C., 2011].

Налфурафин (рис. 10), также известный, как соединение AC-820, соединение TRK-820, и Remitch – селективный каппа опиоидный агонист с выраженными противозудными свойствами [Wikström, 2005; Nakao, K., 2008]. Способен проходить через гематоэнцефалический барьер. Налфурафин не вызывает дислептических расстройств [Endoh, T., 2000; Kumagai, H., 2012], а также дисфорических проявлений в высоких дозах [Prisinzano, T.E., 2005]. Может оказывать седативное действие, однако данная активность проявляется в дозах, многократно превышающих анальгетические [Endoh, T., 1999].



**Рисунок 10.** Структура налфурафина [Tomas & Reuter Integrity, 2011].

В последние годы в литературных источниках появляется информация об особом классе каппа-опиоидных агонистов – избирательных активаторов пострецепторных путей (*biased agonists*) [White, K. L., 2015]. Данный класс веществ отличается своей способностью узконаправленно активировать пострецепторные сигнальные пути, ответственные за определенные эффекты каппа-рецепторной активации.

Активация метаботропного каппа-рецептора, как описано в работе Lemos, J.C. (2011), сопряжена с различными путями сигнальной трансдукции. В работах Burchas и Chavkin выдвигается гипотеза о том, что G-белок-зависимый путь (Gi/o [IUPHAR-DB, 2016]) координирует каппа-опосредованную анальгезию, тогда как за развитие дисфорической реакции ответственна митоген-зависимая киназа p38 (p38 MAPK) [Burchas, M.R., 2007]. В одной из последних своих работ Chavkin и Eldrich предлагают при создании веществ с каппа-селективным действием, применять поливалентный подход и добиваться сочетанной активации каппа-опиоидного рецептора и ингибирования активности индуцируемой p38 MAPK, что может существенно снизить риск развития дисфорической реакции [Ehrich, J. M., 2015].

В своей научной работе White выдвигает предположение, что бета-аррестинный путь пострецепторной каппа-опосредованной трансдукции ответственен за развитие седации, ангедонических реакций и, возможно, психодислепсии, тогда как активация G-белок-зависимого пути связана с анальгезией [White, K. L., 2015]. Данное предположение основывается на свойствах соединения RB-64 (22-тиоцианатосальвинорин А) с подобной «предвзятой» активностью в отношении G-белок-ассоциированного пострецепторного каскада [White, K. L., 2015]. Вещество обладает анальгезирующей активностью, но не вызывает седации.

Из этого можно заключить, что поливалентное воздействие на каппа-опиоидные рецепторы и вторичные мессенджеры, ответственные за развитие сопутствующих нежелательных реакций, дает возможность для создания безопасных и эффективных обезболивающих препаратов.

Таким образом, сама по себе высокая избирательность каппа-рецепторных лигандов смогла решить проблему наличия негативных сопутствующих эффектов, сопутствующих активации мю-опиоидных рецепторов. Однако, несмотря на отсутствие способности угнетать дыхание и вызывать лекарственную зависимость, представители данного класса веществ могут провоцировать развитие дисфорической реакции и седации. Только немногие соединения,

представленные в последние годы (TRK-820, RB-64), включая вещества, способные избирательно активировать пострецепторные пути, обладают минимальным риском развития побочных эффектов. Данные факты позволили считать целесообразным дальнейший поиск эффективных и безопасных избирательных агонистов каппа-опиоидных рецепторов.

### **1.3. Производные бензимидазола как основа для получения каппа-опиоидных агонистов**

Анализ структур известных лигандов каппа-опиоидных рецепторов показал, что азот-содержащие гетероциклические молекулярные системы являются привелегированными структурами в отношении взаимодействия с каппа-опиоидными рецепторами [Carlezon, W.J., 2009]. Бензимидазол и его производные также относятся к данным системам [Alamgir, M., 2007]. В настоящее время накоплен литературный материал, указывающий на перспективность класса производных бензимидазола в качестве основы для создания каппа-опиоидных агонистов [Анисимова, В.А., 2009; Гречко, О.Ю., 2012; Sasmal, P. K., 2015; Linz, K., 2014; Spasov, A.A., 2014; Salvadori, S., 2008; Kobayashi, K., 2009; Balboni, G., 2005; Satoh, A., 2009; Калитин, К.Ю., 2015; Mabrouk, O.S., 2014; Thomson Reuters Integrity, 2011; Tsukahara-Ohsumi, 2010].

Совокупная оценка испытаний различных производных бензимидазола, проведенная на кафедре фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета (ВолгГМУ) указывает на то, что данный класс соединений обладает широким спектром различных видов фармакологической активности: тропностью к различным видам рецепторов – гистаминовым [Черников, М.В., 2008], серотониновым [Яковлев, Д.С., 2007; Горягин, И.И., 2008; Анисимова, В.А., 2012], пуриновым [Стуковина, А.Ю., 2006], опиоидным [Елисеева Н.В., 2010; Елисеева Н.В., 2011; Гречко О.Ю., 2012], а также проявляют антигликирующую, антиагрегантную, гиполипидемическую активностью [Анисимова, В.А., 2015].

Предварительные *in vitro*, *in silico* и *in vivo* испытания, проведенные на базе кафедры фармакологии ВолгГМУ, позволили выявить вещество с избирательной каппа-рецепторной агонистической активностью и обезболивающим действием – дигидрохлорид 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-а]-бензимидазола (соединение с лабораторным шифром РУ-1205) [Спасов, А.А., 2013; Пат.РФ № 2 413 512 С1 от 29.072009 г.; Спасов, А.А., 2014; Гречко, О.Ю., 2012; Спасов, А. А., 2014(1)].

Представленные данные послужили предпосылкой к поиску и изучению эффектов соединения РУ-1205, сопутствующих каппа- и мю-рецепторной активации.

## Глава 2. Материалы и методы исследования

### 2.1 Материалы исследования

При проведении экспериментальных исследований были использованы следующие реактивы: 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), пикротоксин («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).

Объектом исследования явилось соединение под лабораторным шифром РУ-1205 – дигидрохлорид 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-a]бензимидазола. Данное вещество синтезировано и предоставлено ЗАО «ЭМПИЛС-ФОХ» (г.Ростов-на-Дону).

Эксперименты проведены 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. Животные предоставлены следующими питомниками: 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 международным 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 так же 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 экспериментальной работы использованы в соответствии с методическими рекомендациями по изучению веществ с анальгетической активностью Т.А.Ворониной и соавторов (2012). Болевая чувствительность грызунов оценена в тесте «горячая пластина» [Le Bars, D., 2001]. Обезболивающее действие соединения РУ-1205 изучалось на мышах в диапазоне доз 0,001–100 мг/кг, при внутрибрюшинном введении. Сопутствующие эффекты, ассоциированные с активацией опиоидных рецепторов, оценивались на мышах и крысах при различных путях введения. В тесте определения частоты дыхательных движений за минуту эффекты соединения РУ-1205 и буторфанола исследовались в диапазоне доз 0,1-100 мг/кг (внутрибрюшинно) [Ворониной, Т.А., 2012]. Формирование физической зависимости проводилось по схеме Ворониной Т.А. (2012). На указанной модели исследованы эффекты вещества РУ-1205, морфина и буторфанола. Провокация абстинентного синдрома осуществлялась введением налоксона в дозе 10 мг/кг подкожно [Fernandes, M., 1977]. Аддиктивная и аверсивная активность вещества РУ-1205 изучалась в тестах по оценке «первичных» и «вторичных» стимульных свойств. «Первичное» стимульное

действие соединения РУ-1205 исследовалось на крысах в тестах лекарственной дифференцировки и электрической самостимуляции зон «награды» головного мозга, и на мышах в тесте внутривенного самовведения, и сопоставлялось с эффектами буторфанола [Кузьмин, А.В., 1991; Vespalov, A.Yu., 1996; Shabanov, P.D., 2011 (1)]. «Вторичная» стимульная активность соединения РУ-1205 оценивалась в тесте условной реакции избегания места (УРИМ) [Prus, A. J., 2008; Mallet, P.E., 1998]. Общий депрессивный компонент, ассоциированный с дисфорическими расстройствами изучался на модели модифицированного форсированного неизбежного плавания [McLaughlin, J.P., 2003]. Анальгетическая толерантность объекта исследования изучалась и сопоставлялась с таковой буторфанола и морфина в диапазоне доз 1-50 мг/кг при подкожном и пероральном путях введения. Оценка влияния вещества РУ-1205 на моторную активность ЖКТ проводилась в диапазоне доз 0,1-10 мг/кг при внутрибрюшинном введении, и сопоставлялась с таковой буторфанола и морфина [Varamini, P., 2013]. Седативное действие соединения РУ-1205 исследовалось и сопоставлялось с активностью буторфанола в методиках актометрии и «удержания на вращающемся стержне» в дозах 0,1-100 мг/кг [Vanderah, T.W., 2004; Careau, V., 2012]. Механизм действия вещества РУ-1205 изучался *in vitro* на моделях электроиндуцированных сокращений изолированных органов, с применением селективных и неселективных опиоидных антагонистов [Coupar, I.M., 1995; Ока, Т., 1981], и *in vivo* на модели «горячая пластина» в условиях блокады анальгетического эффекта селективным антагонистом каппа-опиоидного рецептора норбиналторфимином [Воронина, Т.А., 2012]. Соединение РУ-1205 вводилось внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг, на модели изолированных органов эффекты вещества РУ-1205 и препаратов сравнения буторфанола и морфина, а также соединения U-50488 оценивались в диапазоне концентраций  $10^{-9}$ - $10^{-3}$  М. Влияние соединения РУ-1205 на эффекты нейромедиаторных анализаторов изучалось в дозовом диапазоне 1-100 мг/кг при внутрибрюшинном пути введения [Андреева, Н.И., 2005; Воронина, Т.А., 2012]. Дополнительные нейропсихотропные свойства изучались в модифицированном комплексе

нейротоксикологических тестов Ирвина в дозах 0,1-100 мг/кг при внутрибрюшинном пути введения [Irwin, S.,1968].

## **2.2 Общие подходы к изучению фармакологических свойств агонистов каппа-опиоидного рецептора**

В соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению активности веществ с анальгетической активностью Ворониной, Т.А. и соавторов (2012), методология данных исследований должна включать в себя методы по оценке анальгетического действия, методы для изучения сопутствующих и нежелательных эффектов, характерных для опиоидных анальгетиков, включая влияние на ЧДД, моторику ЖКТ, температуру тела, выявления наркотического потенциала, исследования механизмов фармакологической активности, а также дополнительных нейрорепродуктивных свойств.

## **2.3 Методика оценки обезболивающей активности**

Анальгетическое действие изучалось на модели «горячая пластина». Животные помещались на разогретую до 55°С медную пластину диаметром 15 см, окруженную пластиковым цилиндром. Фиксировалось латентное время ноцицептивной реакции в виде облизывания задних лап, которая появляется у грызунов с достижением порога болевой чувствительности [Le Bars, D., 2001]. Время максимальной экспозиции составляло 30 секунд. Критерием анальгетического эффекта считалось статистически значимое увеличение времени возникновения ноцицептивной реакции после введения соединений в сравнении с контролем. По результатам экспериментальной работы строилась зависимость «доза-эффект» и определялись показатели максимально-возможного эффекта% (МВЭ %), а на основе данного показателя определялось значение ЭД<sub>50</sub>. Показатель МВЭ рассчитывался по формуле:

$$\%МВЭ = \frac{ЛП_0 - ЛП_к}{30 - ЛП_к} \times 100\%, \text{ где}$$

ЛП<sub>0</sub> – латентный период ноцицептивной реакции в опытных группах;

ЛП<sub>к</sub> – латентный период ноцицептивной реакции в группе контроля;

30 – максимальное время экспозиции, составлявшее 30 секунд [Karami, R., 2011].

## 2.4 Методика изучения механизма обезболивающей активности

В соответствии с методическими рекомендациями по изучению анальгетической активности лекарственных средств [Воронина, Т.А., 2012], для установления механизма действия нового обезболивающего вещества рекомендуется определить его нейрорецепторный профиль, а также сдвиги нейромедиаторного баланса. Изучение рецепторного профиля вещества, обладающего опиоидной активностью, должно проводиться *in vivo*, в антиноцицептивных тестах с применением антагонистов, а также *in vitro*. В связи со спецификой работы, описание методики оценки влияния веществ на эффекты нейромедиаторных систем вынесено в отдельную подглаву (подглава 2.6).

### Исследование механизма обезболивающего действия *in vivo*\*

Механизм обезболивающей активности изучался на модели «горячая пластина» по изменению активности тестируемого вещества на фоне селективного блокатора каппа-опиоидного рецептора норбиналторфимина. Подопытные животные делились на опытные и контрольные группы. Опытным группам грызунов вводились тестируемое вещество и норбиналторфимин, группам интактного контроля – только физиологический раствор, а животным из группы положительного контроля – только объект исследования. Техника проведения теста «горячая пластина» описана в подглаве 2.2.

---

\* - выражаем благодарность за помощь в проведении исследований к.фарм.н. Рашенко А.И. и к. фарм. н. Штаревой Д.М.

Критерием связи анальгезии с активацией каппа-рецептора являлось норбиналторфимин-обратимые обезболивающие эффекты исследуемых веществ.

### **Изучение механизма обезболивающей активности *in vitro***

Изучение механизма фармакологической активности проводилось *in vitro* на изолированных тканях подвздошной кишки крысы (ПКК) (мю- и дельта-опиоидные рецепторы широко представлены в ганглионарных нейронах, подслизистом и миэнтеральном сплетениях кишечника [Gray, A.C., 2005; Gray, A.C., 2006; Fujita, W., 2014]), и изолированном отрезке семявыносящего протока кролика (СПК)\* (представлена гетерогенная популяция каппа-опиоидных рецепторов [Makó, E., 2001; Lattanzi, R., 2001; Oka, T., 1981]).

### **Метод поиска мю- и дельта-агонистического действия на модели подавлений электроиндуцированных сокращений изолированной подвздошной кишки крысы\***

Исследования выполнялись на изолированных препаратах ПКК нелинейных крыс-самцов по методу Coupar I.M. [Coupar, I.M., 1995]. Экспериментальная работа проводилась на установке для работы с изолированными органами и тканями лабораторных животных Ugo Basile (Италия). Подопытные животные содержались в условиях 24-часовой пищевой депривации. Перед началом эксперимента грызуны декапитировались, после чего производилось вскрытие брюшной полости и извлечение фрагмента подвздошной кишки длиной 30 см (отступ от слепой кишки составлял не менее 10 см). После получения, препарат помещался в теплый раствор Кребса (118 мМ NaCl; 2,54 мМ CaCl<sub>2</sub>; 4,75 мМ KCl; 1,19 мМ KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>; 25 мМ NaHCO<sub>3</sub>; 11 мМ глюкоза).

---

\* - выражаем благодарность за помощь в проведении исследований к.фарм.н. Ращенко А.И. и к. фарм. н. Штаревой Д.М.

Электростимуляция препарата осуществлялась супра-максимальными 40 V прямоугольными импульсами электрического тока продолжительностью 1 мсек и частотой 10 Гц, 8-секундными сериями, генерируемыми стимулятором ЭСЛ-2 (Россия). Серии импульсов подавались с интервалом в 3 минуты. Исследуемые вещества в возрастающих концентрациях вводились в ванночку с препаратом. Для установления механизма возможного эффекта часть препаратов ПКК преинкубировалась с налоксоном (неизбирательный блокатор опиоидных рецепторов). Налоксонообратимое устранение электроиндуцированных сокращений изолированной ПКК под действием исследуемых веществ считалось критерием наличия мю- и дельта-агонистической активности.

**Метод оценки каппа-агонистического действия на модели подавления  
электроиндуцированных сокращений изолированного семявыносящего  
протока кролика**

Эксперимент проводился на изолированных препаратах СПК. Перед экспериментом участок протока длиной 10-15 мм удалялся у наркотизированного животного в процессе хирургической кастрации, и переносился в теплый раствор Кребса до проведения эксперимента (118 mM NaCl; 2,54 mM CaCl<sub>2</sub>; 4,75 mM KCl; 1,19 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 11 mM глюкоза). Исследования проведены на установке для работы с изолированными органами фирмы Ugo Basile (Италия). Перед проведением эксперимента препарат помещался в ванночку объемом 10 мл, с подогретым до 37°C раствором Кребса. Участок СПК закреплялся между электродами, подключенными к аппарату ЭСЛ-2 (Россия) генерирующему импульсы электрического тока (аналогично описанному в предыдущем подпункте). После фиксации проводилась регистрация исходного электростимулированного сократительного ответа. Затем в ванночку в возрастающих концентрациях добавлялись исследуемые вещества, и регистрировалось изменение сократительной активности. Для выявления механизма возможного каппа-агонистического эффекта, часть препаратов СПК

преинкубировалась с норбиналторфимином (селективный каппа-рецепторный антагонист). Наличие норбиналторфимин-обратимого ответа на введение вещества считалось критерием каппа-опиоидной активности.

## **2.5 Изучение сопутствующих и нежелательных эффектов, связанных с активацией мю- и дельта-опиоидных рецепторов *in vivo***

В источниках литературы имеются многочисленные сведения, что активация мю- и дельта-рецепторов, а в некоторых случаях и межрецепторных гетеромеров [Fujita, W., 2014], в условиях целостного организма сопровождается не только развитием антиноцицепции, но и нежелательными эффектами [Traynor, J.R., 1993; Matthes, H.W., 1998; Khansari, M., 2013]. К числу наиболее значимых из них для клинического применения относятся угнетение дыхания, наркотический потенциал и замедление пропульсивной активности ЖКТ. Также, в источниках литературы имеется информация, что эти рецепторы обладают способностью активировать одни и те же серпентинные мессенджеры, вызывая смежные эффекты в условиях *in vivo* [Alt, A., 2002; Matthes, H.W., 1998; Traynor, J.R., 1993].

### **Метод изучения влияния на дыхание**

В соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению веществ, обладающих анальгетической активностью [Воронина, Т.А., 2012], критерием оценки дыхательной функции грызунов был избран показатель частоты дыхательных движений за минуту (ЧДД/минута). Проводилась регистрация экспериментальных данных во временных точках 30, 60, 120 и 180 минут после введения. Признаком развития дыхательной депрессии служило статистически значимое снижение показателя ЧДД/минута у грызунов опытных групп при сравнении с контролем.

## Тест по оценке влияния на моторику желудочно-кишечного тракта

Моторика ЖКТ оценивалась путем измерения скорости продвижения «меток» по тонкому кишечнику (в качестве метки использовалась 5% взвесь активированного угля в дистиллированной воде) [Varamini, P., 2013]. За 60 мин до интрагастрального введения «метки» грызунам вводились исследуемые вещества. Через 30 минут после введения «метки» проводилась декапитация, и изоляция отрезка ЖКТ мышей от пилорического отдела желудка до слепой кишки. Измерялась общая длина изолированного отдела (см) и длина пути, пройденного «меткой» (см).

Результаты эксперимента представлялись в виде индекса перистальтики (ИП), рассчитывавшегося по формуле:

$$\text{ИП} = (O)/(П) * 100\%, \text{ где}$$

O – общая длина кишечника (см), П – длина отрезка кишечника, заполненного активированным углем (см).

В источниках литературы описывается, что активация мю- и дельта-, но не каппа-опиоидных рецепторов, вызывает значительное замедление пропульсивной активности ЖКТ [Mangel, A.W., 2012; Chamouard, P., 1998; Giuliani, S., 1996; Elizabeth, L., 2008].

### Метод выявления физической зависимости\*

Развитие физической зависимости осуществлялось внутрибрюшинным введением веществ 2 раза в день в течение 5 дней по схеме: 3 инъекции по 50 мг/кг, 3 - по 75 мг/кг и 3 - по 100 мг/кг [Воронина, Т.А., 2012]. Вещества вводились в смеси с физиологическим раствором из расчета 0,1 мл/10 г массы тела животного. Экспериментальные животные контрольной группы получали эквивалентный объем физиологического раствора.

---

\* - выражаем благодарность за помощь в проведении исследований к.фарм.н. Ращенко А.И. и к. фарм. н. Штаревой Д.М.

Синдром отмены провоцировался налоксоном (10 мг/кг, подкожно) через 5 часов после последней инъекции веществ. Критерием развившейся абстиненции считались «рецессивные» и «доминантные» проявления абстиненции [Walker, E. A., 2005]. По Walker и Sterious, к «доминантным» признакам синдрома отмены относятся прыжки, а к «рецессивным» – тремор в виде «барабанного боя», встряхивания головой, стук зубами, диарея и птоз. Выраженность проявлений оценивалась на протяжении часа после инъекции налоксона. Также регистрировалась масса грызунов на 5 день до и через 2 часа после введения налоксона. Критерием наличия синдрома отмены считалось выявление признаков абстиненции. О тяжести состояния судили по выраженности «доминантных» и частоты встречаемости «рецессивных» признаков.

### **Метод оценки толерантности к анальгетическому эффекту**

Формирование толерантности к анальгетическому эффекту проводилось при подкожном и пероральном ведении веществ в течение двух недель два раза в день [Gringauz, M., 2001]. Регистрация анальгетического ответа оценивалась на модели «горячая пластина» (пункт 2.3). Критерием развития толерантности к обезболивающему эффекту считалось снижение анальгетического действия в опытной группе, 2 недели получавшей исследуемое вещество и референтные препараты (морфин и буторфанол), относительно контрольной группы, получавшей только растворитель и в день тестирования впервые получившей вещество [Воронина, Т.А., 2012].

## **2.6 Изучение сопутствующих эффектов, связанных с активацией каппа-опиоидных рецепторов *in vivo***

Опиоидная нейромодуляторная система в целом, и в частности каппа-опиоидные рецепторы, вовлечены в модуляцию работы структур ЦНС, ответственных за проявления различной психоэмоциональной активности

(миндалины, прилежащие ядра, область покрышки и др. [Shabanov, P.D., 2011 (3)], 2011]). Известно, что избирательные каппа-рецепторные агонисты, воздействуя на ЦНС, вызывают седацию, мотивационные расстройства, апатия, ангедонию, дисфорические проявления, сходные с депрессивно-дисфорическим расстройством [Cahill, C.M., 2014; Lalanne, L., 2014].

### **Оценка седативного действия**

Изменение психоэмоциональной активности в условиях *in vivo* сопровождается сопутствующим изменением локомоции [Jentsch, J.D., 1999; Heldt, S.A., 2010]. В данном экспериментальном блоке оценена активность на моделях «удержания на вращающемся стержне» и спонтанной локомоторной активности в актометре (актометр Ugo Basile, Италия). Данные тесты широко используются для изучения влияния новых соединений на ЦНС-опосредованную седацию, неспецифические двигательные реакции [Vanderah, T.W., 2004; Careau, V., 2012].

### **Метод изучения седативной активности в актометре**

Через 30 минут после инъекции веществ, грызуны помещались в одноканальный актометр с автоматической регистрацией (Ugo Basile, Италия) на 5 минут, где в отсутствии внешнего воздействия им предоставлялась возможность свободного перемещения по камере установки. Регистрировалось суммарное количество двигательной активности животных в установке. Критерием седативного действия веществ явилось статистически значимое снижение показателя спонтанной локомоции по сравнению с группой контроля.

## **Метод оценки седативной активности на модели удержания мышей на вращающемся стержне**

Через 30 минут после введения веществ, грызуны помещались на стержень, вращающийся со скоростью 10 оборотов в минуту, и регистрировалось время удержания. Максимальное время регистрации составляло 180 секунд. Критерием седативного действия служило статистически значимое уменьшение времени удержания на стержне [Tsukahara-Ohsumi, Y., 2011].

## **Выявление комплекса эффектов, соотносимых с депрессивно-дисфорическими расстройствами в клинических испытаниях, присущими селективным агонистам каппа-опиоидных рецепторов**

К комплексу психоэмоциональных расстройств, присущих селективным каппа-рецепторным агонистам, относятся дисфория, депрессивные проявления, ангедония, снижение мотивации и др. [Lemos, J.C., 2010]. Направленность описываемых в данном пункте моделей фокусируется на оценке аверсивной реакции грызунов в ответ на изолированную активацию каппа-опиоидных рецепторов в ЦНС. Характерным для селективных каппа-опиоидных агонистов свойством является формирование интероцептивных стимулов, соответствующих дисфорической реакции человека, ведущих к развитию аверсии *in vivo*. Аверсивная реакция у лабораторных животных является маркером состояния, аналогичного дисфории человека [Bruchas, M. R., 2007]. Основные методики, описываемые в данном пункте, и их характеристика, приводятся в работе Беспалова, А.Ю. и Звартау, Э.Э. (2000).

## **Оценка аверсивного действия на модели условной реакции избегания места**

Методика является рекомендованной моделью для доклинической оценки активности веществ, соответствующих формированию дисфорических явлений в клинических испытаниях [Bruchas, M.R., 2007]. Нейтральные обстановочные раздражители в сочетании с «наказующим» эффектом могут приобретать собственные «аверсивные» свойства, на базе которых вырабатываются инструментальные реакции второго и более высоких порядков (условнорефлекторная реакция избегания места – УРИМ) [Prus, A.J., 2008]. Выявление аверсивной активности проводилось по методу, описанному Р.Е.Mallet [Mallet, P.E., 1998]. Исследование включало этапы обуславливания и тестирования и проводилось в двухотсекowej камере с различной фактурой и цветом пола и стенок. При обуславливании, вещества и растворитель вводились опытным группам, после чего грызуны помещались в один из отсеков камеры на 30 минут без возможности перехода между отсеками: в отсек Б после введения веществ с предполагаемой активностью, и в отсек А после введения нейтрально-воспринимаемого физиологического раствора. Контрольной группе вводился только физиологический раствор, после чего она помещалась в те же отсеки. Всего было проведено 8 сессий обуславливания в течение 4х дней. Через 72 часа после последнего обуславливания, животные помещались в ту же камеру с возможностью перемещаться между отсеками в течение 900 секунд. Регистрировалось время нахождения животного в каждом отсеке установки. Избегание животными камеры, ассоциированной с введением вещества, считалось критерием развития аверсии.

## **Оценка депрессивного компонента действия на модели форсированного неизбежного плавания**

Для оценки данного вида активности была избрана методика повторного форсированного неизбежного плавания по Porsolt в модификация McLaughlin [McLaughlin, J.P., 2003; Porsolt, R.D., 1977]. Экспериментальная установка представляла собой 5 объединенных камер-цилиндров из плексигласа высотой 40 см и диаметром 20 см, подключенных к системе видеонаблюдения. Цилиндр заполнялся водой ( $t^0 \sim 22-25^0\text{C}$ ). Эксперимент включал два этапа (обучение и тестирование). При обучении животные помещались в указанные камеры на 15 минут. На этапе тестирования (на следующий день) за 60 минут до помещения грызунов в цилиндр с водой вводились исследуемые вещества. Время экспозиции грызунов составляло 5 минут в каждый из 4х последующих экспериментальных сессий. Регистрировалось время «активного сопротивления», т.е. продолжительности попыток животного покинуть пределы экспериментальной установки, включая активное плавание и прыжки. Значимое сокращение времени активного сопротивления являлось критерием наличия депрессивного компонента действия исследуемых веществ.

## **Выявление дисфорического и ангедонического действия на модели электрической самостимуляции зон системы «награды»\***

Вентральная тегментальная область через сеть нейрональных контактов связана с участками мозга, координирующими развитие аверсии, в частности прилежащими ядрами [Cahill, S.M., 2014]. Применение методики реакции электрической самостимуляции зон «награды» обусловлено валидностью модели для выявления аверсивных свойств веществ [Stoker, A., 2011; DiNieri, J.A., 2009; Diotte, M., 2001].

---

\* - работа проведена на базе НИИ фармакологии имени А.В. Вальдмана ПСПбГМУ имени И.П. Павлова, под руководством директора НИИ фармакологии имени А.В. Вальдмана, профессора, д.м.н., Эдвина Эдуардовича Звартау, за что выражаем благодарность и глубокую признательность.

Работа проведена в автоматизированных звукоизолированных оперантных камерах Скиннера (РИТЕК, Россия), подключенных к компьютеру, источника импульсного тока – РНВ-150В (прямоугольные биполярные импульсы 100 Гц, 0,1 мс; MED Associates, США). Имплантация электродов (диаметр – 0,2 мм; Plastics One, США) в вентральную тегментальную область осуществлялась под общей анестезией (90 мг/кг кетамина и 10 мг/кг ксилазина). Послеоперационная реабилитация продолжалась 5 дней, после чего проводилось титрование величины порогового стимула. Тестируемые вещества/растворитель, вводились грызунам за 30 и 120 мин до начала теста. Каждая сессия состояла из десяти последовательностей серий убывания и возрастания интенсивности стимуляции с шагом интенсивности 0,01 логарифмической единицы. Определялись пять значений порогов по убывающим последовательностям серий и пять по возрастающим, среднее значение этих десяти значений и составляло пороговое значение стимуляции, требуемое для поддержания оперантной реакции животного в экспериментальной сессии. Снижение пороговых значений являлось критерием наличия аддиктивности тестируемого вещества. Количество тестов не превышало двух за неделю [Воронина, Т.А., 2012; Shabanov, P.D., 2011; Bernalov, A.Yu., 1996; Diotte, M., 2001; Stoker, A., 2011; Шабанов, П. Д., 2009].

### **Оценка первично-подкрепляющих свойств в тесте внутривенного самовведения\***

В данном эксперименте давалась оценка дисфорическому компоненту действия в условиях «первичной» ассоциации вводимого вещества с его аддиктивным или аверсивным действием. Экспериментальная установка состояла из тестовых камер (8 см х 8 см х 8 см, матовый плексиглас), в которых размещались подопытные мыши [Кузьмин, А.В., 1991]. Камеры были спарены между собой по две в блок.

---

\* - работа проведена на базе НИИ на базе НИИ фармакологии имени А.В. Вальдмана при ПСПбГМУ имени И.П. Павлова, под руководством Эдвина Эдуардовича Звартау, за что выражаем благодарность и признательность.

С фронтальной стороны в камерах на уровне 0,5 см от пола размещалось отверстие для выглядывания со встроенным фотодатчиком, который был связан с компьютером. Через компьютер, связанный с фотодатчиком, координировалась работа двухшприцевого микроинъектора с шаговыми двигателями, активирующегося в ответ на выглядывание в отверстие. Введение раствора веществ в организм грызунов осуществлялось через катетеризированную стальной канюлей от иглы для подкожного введения латеральную хвостовую вену (дозированные микроинъекции, 1,6 мкл раствора каждая, в ответ на акт выглядывания). Протокол эксперимента включал претест, в процессе которого выявлялись пары животных с приблизительно одинаковым уровнем выглядывания через отверстие, и тестовую сессию, когда в ответ на выглядывание животные получали вещества [Воронина, Т.А., 2012]. Претест длился 10 минут, тестовая сессия – 30 минут. В процессе теста, обоим грызунам проводились микроинфузии, но сигналом к этому служили выглядывания только активной мыши из пары. Второй грызун, получавший инфузии при акте выглядывания своего соседа по боксу, именовался пассивным.

Регистрировалось число выглядываний активной и пассивной мыши каждой подопытной пары. Исходя из полученных данных высчитывался критерий самовведения  $R$ , вычисляемый по формуле:

$$R = \lg A_2 / \Pi_2 - \lg A_1 / \Pi_1,$$

где  $A_1$  и  $A_2$  - количество выглядываний у активной мыши в претесте и тестовой сессии, а  $\Pi_1$  и  $\Pi_2$  – аналогичные значения пассивного партнера экспериментальной пары.

Критерием подкрепляющего действия считалось повышение или понижение  $R$  относительно аналогичного показателя контрольной экспериментальной пары, которой давались микроинфузии изотонического раствора  $\text{NaCl}$ , а также по показателю кумулятивной дозы (совокупная доза тестируемого вещества, введенная за весь период тестовой сессии). Рост регистрируемых показателей соответствовал положительному подкреплению, снижение – напротив – отрицательному. Отрицательное подкрепление ассоциировалось с проявлением

веществом дисфорической активности. В литературных источниках описана корреляция результатов реакции выработки внутривенного самовведения и УРИМ [Prus, A. J., 2008].

### **Метод изучения дискриминантных подкрепляющих свойств\***

Аппаратная установка представляла из себя звукоизолированные оперантные камеры, снабженные двумя педалями (РИТЕК, Россия), подключенные к компьютеру (программное обеспечение для фиксации данных – MED-PC; MED Associates, Inc., США). В каждой камере, равноудалено от обеих педалей, на высоте 19 см от дна, находился источник света. Педали располагались на 12 см ниже уровня источника света. Каждая камера была оборудована кормушкой, через которую поставлялись пищевые пеллеты ( $m=45$  мг, формула 5TUM, TestDiet, США). Введение веществ осуществлялось за 30 минут до теста. На первой фазе этапа обучения грызунам прививался навык оперантной реакции нажатия на педаль, которая в дальнейшем ассоциировалась с инфузиями физиологического раствора. В режиме подкрепления нажатие на педаль сопровождалось получением пищевой пеллеты. Пеллетой подкреплялось каждое нажатие. Выработка оперантной реакции и закрепление (через 1-3 дня) сопровождалась изменением соотношения нажатий и подкреплений с 1:1 до 1:10. Вторая фаза обучения сводилась к формированию аналогичной оперантной реакции у грызунов, но уже ассоциированную с второй педалью, которая в дальнейшем будет связана с введением препарата сравнения – буторфанола. Впоследствии соотношение нажатий и подкреплений также снижалось с 1:1 до 1:10.

Перед проведением следующего этапа крысам подкожно вводился буторфанол в тренировочной дозе или физиологический раствор, после чего грызунов возвращали в клетки постоянного содержания.

---

\* - работа проведена на базе НИИ на базе НИИ фармакологии имени А.В. Вальдмана при ПСПбГМУ имени И.П. Павлова, под руководством Эдвина Эдуардовича Звартау, за что выражаем благодарность и признательность.

Экспериментальные сессии с препаратом сравнения (Н) и физиологическим раствором (Ф) проводились в следующей последовательности, в течение двух месяцев: (1) ФНФНФН, НФФНФФ, НННФНФ, ФННФНФ; (2) НФНННФ, ФННННН, ФФФНФФ, НФФННФ. При обучении грызунов оперантной реакции применялась инверсия педалей.

По прошествии получаса с момента введения веществ, животные вновь изымались из клеток домашнего содержания и перемещались в оперантные камеры на 15 минут. Во время сессий животное имело свободный доступ к обеим педалям. Однако пищевое подкрепление выдавалось только после нажатия на ту, которая соответствовала вводимому веществу. Соотношение нажатий и подкреплений соответствовало 1:10, при этом последовательность нажатий носила накопительный характер, что значит, если животное нажимало противоположную веществу педаль, условия для подкрепления приходилось выполнять сначала.

Обучающие сессии продолжались, до тех пор, пока в течение десяти последовательных сессий не были соблюдены условия: 1) первые десять нажатий подряд были сделаны на подкрепляемую педаль; 2) более 90% всех нажатий за период сессии было сделано на подкрепляемую педаль.

При соблюдении приведенных условий, начинали проводиться тестовые сессии, призванные для получения данных о зависимости «доза-эффект» для препарата сравнения и тестов генерализации («замещения») после введения объекта исследования. В течение теста 10 нажатий подряд на любую из педалей приводило к получению подкрепления. Условия для проведения последующих тестов: 1) в течение предыдущих сессий любого типа (Ф и Н) первые десять нажатий подряд были сделаны на подкрепляемую педаль; 2) более 90% всех нажатий приходилось на подкрепляемую педаль; 3) частота нажатий на педали в предыдущих сессиях превышала 0,2 нажатия в секунду. Каждое животное повторно проходило контрольные тестирования с введением растворителя или тренировочной дозы препарата сравнения до тех пор, пока не были завершены два

последовательных теста, удовлетворяющие вышеперечисленным критериям. Порядок проведения тестов определяли по схеме «латинский квадрат».

## **2.7 Методика изучения взаимодействия с эффектами анализаторов нейромедиаторных систем *in vivo***

В работе Pasternak, G.W. (2011), описывается, что абсолютное большинство нейротропных средств с локализацией действия в ЦНС, к которым относятся и центральнодействующие агонисты каппа-опиоидных рецепторов, влияют на нейромедиаторный баланс мозга. Выяснение зависимости центральных фармакологических эффектов со смещением нейромедиаторного баланса является важным этапом доклинического изучения таких веществ. Тесты соответствующей направленности входят в комплекс необходимых методов для изучения свойств веществ с опиоидным механизмом действия, входящих в методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств [Воронина, Т.А., 2012].

### **Тест воздействия на каталептогенный эффект галоперидола**

Методика направлена на выявление взаимодействия эффектов центрального D<sub>2</sub>-блокатора галоперидола и тестируемого соединения. В условиях *in vivo* при наличии положительной связи может наблюдаться усиление галоперидол-индуцируемой каталепсии, а при отсутствии такового – ослабление. Тестируемое вещество вводилось грызунам внутривентриально за 60 минут до подкожного введения галоперидола (1 мг/кг). Для растворения всех использованных веществ применялся физиологический раствор. Через 20 минут после введения галоперидола грызуны располагались в позе «лектора» передними лапами на стержне, закрепленном на высоте 4 см и диаметром 0,5 см, и подсчитывалось время удержания данной позы. Продолжительность сохранения навязанной позы

коррелирует с глубиной каталептического ступора. При изменении позы животным, ему повторно придавалась данная поза, но не более 5 раз. Максимальная длительность наблюдения составляла 2 минуты. Критерием центрального D<sub>2</sub>-блокирующего/миметического воздействия считалось увеличение продолжительности/сокращение времени пребывания грызунов в позе «лектора».

### **Метод воздействия на эффекты фенамина**

Фенамин оказывает множественное действие на ЦНС, потенцируя активность центральной адренергической, дофаминергической и серотонинергической систем, оказывает психостимулирующее действие. В условиях *in vivo* это проявляется стереотипными реакциями, одной из которых является увеличение спонтанной двигательной активности. Вероятно, это связано с усилением дофаминергической нейротрансмиссии в мезолимбической системе головного мозга. Потенцирование психостимулирующего эффекта фенамина и исследуемого вещества может наблюдаться при наличии центрального миметического действия у тестируемого соединения в отношении указанных нейромедиаторных систем, равно как и функциональный антагонизм – при наличии блокирующего действия. Метод позволяет оценить изменение эффектов фенамина на фоне действия веществ. Опытные группы получали возрастающие дозы исследуемого вещества и фенамин, контрольные – не получали вещества, при этом одна из них получала ту же дозу фенамина что и опытные, а другая – только физиологический раствор. После этого в течение 5 минут регистрировался показатель спонтанной двигательной активности в одноканальном актометре (Ugo Basile, Италия). Критерием наличия дофаминомиметического/блокирующего эффекта считалось количественное увеличение/уменьшение двигательной активности мышей относительно группы, получавшей только фенамин.

## **Тест воздействия на апоморфин-индуцированную стереотипию**

Данный тест позволяет оценить способность веществ блокировать дофаминергическую нейротрансмиссию nigростриарной системы.

Опытные группы грызунов получали исследуемое вещество и апоморфин, а контрольная – только апоморфин. Введение нейромедиаторного анализатора осуществлялось в дозе 1 мг/кг подкожно через 30 минут после вещества, а еще через 20 минут регистрировалась интенсивность стереотипных реакций: принюхивания, покусывания, зевания, лизания, горизонтальные покачивания головы, стойки, прыжки. Полуколичественная оценка признаку давалась в соответствии со шкалой, приведенной в методических рекомендациях по изучению анальгетической активности лекарственных средств [Воронина, Т.А., 2012]. Шкала регистрации стереотипии: 1 – единичные стереотипные движения; 2 – нестойкая стереотипия; 3 – стойкая отвлекаемая стереотипия; 4 – стойкая неотвлекаемая стереотипия. Отвлекаемость определялась методом выявления «стартл-реакции». Критерием дофаминоблокирующего действия считалось статистически значимое уменьшение интенсивности стереотипии.

## **Метод оценки взаимодействия с эффектами L-ДОФА**

Экспериментальная модель применяется для поиска MAO-ингибирующей активности у тестируемого вещества. В условиях эксперимента данная активность проявляется по способности индуцировать стереотипию при совместном введении с низкими дозами L-ДОФА (100-150 мг/кг), характерную только для высоких доз анализатора (500 мг/кг). Таким образом, выявляется способность тестируемого вещества нарушать моноаминоксидазную систему утилизации дофамина [Андреева, Н.И., 2005; Vakhitova, Iu.V., 2004].

Опытным группам вводилось исследуемое вещество. Группы контроля вместо вещества получали физиологический раствор в эквивалентном объеме. Растворение L-ДОФА осуществлялось с добавлением TWIN, и вводилось

внутрибрюшинно в дозе 100 мг/кг опытным группам и группе негативного контроля, и в дозе 500 мг/кг группе позитивного контроля. Введение анализатора осуществлялось через 30 минут после введения тестируемого вещества/физиологического раствора. С момента введения L-ДОФА в течение 140 минут регистрировались проявления стереотипии. Интервалы между регистрациями составляли 35 минут [Андреева, Н.И., 2005]. Балльная шкала стереотипии по Т.А. Ворониной (2012): 0 баллов – отсутствие стереотипии; 1 балл – отдельные стереотипные движения, в том числе непостоянное принюхивание; 2 балла – непродолжительно длящаяся интенсивная стереотипия, в том числе лизание и грызение; 3 балла – постоянная и интенсивная стереотипия [Воронина, Т.А., 2012]. Критерием проявления активности на модели считалось статистически значимое возрастание количества баллов стереотипии в опытных группах по сравнению с негативным контролем.

### **Тест взаимодействия с эффектами никотина**

В данном эксперименте изучается способность веществ изменять активность н-холинорецепторов нервно-мышечных синапсов, активированных н-холиномиметиком никотином. Стимулирующий эффект на данной модели проявляется у никотина при введении в дозах, превышающих 4 мг/кг, что выражается тремором и судорогами [Андреева, Н.И., 2005]. Опытные группы получали вещество, контрольная вместо вещества получала физиологический раствор в эквивалентном объеме. Через полчаса после введения исследуемого соединения/физиологического раствора, грызуны получали водный раствор никотина (6 мг/кг, внутрибрюшинно), и проводилась регистрация латентного времени развития тремора, судорог, и количества животных с судорожной активностью. Статистически значимое изменение эффектов анализатора на фоне тестируемого вещества в сравнении с контролем служило критерием проявления активности на данной экспериментальной модели.

## **Метод оценки взаимодействия с эффектами ареколина**

Центральный м-холиномиметик ареколин при подкожном введении мышам способен индуцировать тремор и судороги [Андреева, Н.И., 2005; Lukomskaaya, N. Ya., 2008]. Модуляция эффектов ареколина возможна на фоне активности веществ, имеющих аналогичные механизмы воздействия на ЦНС. Все грызуны опытных групп за полчаса до тестирования получали исследуемое вещество. В группе контроля вместо рабочего раствора тестируемого вещества мышам вводился эквивалентный объем физиологического раствора. Ареколин вводился подкожно в дозе 25 мг/кг. Критерии сопоставления активности ареколина в опытных и контрольных группах: продолжительность латентного периода, длительность и интенсивность индуцированного тремора. Интенсивность тремора оценивалась в соответствии с балльной шкалой Ворониной, Т.А. (2012): 0 — отсутствие тремора, 1 — локальный мелкоамплитудный тремор головы, передних лап или хвоста, 2 — локальный среднеамплитудный тремор, 3 — генерализованный мелко- или среднеамплитудный тремор всего тела. Об активности на данной модели судили по статистически значимому изменению регистрируемых параметров в опытных группах в сравнении с контролем.

## **Тест взаимодействия с эффектами резерпина**

Резерпин вызывает пресинаптическую депримацию выброса катехоламинов в ЦНС, влияя одновременно на многие моноаминергические нейромедиаторные системы. Вегетативные эффекты резерпина, такие, как гипотермия, являются, предположительно, следствием влияния на норадренергическую трансмиссию. Гиподинамия и блефароптоз имеют более широкую моноаминергическую природу (нарушение дофаминовой трансмиссии и др.). Сочетанное введение резерпина и фармакологически активных веществ, обладающих влиянием на моноаминергические системы головного мозга способно изменять эффекты данного анализатора [Андреева, Н. И., 2005]. Грызуны разделялись на опытные и

контрольных группы (два контроля: позитивный и интактный). Все опытные группы и группа позитивного контроля получали внутривентральные инъекции резерпина (2,5 мг/кг) в виде водного раствора с добавлением TWIN, после чего проводилась 4-х часовая инкубация до развития эффектов анализатора. Интактный контроль получал физиологический раствор. После инкубации, опытным группам вводился раствор исследуемого вещества. Обе контрольные группы вместо рабочего раствора вещества получали эквивалентный объем физиологического раствора. Через 30 минут после введения тестируемого вещества/физиологического раствора, во всех группах оценивались двигательная активность, температура тела (ректально) и просвет глазной щели в покое. Измерение ректальной температуры проводилось электронным термометром OMRON (Германия). Двигательная активность оценивалась в актометре с автоматической регистрацией Ugo Basile (Италия). О развитии эффектов резерпина судили по сопоставлению данных двух контрольных групп между собой (позитивный и негативный контроль), о влиянии на фармакологическую активность анализатора делали вывод по статистически значимому изменению наблюдаемых реакций в опытных группах по сравнению с контролем.

### **Метод оценки влияния на судорожный эффект пикротоксина**

Данная модель призвана оценить способность фармакологически активных веществ модулировать *in vivo* активность антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецептор-ионофорного комплекса – пикротоксина. Пикротоксин индуцирует развитие тремора и судорог с определенным процентом летальности [Воронина, Т.А., 2005]. При наличии у тестируемого вещества способности влиять на активность тормозных/возбуждающих нейромедиаторных систем ЦНС, эффект пикротоксина может изменяться. Животные делились на группы контроля и опытные. Тестируемое вещество вводилось грызунам опытных групп за 60 минут до эксперимента. Группы контроля получали эквивалентный объем физиологического раствора. Пикротоксин вводился всем группам животных в

дозе 2,5 мг/кг (внутрибрюшинно). После введения анализатора в течение 60 минут регистрировались такие показатели, как латентный период появления тремора, латентный период развития судорог, количество судорожных приступов, а также выживаемость грызунов в ответ на введение пикротоксина. Критерием взаимодействия эффектов исследуемого вещества и пикротоксина служило статистически значимое изменение регистрируемых показателей в опытных группах в сравнении с контрольными значениями.

### **Метод изучения влияния на эффекты 5-гидрокситриптофана.**

Данная модель основана на способности метаболитического предшественника серотонина – 5-гидрокситриптофана (5-ГТФ) в дозах 200-300 мг/кг вызывать у мышей характерный гиперкинез в виде встряхивания головой. Механизм феномена связан с усилением серотонинергической нейротрансмиссии в мозге путем стимуляции 5-HT<sub>2</sub>-серотониновых рецепторов [Peroutka, S., 1981; Pranzetelli, M.R., 1989].

Грызунам опытных групп за 60 минут до тестирования вводилось тестируемое вещество. Контрольным мышам тем же путем вводился физиологический раствор. 5-ГТФ вводился внутрибрюшинно, в дозе 300 мг/кг, в растворе с добавлением TWIN. После введения анализатора, в течение 30 минут производилось наблюдение за животными. Подсчитывалось количество актов гиперкинеза за минуту с временными промежутками в 10 минут (всего 3 измерения). Критерием активности служило статистически значимое изменение количества «встряхиваний» головой в опытных группах по сравнению с контролем.

## **2.8 Выявление неспецифического нейротоксикологического действия**

Работа выполнена с использованием модифицированной батареи тестов по S. Irwin [Irwin, S., 1968]. Грызуны разделялись опытные группы, получавшие

возрастающие дозы исследуемого вещества, и группу контроля, которой тем же путем вводился эквивалентный объем физиологического раствора. Наблюдение за животными осуществлялось в течение 180 минут, фиксация результатов проводилась на 30, 60, 120 и 180 минуте эксперимента. Все тесты и признаки были объединены по категориям в зависимости от влияния на различные функциональные блоки нервной системы:

1. Локомоторная и поисковая активность: тест «открытое поле»;
2. Бессознательные реакции: реактивность, настороженность, возбудимость, пугливость;
3. Возбудимость ЦНС и нервномышечная передача: симптом Штрауба, тремор, судороги;
4. Координация и общий тонус скелетных мышц: особенности походки, положения тела, конечностей, общий мышечный тонус, тест «удержания на вращающемся стержне»;
5. Сенсомоторная рефлекторная активность: оценка рефлекторной активности по роговичному, ипсилатеральному сгибательному рефлексам и рефлексу с наружного слухового прохода;
6. Вегетативные функций нервной системы: диаметр зрачка, птоз, экзофтальм, саливация, пилоэрекция, ЧДД, окраска и состояние кожных покровов.

### **Методика оценки локомоторной и поисковой активности**

Исследования проведены в установке «открытое поле» [Careau, V., 2012]. Модель, которая позволяет оценить ориентировочно-исследовательское поведение и влияние на параметры эмоционального реагирования мышей [Bronikowski, A. M., 2001; Hall, C.S., 1932]. Для определения локомоторной и поисковой активностей в «открытом поле» у грызунов регистрировались параметры горизонтальной и вертикальной локомоции и ориентировочно-исследовательское поведение. Установка являлась ограниченной стенками

освещенной (90 Лк) площадкой диаметром 80 см, разделенной на квадраты (всего 25). Также в полу располагались отверстия для заглядывания (всего 16). Центр площадки был выделен. Грызуны помещались в центр хвостом к экспериментатору. В течение 2-х минут регистрировался ряд показателей: горизонтальная (число пересеченных квадратов) и вертикальная (число вставаний на задние лапы, независимо от опоры на борт) локомоторная активность; ориентировочно-исследовательская активность (количество заглядываний в отверстия) [Буреш, Я., 1991]. Критерием развития эффекта служило статистически значимое изменение значений регистрируемых показателей.

Известно, что седация и неспецифическое центральное торможение ведут к снижению регистрируемых показателей. Таким образом, кроме основных задач, данная методика решает часть задач, поставленных в пункте 2.5.

### **Методы изучения бессознательных реакций**

Изучение влияния вещества на реактивность мышей проводилось путем перемещения грызунов из домашней клетки на условно неограниченное открытое пространство, хвостом к экспериментатору, после чего фиксировалось время принятия животным решения о целенаправленном движении.

Влияние на настороженность подопытных грызунов определялось по выраженности стартл-реакции и ориентировочных рефлексов.

Представление результатов осуществлялось в соответствии с бальной шкалой от 1 до 8, где 4 балла соответствуют признаку в норме, изменение количества баллов в большую или меньшую сторону соответствуют усилению или угнетению проявления признака.

## **Методика изучения нервно-мышечной возбудимости**

Изменения нервно-мышечной возбудимости оценивались визуально, по изменению походки и положения тела и конечностей, регистрации тремора, судорожной активности.

### **Методы оценки координации и общего тонуса скелетных мышц**

Визуально оценивались особенности походки, положения тела, конечностей. Общий мышечный тонус и расстройства координации изучались в тестах «удержания на горизонтальной решетке», а также «удержания на вращающемся стержне» (седативный компонент + неспецифические нарушения координации и тонуса). В тесте удержания на горизонтальной решетке тонус мышц оценивался по балльной системе (1-4 балла). Количество баллов от 4-х до 2-х соответствовало способности грызунов удерживаться на соответствующем количестве лап. 1 балл соответствовал падению животного с решетки или отсутствию фиксации на ней.

### **Методика оценки рефлекторной активности**

Оцениваемые рефлексы: роговичный, ипсилатеральный сгибательный, и рефлекс с ушной раковины. Роговичный рефлекс фиксировался по реакции смыкания век и отдергивания головы при раздражении роговицы. Рефлекс с наружного слухового прохода оценивался по реакции резкого сокращения мышц, управляющих положением ушной раковины с изменением ее положения, и отдергиванию головы при раздражении слухового прохода. Ипсилатеральный сгибательный рефлекс измерялся путем сдавливания лапы зажимом с постоянным уровнем компрессии. Регистрировалось качественное изменение рефлекторной активности (усиление/норма/ослабление), а также количество животных с проявлением признака.

## **Методы оценки активности вегетативной нервной системы**

Частота дыхания определялась при подсчете числа дыхательных движений за 1 минуту у бодрствующих мышей. Просвет зрачка, экзофтальм, пилоэррекция, окраска и состояние кожных покровов, саливация выявлялись визуально. Диаметр зрачка исследовался при комнатном освещении, а также при воздействии направленного яркого пучка света (зрачковый рефлекс на свет). Пилоэррекция определялась по нахохливанию холки, саливация – по формированию капли слюны в углу рта.

## **Методика оценки эмоционального состояния**

Эмоциональное состояние грызунов оценивалось в тесте «открытое поле» (описания установки, регистрируемых признаков и техники манипуляций даны в подглаве 2.7). Для оценки эмоциональности в установке «открытого поля» фиксировались следующие признаки: число выходов в центр площадки, груминг, количество фекальных болюсов. Также об эмоциональном состоянии подопытных мышей судили по наличию вокализации при прикосновении, или амбивалентности.

## **2.9 Методы статистической обработки данных**

В статистическом анализе данных применялись критерий Стьюдента, критерий Манна-Уитни (парный независимый анализ), критерий Вилкоксона (многофакторное сравнение зависимых данных), критерий Краскела-Уолиса 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».

### **Глава 3. Изучение обезболивающей активности соединения РУ-1205**

Результаты, описанные в настоящей главе, приводятся с целью расширения опубликованной ранее информации об обезболивающем действии соединения РУ-1205 [Пат.РФ № 2 413 512 С1 от 29.072009 г.; Спасов, А.А., 2014; Гречко, О.Ю., 2012; Спасов, А.А., 2013; Спасов, А.А., 2014(1)] и обоснования дальнейших исследований по оценке сопутствующих и нежелательных эффектов вещества.

Метод «горячая пластина» является одним из способов оценки анальгетической активности новых обезболивающих веществ. Тест отражает супраспинальный уровень регуляции болевой чувствительности (серая околотоводопроводная субстанция, таламус, кора) [South, S.M., 1998; Cerina, M., 2015]. Кроме этого на данной модели можно оценить степень вмешательства вещества в нейромедиаторный баланс ЦНС [Kitchen, I., 1985].

Известно, что анальгетическая активность опиоидэргических веществ, в зависимости от рецепторного профиля, может по-разному коррелировать с вводимой дозой. Так, например, парциальные опиоидные агонисты (пентазоцин и др.), при значительном повышении дозы теряют обезболивающую, что объясняется антагонистичным перекрестным пострецепторным сообщением путей передачи сигналов мю- и каппа-опиоидных рецепторов [Shu, H., 2011; Shu, H., 2015].

Таким образом, оценка дозозависимости анальгетической активности новых опиоидных анальгетиков представляется важным аспектом изучения их доклинических свойств.

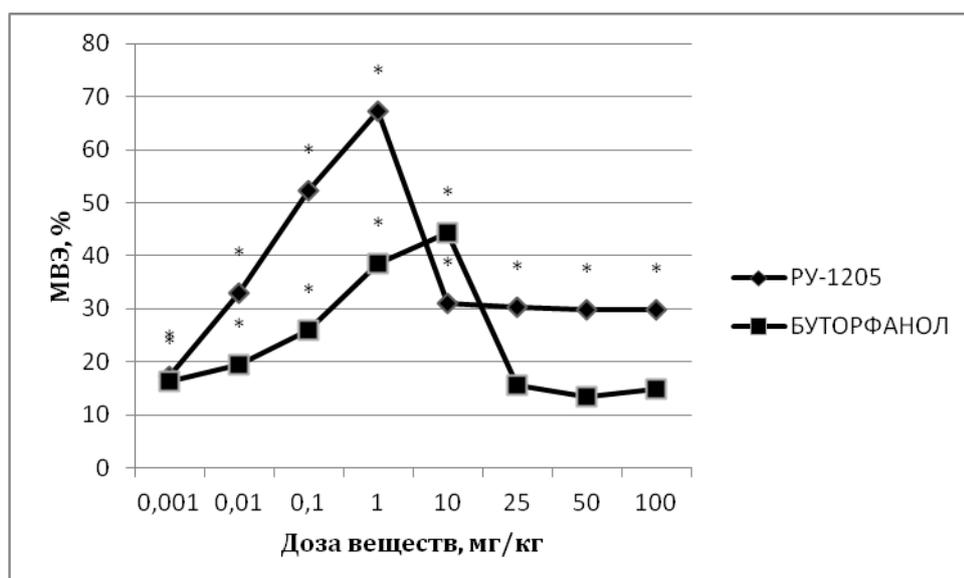
#### **3.1 Обезболивающее действие соединения РУ-1205 на модели «горячая пластина»**

Достижение болевого порога в эксперименте проявлялось в виде сложнорефлекторной реакции облизывания задней лапы. Время реагирования оценивалось как латентный период ноцицептивной реакции (ЛП). В группе

контроля ЛП составил  $8,25 \pm 0,30$  секунд. При оценке эффективности соединения РУ-1205 и буторфанола было показано, что сила анальгетического эффекта и характер зависимости от дозы для тестируемых веществ были различны (рис. 3.1). Для соединения РУ-1205 отмечалось прогрессивное нарастание антиноцицептивного действия с максимально возможной эффективностью (МВЭ) в дозе 1 мг/кг (ЛП в 2,7 раза выше, чем в контроле). Увеличение дозы до 10 мг/кг сопровождалось снижением анальгетического эффекта в 2,1 раза, и выходом кривой зависимости «доза-эффект» на плато при введении в нарастающих дозах до 100 мг/кг (ЛП опытных групп в среднем в 1,8 раза превышал контрольные значения). Для буторфанола МВЭ соответствовала 10 мг/кг (ЛП превышал контрольные показатели в 2,2 раза). В дозах 25 мг/кг и выше, буторфанол полностью утрачивал обезболивающую активность на данной экспериментальной модели. 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 (67% и 38,5% соответственно). 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 (67% и 44% соответственно).

В диапазоне изученных доз, по методу наименьших квадратов был определен показатель  $ЭД_{50}$  обезболивающей эффективности (табл. 3.1 (а)). Величина  $ЭД_{50}$  для соединения РУ-1205 была в 10 раз ниже, чем таковая у буторфанола (0,02 мг/кг и 0,2 мг/кг соответственно).

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 ( $ЛД_{50}$ ). При сопоставлении значений  $ЛД_{50}$  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.



**Рисунок 3.1.** Зависимость анальгетической эффективности соединения РУ-1205 и буторфанола в тесте «горячая пластина» от дозы (0,001-100 мг/кг, при внутривбрюшинном введении), выраженная через показатель максимально-возможного эффекта% (МВЭ%\*\*).

**Примечание:** \* - статистически значимые различия с данными контрольной группы (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p \leq 0,05$ );

\*\* - расчет МВЭ% проводился по формуле:  $\% \text{МВЭ} = \frac{\text{ЛП}_0 - \text{ЛП}_k}{30 - \text{ЛП}_k} \times 100\%$ , где ЛП<sub>0</sub> – латентный период ноцицептивной реакции в опытной группе; ЛП<sub>к</sub> - латентный период ноцицептивной реакции в группе контроля; 30 – максимальное время экспозиции в секундах [Karami, R., 2011].

Таблица 3.1 (а)

**Среднее значение ЭД<sub>50</sub> для анальгетической эффективности соединения РУ-1205 и буторфанола по показателю МВЭ в тесте «горячая пластина», ЛД<sub>50</sub> соединения РУ-1205 и буторфанола (при внутривбрюшинном введении мышам), и терапевтический индекс (ТИ=ЛД<sub>50</sub>/ЭД<sub>50</sub>)**

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

Примечание: \*- ЛД<sub>50</sub> буторфанола тартрата (в/бр, мыши) по данным BBPSDY Pharmacology and Biochemical Properties of Drug Substances, 2, 19 (1979);

### 3.2 Заключение

В результате проведенного эксперимента было установлено, что соединение РУ-1205 проявляет обезболивающее действие в тесте «горячая пластина» в диапазоне доз 0,001-100 мг/кг. При этом отмечается нарастание эффективности в дозах 0,001-1 мг/кг. После достижения максимально возможного эффекта (1 мг/кг) наблюдается снижение обезболивающего действия в 2,1 раза и формирование «плато» на кривой зависимости «доза-эффект» при введении нарастающих доз до 100 мг/кг, что соответствует 40% от максимальной. Для буторфанола отмечено повышение анальгетической эффективности в диапазоне доз 0,001-10 мг/кг, с полной утратой антиноцицептивной активности в дозах 25 мг/кг и выше. Подобный характер зависимостей «доза-эффект» ранее описывался для неселективных агонистов каппа-опиоидного рецептора (пентазоцин [Shu, H., 2011], налорфин [Goldberg, S.R., 1974]). По показателям ЭД<sub>50</sub> и ТИ соединение РУ-1205 превосходит препарат сравнения буторфанол в 10 и 16 раз соответственно.

## Глава 4. Изучение механизма обезболивающего действия соединения РУ-1205

В ранее проведенных исследованиях [Спасов, А.А., 2013; Спасов, А.А., 2014; Гречко, О.Ю., 2012] было показано, что у вещества РУ-1205 имеется каппа-опиоидная активность [Пат.РФ № 2 413 512 С1 от 29.072009 г.]. Основываясь на этом, было решено изучить соединение РУ-1205 на наличие мю- и дельта-опиоидного действия. Экспериментальная работа проведена в условиях *in vitro* и *in vivo*. Механизм анальгетического действия *in vitro* изучался на моделях подавления электроиндуцированных сокращений изолированных органов. Исследование вещества РУ-1205 *in vivo* проводилось в тесте «горячая пластина» с применением селективных и неселективных антагонистов опиоидных рецепторов. Анализ литературы [Мако, Е., 2001; Milanés, M.V., 1997; Milanés, M.V., 1998] показывает, что в условиях перекрестного исследования с антагонистами разной селективности можно определять рецепторный профиль веществ. При этом постоянство состава рецепторов в тканях животных позволяет проводить направленный поиск агонистической активности, а кривые зависимостей «концентрация-эффект» дают возможность судить о силе воздействия [De Graaf, J.S., 1983].

Известно, что в подавление электроиндуцированного сократительного ответа кишечника крыс вовлечены только мю- и дельта-опиоидные рецепторы, а также их гетеродимеры [Gray, A. C., 2006; Gray, A. C., 2005]. Таким образом, модель подавления электроиндуцированных сокращений препарата подвздошной кишки крысы валидна для выявления мю- и дельта-опиоидной активности веществ. В семявыносящем протоке кролика (СПК) фенотип опиоидных рецепторов представлен гетерогенной популяцией каппа-опиоидных рецепторов [Мако, Е., 2001; Ока, Т., 1981].

#### 4.1 Оценка каппа-агонистической активности вещества РУ-1205 на модели изолированного семявыносящего протока кролика

В условиях эксперимента, сокращения изолированного препарата СПК индуцировались низкочастотным электрическим током (10 Гц, амплитуда 50 Вт, 2 мсек). Соединение РУ-1205 в концентрации  $10^{-9}$  М подавляло навязанную сократительную активность изолированного СПК на 45,8%. Активность соединения U-50488 на данной модели статистически значимо не отличалась от тестируемого вещества, со средним значением 34% в концентрации  $10^{-9}$  М. Буторфанол статистически значимо ингибировал сокращения СПК в концентрации  $10^{-7}$  М (табл. 4.1 (а)). Данные, полученные для референтных веществ, соответствуют информации литературных источников [Hayes, A., 1985; Fujibayashi, K., 1994]. По методу наименьших квадратов для веществ РУ-1205 и U-50488 и буторфанола установлены показатели  $ЭК_{50}$  ( $2 \cdot 10^{-9}$ ,  $7 \cdot 10^{-9}$  и  $9,8 \cdot 10^{-5}$  соответственно). По показателям  $ЭК_{50}$  соединения РУ-1205 и U-50488 сопоставимы между собой и превосходят аналогичный показатель буторфанола (табл. 4.1 (б)). Преинкубация ткани СПК в растворе норбиналторфина (0,1<sup>-6</sup> М, избирательный блокатор каппа-опиоидных рецепторов) предотвращала развитие ингибирующего действия, снижая способность подавлять индуцированные сокращения СПК для соединения РУ-1205, вещества U-50488 и буторфанола на 92,6%, 84% и 64,9% соответственно (табл. 4.1 (а)).

Таблица 4.1 (а)

**Влияние норбиналторфимина на эффекты соединений РУ-1205, U-50488 и препарата буторфанола в модели электроиндуцированных сокращений семявыносящего протока кролика**

Вещество/группа	Концентрация, М	Ингибирование сокращения ( $\Delta$ %)
Соединение РУ-1205	$1 \times 10^{-9}$	45,8*#
	$1 \times 10^{-8}$	60,3*#
	$1 \times 10^{-7}$	72,2*#
	$1 \times 10^{-6}$	97,4*#
	$1 \times 10^{-5}$	100,0*#
Норбиналторфимин + соединение РУ-1205	$1 \times 10^{-6} + ЭК_{50}$	7,4
Соединение U 50,488	$1 \times 10^{-9}$	34,0*#
	$1 \times 10^{-8}$	56,7*#
	$1 \times 10^{-7}$	69,5*#
	$1 \times 10^{-6}$	81,6*#
	$1 \times 10^{-5}$	97,9*#
Норбиналторфимин + соединение U50,488	$1 \times 10^{-6} + ЭК_{50}$	16,0
Буторфанол	$1 \times 10^{-9}$	2,0
	$1 \times 10^{-8}$	8,9
	$1 \times 10^{-7}$	17,5*
	$1 \times 10^{-6}$	28,3*
	$1 \times 10^{-5}$	42,0*
Норбиналторфимин + Буторфанол	$1 \times 10^{-6} + ЭК_{50}$	34,1

**Примечание:** \* - статистически значимые различия в сравнении с исходным уровнем сократительной активности препарата семявыносящего протока кролика; # - статистически значимые отличия от аналогичных показателей буторфанола (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p \leq 0,05$ );

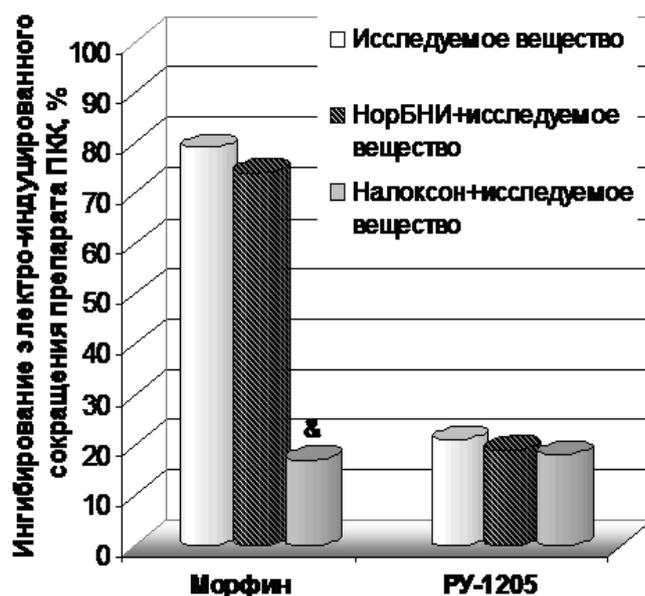
Таблица 4.1 (б)

**Величина  $ЭК_{50}$  соединений РУ-1205, U-50488 и буторфанола на модели электроиндуцированных сокращений препарата семявыносящего протока кролика**

Вещество	$ЭК_{50}$ (М)
РУ-1205	$2,0 \times 10^{-9}$
U50,488	$7,0 \times 10^{-9}$
Буторфанол	$9,8 \times 10^{-5}$

## 4.2 Выявление мю- и дельта-опиоид-агонистического действия соединения РУ-1205 на модели изолированной подвздошной кишки крысы

В результате проведенных исследований установлено, что соединение РУ-1205 оказалось неэффективным на модели изолированной ПКК. В максимальной изученной концентрации ( $10^{-3}$  М) наблюдалось незначительное подавление сократительной активности препарата кишечника (23,8%), однако эффект не устранялся в условиях преинкубации с налоксоном и норбиналторфимином (рис. 4.1). В то же время морфин подавлял электроиндуцированные сокращения ПКК с показателем  $ЭК_{50}$   $2,6 \times 10^{-7}$  М, что соответствует данным литературы [Gray, A.C., 2005]. Указанный эффект морфина устранялся при преинкубации ПКК с налоксоном, но не с норбиналторфимином (рис. 4.2).



**Рисунок 4.1.** Влияние соединения РУ-1205 ( $100^{-6}$  М) и морфина ( $10^{-6}$  М) на электроиндуцированную сократительную активность изолированного препарата подвздошной кишки крысы и изменение этого влияния на фоне преинкубации ткани в растворе нор-БНИ и налоксона ( $0,1^{-6}$  М).

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

### 4.3 Изучение механизма анальгетической активности вещества РУ-1205 *in vivo*

Регистрация обратимости анальгетического ответа соединения РУ-1205 проводилась на модели «горячая пластина». В группе контроля латентный период ноцицептивной реакции (ЛП) соответствовал  $11,3 \pm 1,8$  секунд. Соединение РУ-1205 при внутрибрюшинном введении в дозе ЭД<sub>80</sub> (0,02 мг/кг) статистически значимо увеличивало продолжительность ЛП. Данный показатель для вещества РУ-1205 был выше такового группы контроля на 83,8%. Соединение U-50488 при внутрибрюшинном введении в ЭД<sub>80</sub> (8,0 мг/кг) также увеличивало длительность ЛП на 76,5%. Норбиналторфимин, при предварительном подкожном введении в дозе 10 мг/кг, предотвращал обезболивающую активность веществ на данной модели (табл. 4.3).

Таблица 4.3

**Влияние соединений РУ-1205 и U-50488 в дозе ЭД<sub>80</sub> (при внутрибрюшинном введении) при предварительном введении норбиналторфимина в дозе 10 мг/кг (подкожно) на величину болевого порога в тесте «горячая пластина» (M±m)**

Вещество/группа	Доза, мг/кг	Латентный период, сек
Контроль	–	$11,3 \pm 1,8$
РУ-1205	0,02	$21,9 \pm 2,3^*$
Норбиналторфимин + РУ-1205	10,0 + 0,02	$9,6 \pm 1,7$
U-50,488	8,0	$20,9 \pm 2,4^*$
Норбиналторфимин + 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,  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4 Заключение.

В данных литературы [Ока, Т., 1981; Hayes, A., 1985] описывается, что модель угнетения электроиндуцированных сокращений изолированного семявыносящего протока кролика (СПК), является достаточно специфичной в отношении определения каппа-опиоидной активности соединений. Все три исследованных вещества, буторфанол, соединение РУ-1205 и вещество U-50488 статистически значимо угнетали электроиндуцированные сокращения СПК. По уровню ЭК<sub>50</sub> соединение РУ-1205 было равно U-50488 и превосходило буторфанол. ЭК<sub>50</sub> соединений РУ-1205, U-50488 и буторфанола составили  $2,0 \cdot 10^{-9}$ ;  $7,0 \cdot 10^{-9}$  и  $9,8 \cdot 10^{-5}$  соответственно. Преинкубация СПК в растворе норбиналторфимина ( $0,1^{-6}$  М) устраняла способность веществ в концентрации ЭК<sub>50</sub> подавлять сокращения СПК.

Coupar, I.M. и Bangol, D. в своих работах представляют иммуногистохимические доказательства экспрессии мю- и дельта-опиоидных рецепторов в гладкомышечных клетках кишечника крыс, и отсутствие в них субпопуляции каппа-рецепторных белков [Coupar, I.M., 1995; Bagnol, D., 1997]. В работе Gray, A.C. показано, что активация мю- и дельта-, но не каппа-рецепторов ведет к угнетению сократительной активности тканей изолированного ПКК [Gray, A.C., 2005]. В настоящей работе было показано, что вещество РУ-1205 подавляло электроиндуцированные сокращения подвздошной кишки крысы (ПКК) на 23,8% только в максимальной (микромольной) концентрации, причем эффект не устранялся преинкубацией органного препарата с налоксоном (неизбирательный блокатор опиоидных рецепторов).

В условиях *in vivo* соединения РУ-1205 и U-50488 оказывали обезболивающее действие, увеличивая продолжительность ЛП в 1,9 раза. При этом норбиналторфимин (10 мг/кг подкожно) устранял данную активность тестируемых веществ.

В заключение, основываясь на результатах проведенной работы, можно сделать вывод, что соединение РУ-1205 не проявляет мю- и дельта-

агонистической активности, при этом оказывает каппа-агонистическое действие, сопоставимое с таковым соединения у U-50488, и превосходит по данному экспериментальному показателю буторфанол.

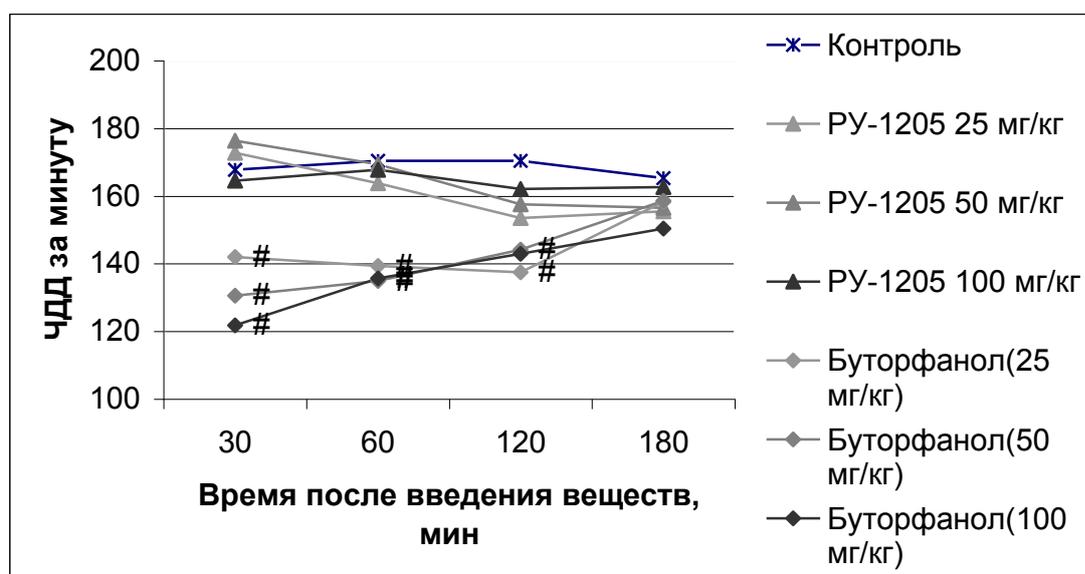
## Глава 5. Выявление сопутствующих эффектов соединения РУ-1205, опосредованных возможной активацией мю-рецепторов

На основании данных литературы [Khansari, M., 2013; Aldrich, J., 2009; Pattinson, K.T.S., 2008; Johnson, S.M., 2010; Ono, H., 2014; Boom, M., 2012; Lalley, P.M., 2003; Holzer, P., 2009; Al-Hasani, R., 2011; Twycross, R.G., 1986; Kosten, T.R., 2002; Van Ree, J.M., 1999] сделан вывод, что среди побочных эффектов морфиноподобных анальгетиков, наиболее часто встречающимися и неблагоприятными являются респираторная депрессия, лекарственная зависимость, толерантность к анальгетическому эффекту и обстипация, обусловленная угнетением моторики и секреции ЖКТ. Данные эффекты связаны с активацией мю- и, возможно, дельта-опиоидных рецепторов. В то же время каппа-рецепторный профиль признан более безопасным ввиду отсутствия при активации данных побочных реакций [Mangel, A.W., 2012; Chamouard, P., 1998; Giuliani, S., 1996; Elizabeth, L., 2008; Kivell, B., 2010; Zvartau, E.E., 2006].

Соединение РУ-1205, обладающее избирательным каппа-опиоидным механизмом действия, предположительно, образует метаболиты с анальгетической активностью [Спасов, А.А., 2014], теоретически способные обладать мю- и/или дельта-агонистической активностью. С другой стороны, по данным Commiscey, S. (2005), буторфанол на моделях *in vitro* первоначально представлялся как селективный каппа-опиоидный агонист. Однако тестирование *in vivo* выявило присутствие мю-агонистической активности. Исходя из этого было решено 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, толерантность к анальгетическому действию, замедление моторики ЖКТ).

## 5.1 Влияние соединения РУ-1205 на дыхание

При изучении влияния соединения РУ-1205 и буторфанола на дыхание было установлено, что частота дыхательных движений (ЧДД) за минуту в контрольной группе животных составила в среднем 170 в минуту и соответствовала физиологической норме. Соединение РУ-1205 в диапазоне доз 0,1-100 мг/кг не имело значимого влияния на частоту дыхания грызунов (табл. 5.1). Это соответствует данным литературы о том, что каппа-рецепторные лиганды при различных путях введения и на различных моделях *in vivo*, не оказывают значимого влияния на дыхательную функцию [Freye, E., 1983; Castillo, R., 1986; Howell, L.L., 1988; Dosaka-Akita, 1993; Fujibayashi, 1996]. В то же время, респираторная депримация под воздействием буторфанола развивалась, начиная с дозы 25 мг/кг, с максимальным показателем угнетения в дозах 50 и 100 мг/кг, составляющим 20,1 и 27,4% соответственно. Наблюдаемая активность буторфанола сохранялась в течении 120 минут после введения (табл. 5.1; рис. 5.1). Установленная способность буторфанола подавлять респираторную функцию мышей соответствует данным Commiscey, S. (2005).



**Рисунок 5.1** Влияние соединения РУ-1205 и 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,  $p \leq 0,05$ ).

Таблица 5.1

**Влияние соединения РУ-1205 и буторфанола (при внутрибрюшинном введении) на частоту дыхательных движений мышей ( $M \pm m$ ).**

<b>Частота дыхательных движений за минуту</b>				
<b>Доза, мг/кг</b>	<b>Время после введения соединения, мин</b>			
	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>120</b>	<b>180</b>
<b>Контроль</b>				
—	167,8±23,4	170,4±12,2	165,8±17,4	165,3±13,9
<b>Соединение РУ-1205</b>				
0,1	164,4±5,8	177,3±12,7	165,9±7,6	166,5±10,6
1	172,3±12,7	170,6±23,0	166,0±16,6	160,3±17,0
10	172,5±7,8	174,0±6,2	151,6±8,7	156,9±6,7
25	172,8±5,7	163,8±9,7	153,5±7,3	155,5±5,5
50	176,4±8,3	169,4±5,9	157,6±5,0	156,6±7,4
100	164,6±10,6	167,8±10,3	152,9±12,6	154,8±12,7
<b>Буторфанол</b>				
0,1	159,0±13,9	177,8±8,7	165,2±7,3	158,5±7,0
1	163,4±15,5	177,9±10,1	168,1±8,2	168,0±6,0
10	170,6±14,2	167,0±11,1	167,8±9,5	170,3±11,7
25	142,0±16,6	139,4±4,7*	137,5±7,1	158,4±9,7
50	130,6±6,5*	134,9±7,7*	131,4±3,7*	158,6±8,0
100	121,8±7,0*	135,7±10,7*	143,0±10,4	150,4±7,5

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

Таким образом, можно заключить, что соединение РУ-1205 не обладает респираторно-депримирующим воздействием, в отличие от парциального опиоидного агониста, буторфанола, что говорит об отсутствии мю-агонистического воздействия.

## **5.2 Действие соединения РУ-1205 на моторику желудочно-кишечного тракта**

При изучении влияния соединения РУ-1205 и препаратов сравнения буторфанола и морфина на моторику ЖКТ был использован метод «меток» (*in vivo* имитация продвижения химуса по кишечнику). Валидность данной модели и

релевантность результатов подтверждается корреляцией с эффектами мю- и дельта-агонистов на изолированной тонкой кишке крыс в экспериментах *in vitro* [Holzer, P., 2009].

В эксперименте установлено, что в диапазоне доз 0,1-10 мг/кг соединение РУ-1205 не оказывало статистически значимого воздействия на транзиторную активность ЖКТ.

В то же время морфин в дозах 1 и 10 мг/кг дозозависимо замедлял продвижение «метки» по кишечнику на 27,7% и 68,6% соответственно, что хорошо согласуется с данными литературы [Gallantine, E.L., 2008]. Активность буторфанола на данной модели установлена также в дозах 1 и 10 мг/кг. Угнетение моторики ЖКТ в этих дозах соответствовало 77,1% и 45,5% (табл. 5.2).

Таблица 5.2

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

Доза, мг/кг	Общая длина кишечника, см	Длина кишечника, заполненная активированным углем, см	Индекс перистальтики, %
<b>Контроль</b>			
-	51,5±1,0	37,3±5,6	100,0±10,8
<b>Соединение РУ-1205</b>			
0,1	49,5±2,7	35,1±4,5	94,1±9,1
1	48,0±1,5	38,1±6,6	102,1±13,8
10	48,3±3,0	35,9±6,4	96,2±13,3
<b>Буторфанол</b>			
0,1	51,7±6,4	37,1±8,5	96,4±16,4
1	50,3±5,0	8,8±1,0	22,9±2,0*
10	48,5±3,4	21,0±5,3	54,5±10,9*
<b>Морфин</b>			
0,1	49,5±3,1	42,7±5,2	106,0±10,5
1	54,7±4,6	25,3±3,5	72,3±6,4*
10	50,0±4,3	11,0±1,0	31,4±2,0*

**Примечание:**\* – достоверные различия с контрольной группой при  $p < 0,05$  (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p \leq 0,05$ ).

Таким образом, получено экспериментальное подтверждение того, что селективный каппа-опиоидный агонист, соединение РУ-1205, не обладает угнетающим действием на пропульсивную активность ЖКТ, в отличие от неселективных препаратов морфина и буторфанолола, что свидетельствует об отсутствии мю-агонистического влияния.

### 5.3 Изучение наркотического потенциала вещества РУ-1205

Доклиническая оценка наркогенного потенциала состоит из нескольких обязательных экспериментальных блоков: изучение способности провоцировать толерантность к анальгетическому эффекту, оценка физической зависимости и синдрома отмены, а также выявление аддиктивных свойств [Воронина, Т.А., 2012]. На животных моделях аддиктивные свойства принято ассоциировать со стимульным действием. Стимульные свойства, в свою очередь, подразделяются по порядкам («первичные», «вторичные» и более высокие порядки) [Everitt, В. J., 2013], а также по «окраске» субъективного восприятия («негативные» и «позитивные»). При наличии «позитивных» стимульных свойств различного порядка говорят о возможной психической зависимости в спектре фармакологической активности вещества, что типично для классических морфиноподобных препаратов [Mamoop, А.М., 1995]. Противоположная – «негативная окраска», проявляется *in vivo* аверсивной реакцией, и говорит о том, что вещество предположительно является «провокатором» дисфории [Bruchas, М.Р., 2007; Bruchas, М.Р., 2008]. Указанная способность характерна для каппа-селективных опиоидных лигандов, таких, как соединения U-50488, U-62066, PD 117302 и др. [Fujii, Н., 2012]. Аддиктивный и аверсивный эффекты могут быть зафиксированы путем оценки способности веществ выступать в качестве первичных и вторичных «позитивных» или «негативных» подкрепителей. При этом в оценке способности формировать оба этих состояния используются одни и те же доклинические тесты («внутривенное самовведение», «лекарственная дифференцировка» и «самостимуляция зон награды головного мозга» для

первичного, и «условная реакция избегания/предпочтения места» для вторичного подкрепления). Поскольку в указанных методиках могут быть оценены эффекты, опосредованные как мю-, так и каппа-опиоидными рецепторами, результаты исследования соединения РУ-1205 на наличие первичных и вторичных стимульных свойств приведены не в данном блоке, а в главе 6 настоящей работы (подглава 6.2).

### **Оценка синдрома отмены**

Для изучения возможной физической зависимости соединения РУ-1205, а также препаратов сравнения морфина и буторфанола применялась схема 5-дневного введения веществ в нарастающих дозах (25-100 мг/кг) по Ворониной, Т.А. (2012). Синдром отмены индуцировался налоксоном. Критерием развившейся абстиненции считались «рецессивные» и «доминантные» проявления абстиненции [Walker, E.A., 2005]. По Walker и Sterious, к «доминантными» симптомами считаются прыжки, а «рецессивными» – тремор в виде «барабанного боя», встряхивания головой, стук зубами, диарея и птоз.

В контрольной серии экспериментов при введении налоксона подопытным грызунам, «доминантных» и «рецессивных» признаков абстинентного синдрома установлено не было (табл. 5.3.1). Масса контрольных животных до и после введения налоксона статистически значимо не изменялась ( $16,0 \pm 1,7$  и  $15,9 \pm 1,6$  г соответственно) (табл. 5.3.1). В группе грызунов, получавших по схеме соединение РУ-1205, после введения налоксона также не обнаружено прыжков и снижения массы. Из «рецессивных» признаков у 50% подопытных мышей отмечено появление полуптоза, а также тремор по типу «барабанного боя», наблюдаемый у 10% животных. В то же время при введении налоксона морфинзависимым животным отмечались выраженные признаки абстиненции. Прыжки наблюдались в 100% случаев, среднее количество прыжков составляло  $31,6 \pm 4,0$ . Кроме того были зафиксированы тремор по типу «барабанного боя» и

птоз. У 40% животных отмечались характерные встряхивания головой и диарея, у 20% – стук зубами. Наблюдаемая потеря в весе у подопытных животных составляла 10,3% от исходной массы тела (табл. 5.3.1). В группе мышей, получавших буторфанол, также отмечались признаки синдрома отмены. Прыжки и тремор были зафиксированы у 100% животных. Среднее количество прыжков –  $2,4 \pm 1,1$ . Масса тела грызунов после введения налоксона в данной группе оставалась неизменной.

Данные, полученные экспериментально для соединения РУ-1205, свидетельствуют об отсутствии признаков синдрома отмены и, соответственно, мю-агонистической активности.

**Влияние налоксона (10 мг/кг, подкожно) на массу и нервномышечные проявления поведения мышей при внутрибрюшинном введении соединения РУ-1205, морфина и буторфанола по 5-ти дневной схеме с постепенным нарастанием дозы от 25 мг/кг до 100 мг/кг.**

Масса животного, г (M±m)		Прыжки, ед. (M±m)	Тремор «барабанный бой», %	Полуптоз, %	Встряхивани я головы, %	Диарея, %	Стук зубами, %	Корчи, %
До налоксона	После налоксона							
<b>Налоксон (контроль)</b>								
16,0±1,7	15,9±1,6	0,0±0,0	10	0	0	0	0	0
<b>Морфин+налоксон</b>								
24,4±1,5	21,9±1,1	31,6±4,0*	100	100	40	40	20	0
<b>РУ-1205+налоксон</b>								
20,0±2,9	19,6±2,8	0,0±0,0*#	10	50	0	0	0	30
<b>Буторфанол+налоксон</b>								
21,5±2,5	21,2±2,4	2,4±1,1*#	100	100	0	0	0	0

**Примечание:** обозначение % соответствует количеству животных в группе, у которых проявился признак; \* - статистически значимо по отношению к группе контроля (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p \leq 0,05$ ); # - статистически значимо по отношению к группе животных, получавшей морфин (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p \leq 0,05$ ).

## Изучение толерантности к анальгетическому эффекту

Для выявления способности соединения РУ-1205 и препаратов сравнения морфина и буторфанола формировать привыкание к обезболивающему эффекту при повторном введении, было проведено сравнение результатов анальгетического теста «горячая пластина» при однократном и при 14-дневном введении веществ. Для группы интактных животных средний показатель продолжительности латентного периода ноцицептивной реакции (ЛП) составил  $10,1 \pm 1,8$  секунд. Исследование соединения РУ-1205 проведено, при подкожном и пероральном путях введения в дозах 1 и 10 мг/кг и 5 и 50 мг/кг соответственно. Однократное подкожное введение соединения РУ-1205 в изученных дозах вызывало статистически значимое увеличение порога болевой реакции относительно контроля в 2,2 и 2,3 раза соответственно. В группе, получавшей 14 дней вещество РУ-1205, показатель ЛП был выше, чем в контроле в 2,1 и 2,2 раза, что статистически значимо не отличается от результатов однократного введения. Анализ данных литературы [Shippenberg, T.S., 2007; Su, M.T., 1998] показывает, что селективные агонисты каппа-опиоидных рецепторов не способствуют формированию толерантности к обезболивающему действию на различных моделях ноцицептивных реакций.

В то же время у грызунов, получавших подкожно буторфанол в дозах 1 и 10 мг/кг отмечено увеличение латентного периода болевой реакции относительно контроля в среднем в 1,8 раза для однократного, и 1,2 раза для 14-дневного введения препарата (табл. 5.3.2 (а)). Снижение активности после субхронического введения соответствовало статистически значимому уменьшению продолжительности ЛП на 72,2% и 71,9% относительно показателя однократного введения буторфанола в дозах 1 и 10 мг/кг соответственно. Результаты экспериментальной работы согласуются с данными Gringauz, M. (2001).

Для контрольной группы животных, получавших растворитель перорально, показатель ЛП был равен  $10,5 \pm 1,3$  секунд. Вещество РУ-1205 при однократном пероральном введении мышам в дозах 5 и 50 мг/кг вызывало статистически

значимое увеличение времени ноцицептивной реакции относительно контроля в 2,2 и 1,7 раза соответственно. После 14-дневного введения тестируемого соединения, показатель ЛП статистически значимо не изменялся относительно однократного применения, и превышал аналогичный показатель, полученный для группы контроля в 2 и 1,6 раза (табл. 5.3.2 (б)). Однократное пероральное введение грызунам морфина в дозах 5 мг/кг и 50 мг/кг статистически значимо увеличивало порог ноцицептивной реакции относительно контроля в 1,9 и 2 раза соответственно. На 14 день эксперимента обезболивающая активность морфина снизилась на 67,8% и 98,6%. Более того, полученное для дозы 50 мг/кг морфина значение, не имело статистически значимого отличия от аналогичного показателя контрольной группы животных. На основании полученных результатов можно предположить, что в группе животных, получавших морфин, наблюдалось развитие толерантности к анальгетическому эффекту. Полученные данные соответствуют данным литературы [Gringauz, M., 2001; Feng, Y.Z., 1994].

В результате проведенных исследований можно заключить, что соединение РУ-1205, в отличие от морфина и буторфанола, не вызывало толерантности к анальгетическому эффекту на описываемых моделях, что служит благоприятным прогностическим признаком отсутствия данного эффекта в клинических испытаниях и свидетельствует об отсутствии мю-агонистического действия.

Таблица 5.3.2 (а)

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

Кратность введения	Доза, мг/кг	Латентный период, сек	Изменение болевого порога относительно контроля, %
<b>Контроль</b>			
—	—	10,1±1,8	—
<b>Соединение РУ-1205</b>			
Однократное введение	1 мг/кг	22,2±1,0*	119,7%
14-дневное введение		20,8±3,6*	106,1%
Однократное введение	10 мг/кг	23,4±4,6*	131,9%
14-дневное введение		21,9±2,0*	116,8%
<b>Буторфанол</b>			
Однократное введение	1 мг/кг	18,2±2,6*	80,0%
14-дневное введение		12,3±2,1	22,2%
Однократное введение	10 мг/кг	18,7±2,9*	85,0%
14-дневное введение		14,4±1,3*	43,1%

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

Таблица 5.3.2 (б)

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

Кратность введения	Доза, мг/кг	Латентный период, сек	Изменение болевого порога относительно контроля, %
<b>Контроль</b>			
—	—	10,1±1,8	—
<b>Соединение РУ-1205</b>			
Однократное введение	5 мг/кг	22,3±1,8*	121,0%
14-дневное введение		20,6±1,8*	104,5%
Однократное введение	50 мг/кг	17,1±1,8*	69,5%
14-дневное введение		16,0±1,7*	58,6%
<b>Морфин</b>			
Однократное введение	5 мг/кг	19,6±1,0*	87,5%
14-дневное введение		13,4±1,5	28,2%
Однократное введение	50 мг/кг	20,6±2,4*	97,2%
14-дневное введение		10,6±0,5	1,4%

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

## 5.4 Заключение

В результате проведенных экспериментов было показано, что вещество РУ-1205 в условиях *in vivo* не проявляет эффектов, характерных для мю- и дельта-опиоидных анальгетиков (респираторная депрессия, угнетение моторики ЖКТ, анальгетическая толерантность, физическая зависимость).

Так, при введении соединения РУ-1205 мышам в эксперименте по оценке влияния веществ на частоту дыхательных движений установлено, что тестируемое вещество, в отличие от препарата сравнения буторфанола, не обладает активностью на данной модели, что согласуется с представлением о каппа-селективных агонистах, как о веществах, не имеющих значимого влияния на дыхание.

Соединение РУ-1205, в противоположность эффектам морфина и буторфанола, не угнетало моторику ЖКТ мышей. В работе Mangel, A.W., и Hicks, G.A., показано, что селективнодействующие каппа-рецепторные лиганды не подавляют моторику ЖКТ в отсутствие воспалительной реакции или патологически повышенной моторно-секреторной активности [Mangel, A.W., 2012].

Анализируя степень выраженности критериев синдрома отмены во всех подопытных группах, можно заключить, что субхроническое введение тестируемой субстанции не приводило к развитию синдрома отмены. В то же время течение абстиненции при введении буторфанола имело более мягкий характер, в отличие от выраженного синдрома отмены, наблюдаемого в группе животных, получавших морфин.

Вещество РУ-1205 при двухнедельном подкожном и пероральном введении, не вызывало формирования толерантности к анальгетическому эффекту у мышей, тогда как в аналогичных условиях буторфанол и морфин при двухнедельном подкожном введении, вызывали развитие толерантности к анальгетическому эффекту, более выраженную в группе грызунов, получавшей морфин. Ранее для вещества РУ-1205 при длительном введении было установлено наличие

метаболитов, обладающих анальгетической активностью [Спасов, А.А., 2014]. Возможность присутствия мю-опиоидной активности у данных метаболитов нуждалась в изучении. Настоящие исследования, проводимые в условиях многократного введения соединения РУ-1205, свидетельствуют об отсутствии мю-опиоидной активации при многократном введении вещества.

Результаты данного экспериментального блока согласуются с ранее полученными данными, указывающими на наличие каппа-рецепторной активности соединения РУ-1205 и отсутствии влияния на мю- и дельта-опиоидные рецепторы.

## **Глава 6. Выявление сопутствующих эффектов соединения РУ-1205, опосредованных каппа-рецепторной активацией**

Свойства первых селективных каппа-рецепторных лигандов – производных арилацетамидов (U-50488, U-62066, PD 117302 и др.), не вызывавших респираторной депрессии, не имевших наркотического потенциала и не угнетавших моторику ЖКТ, стали основанием для рассмотрения каппа-опиоидного рецептора как более безопасной мишени для создания опиоидного анальгетика [Cheung C.W., 2014; Kivell, B., 2010; Спасов, А.А., 2009; Chavkin, C., 2011]. Однако каппа-опосредованная анальгезия сопровождалась дисфорическими проявлениями, седацией, ангедонией, мотивационными расстройствами и диуретическим действием. Это негативно сказалось на дальнейшем клиническом продвижении веществ [Kivell, B., 2010; Chavkin, C., 2011; Bruchas, M.R., 2007]. Опираясь на экспериментально установленную и описанную в предыдущих главах селективную каппа-опиоидную обезболивающую активность соединения РУ-1205, была поставлена задача дать экспериментальную оценку возможным сопутствующим эффектам тестируемого вещества, связанным с активацией каппа-рецептора *in vivo*. К таким эффектам относятся депрессивно-дисфорические расстройства, седация и диуретическое действие.

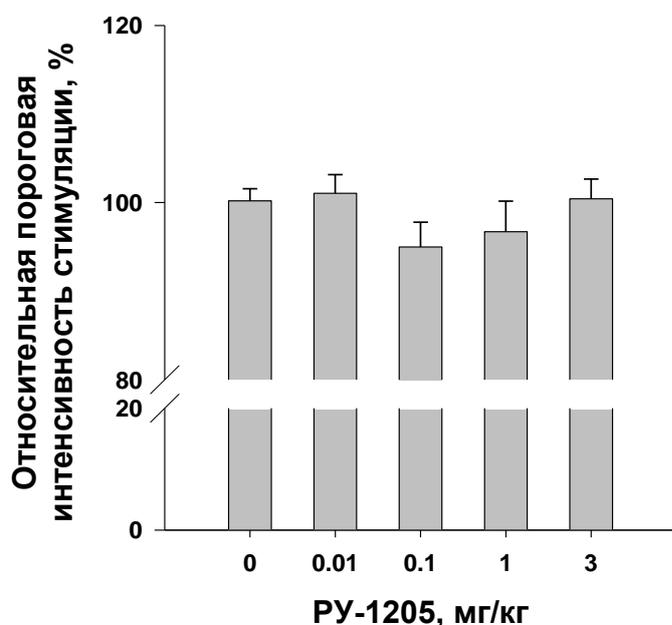
### **6.1 Оценка свойств соединения РУ-1205, сопряженных с формированием дисфорических расстройств**

В формирование каппа-опосредованных депрессивно-дисфорических свойств вовлечены структуры мозга, отвечающие за «наградные» и «наказующие» стимулы, мотивацию, страх, тревожность, общий эмоциональный фон. К ним относятся вентральная область покрышки, миндалевидные и прилежащие ядра, голубое ядро и др. Наибольшее значение в контексте взаимосвязи каппа-опиоидной активации с дисфорией имеет область вентральной покрышки. В своей работе Jonathan, M., (2015) приводит информацию, что эта структура в

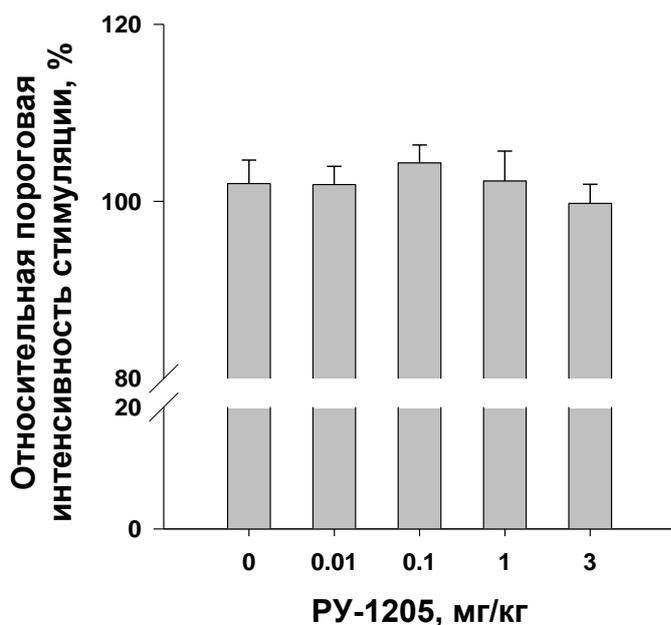
значительной мере ответственна за формирование аверсивных проявлений в экспериментах *in-vivo* [Jonathan, M., 2015]. Исходя из данных литературы [Bruchas, M.R., 2007; Bruchas, M.R., 2009], аверсивная реакция в отношении «провокаторов» дисфории, для грызунов является маркером состояния, аналогичного дисфории человека.

### **Влияние соединения РУ-1205 на показатели теста электрической самостимуляции мозга**

Средние значения порогов самостимуляции после введения растворителя составили  $52,3 \pm 4,5$  и  $52,9 \pm 4,1$   $\mu\text{A}$  для животных групп, получавших различные дозы РУ-1205 за 30 и 120 мин, соответственно. Соединение РУ-1205 не вызывало изменения порогов электрической самостимуляции зон «награды» мозга в диапазоне исследованных доз ( $F(4,36)=1,244$ ,  $p=0,310$  и  $F(4,36)=0,611$ ,  $p=0,658$  – при введении за 30 и 120 мин до начала теста, соответственно) (рис. 6.1.1 (а) и 6.1.1 (б)).



**Рисунок 6.1.1 (а).** Влияние соединения РУ-1205 на пороги электрической самостимуляции системы «награды» у крыс через 30 минут после введения вещества ( $M \pm m$ ).



**Рисунок 6.1.1 (б).** Влияние соединения РУ-1205 на пороги электрической самостимуляции системы «награды» у крыс через 120 минут после введения вещества ( $M \pm m$ ).

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что вещество РУ-1205 не обладает как положительными, так и отрицательными подкрепляющими свойствами в условиях данной экспериментальной модели.

### **Влияние соединения РУ-1205 на показатели теста самовведения**

Суммарные результаты представлены в таблице 6.1.2.

В эксперименте соединение РУ-1205 не вызывало выработку поведенческой реакции внутривенного самовведения, значительно отличающегося от самовведения растворителя (физиологический раствор), и, следовательно, не оказывало значимого подкрепляющего действия в диапазоне исследованных концентраций ( $R$ -критерий -  $F(6,58)=0,618$ ,  $p=0,715$ ). Зависимость самовведенных доз РУ-1205 не носила «классический» характер с выходом на плато насыщения.

Таблица 6.1.2

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

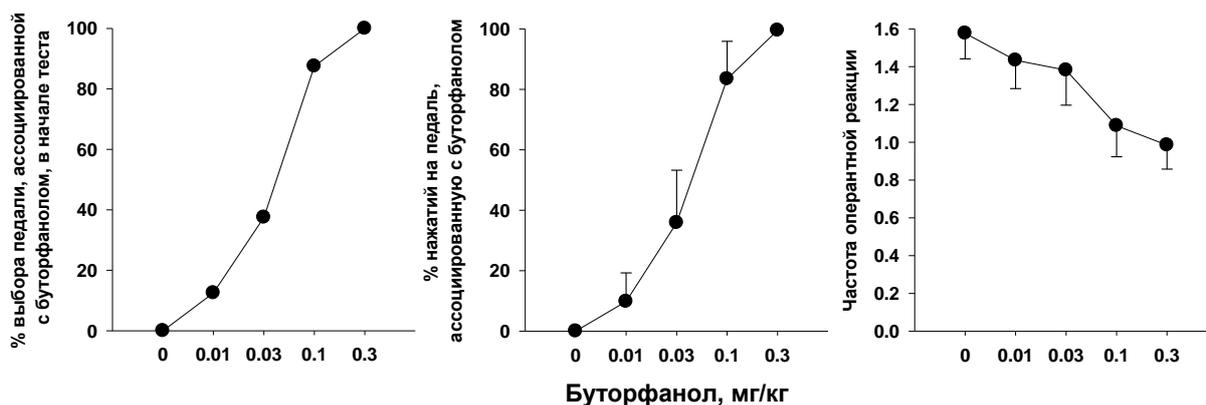
Концентрация вещества (мг/мл)	R- критерий	Кумулятивная доза (мг/кг)
<b>0 (вода)</b>	-0,02±0,06	—
<b>0 (изот. р-р NaCl)</b>	-0,03±0,05	—
<b>0,01</b>	-0,12±0,08	0,02±0,00
<b>0,03</b>	-0,04±0,09	0,10±0,02
<b>0,1</b>	0,00±0,08	0,33±0,06
<b>0,3</b>	-0,09±0,06	0,83±0,16
<b>0,56</b>	-0,02±0,09	1,77±0,28
<b>1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

Исходя из результатов данного теста, можно заключить, что у вещества РУ-1205 отсутствует первично-подкрепляющее и авersive действие.

### **Оценка дифференцировочных интероцептивных стимульных свойств соединения РУ-1205**

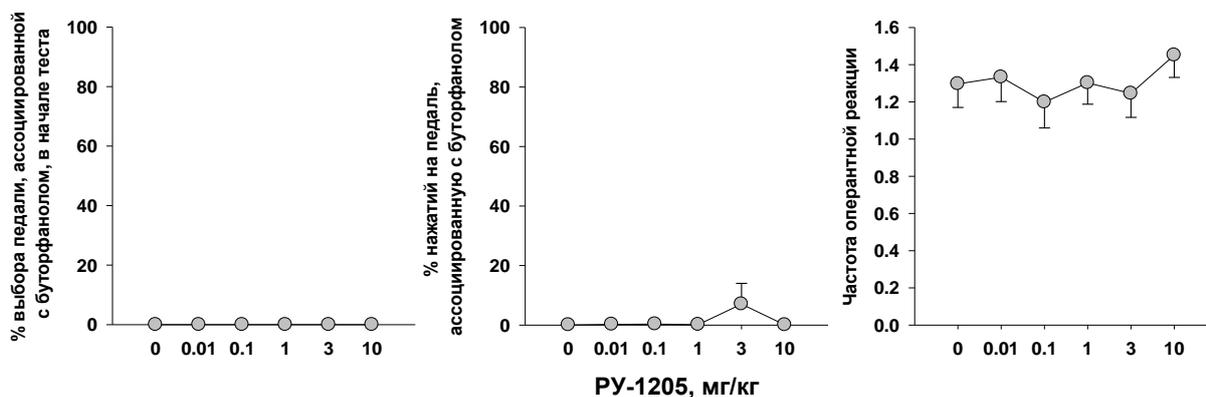
Крысы обучались процедуре лекарственной дифференцировки в среднем за 54 дня (28-75 дней). Во время контрольных сессий с тренировочной дозой буторфанола (0,3 мг/кг) или с 0,9% водным раствором NaCl количество нажатий на соответствующую подкрепляемую педаль превышало 95% от общего числа нажатий на обе педали за сессию.

При проведении тестов возрастание дозы буторфанола (0,01-0,3 мг/кг) дозозависимо увеличивало вероятность выбора крысами педали, ассоциированной с буторфанолом (рис. 6.1.3 (а); процент нажатий на педаль, ассоциированную с буторфанолом:  $F(4,24)=11,321$ ,  $p<0,01$ ), однако значимо снижало частоту оперантной реакции в дозах 0,1 и 0,3 мг/кг ( $F(4,24)=19,125$ ,  $p<0,01$ ).



**Рисунок 6.1.3 (а).** Дифференцировочные стимульные свойства буторфанолола.

Соединение РУ-1205 не обладало сходными с буторфанолом дифференцировочными interoцептивными стимульными свойствами (рис. 6.1.3 (б)). После введения РУ-1205 (0,01-10 мг/кг) ни одно из животных не выбрало в начале теста педаль, ассоциированную с буторфанолом; в целом за экспериментальную сессию процент выбора педали, ассоциированной с введением буторфанолола, не отличался от такового после введения растворителя ( $F(5,52)=0,923$ ,  $p=0,474$ ). В пределах диапазона исследованных доз соединение РУ-1205 не оказывало влияния на частоту оперантной реакции ( $F(5,52)=1,114$ ,  $p=0,364$ ).



**Рисунок 6.1.3 (б).** Выявление сходства дифференцировочных стимульных свойств исследуемого вещества РУ-1205 и буторфанолола.

Данные результаты позволяют полагать, что вещество РУ-1205 не обладает субъективно воспринимаемыми свойствами, соотносимыми с таковыми у препарата сравнения буторфанолола.

## Влияние соединения РУ-1205 на формирование условной реакции избегания места

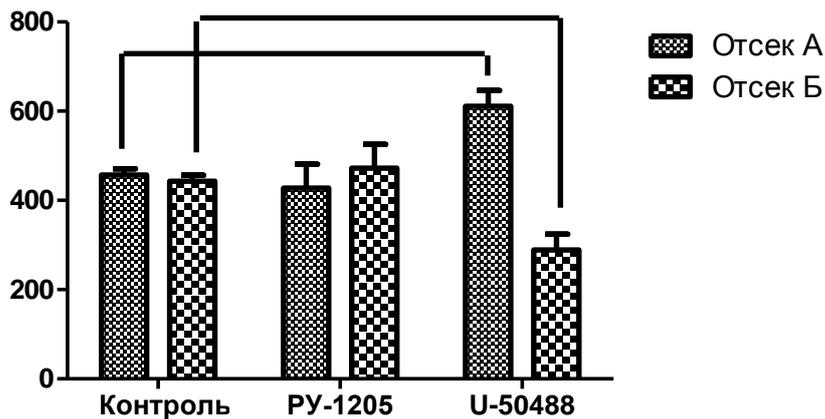
Методика формирования условной реакции избегания места направлена на выявление аверсивной активности веществ [Bruchas, M.R., 2007; Bruchas, M.R., 2009]. Стратифицированные по признаку отсутствия предпочтения отсеков животные, до обуславливания проводили в отсеках А (ассоциация с физиологическим раствором) и Б (ассоциация с тестируемым веществом) 457,3±13,8 и 442,6±13,8 секунд соответственно. После проведения тестовой сессии было установлено, что вещество РУ-1205 не вызывало статистически значимого предпочтения/избегания какого-либо из отсеков камеры в изученном диапазоне доз (табл. 6.1.4) (двухфакторный вариационный анализ).

*Таблица 6.1.4*

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

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

В то же время для соединения U-50488 (10 мг/кг) была установлена аверсивная активность (рис. 6.1.4). Грызуны статистически значимо избегали камеры, ассоциированной с введением данного вещества, проводя на 29,2% больше времени в отсеке, ассоциированном с введением растворителя (критерий Краскела-Уоллиса).



**Рисунок 6.1.4.** 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 ( $M \pm m$ ).

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

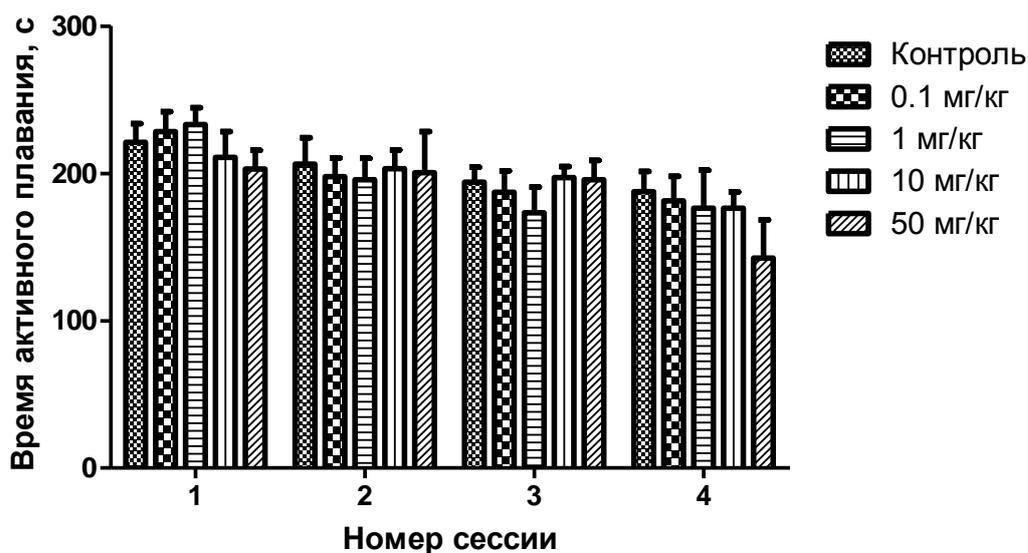
Таким образом, можно сделать вывод, что соединение РУ-1205 не активно на моделях по выявлению вторично подкрепляющего или аверсивного действия.

### **Влияние соединения РУ-1205 на показатели теста форсированного неизбежного плавания**

Данный тест свидетельствует о психодепрессорной активности веществ [Porsolt, R.D., 1977; Lim, W.C., 2005]. Принудительное плавание в контрольной группе грызунов вызывало реакцию иммобилизации, продолжительность которой в первой сессии составляла  $79,0 \pm 12,7$  секунд, что было в 2,8 раза меньше, чем время, затраченное на попытки активного сопротивления ( $221,0 \pm 12,7$  секунд). В последующих сессиях данное соотношение у интактных животных составляло 1:2,2, 1:1,8 и 1:1,7 соответственно для 2-й, 3-й и 4-й сессий (двухфакторный дисперсионный анализ,  $p = 0,0002$ ). Наблюдаемое снижение активного сопротивления согласуется с данными литературы [McLaughlin, J.P., 2003; Морковин, Е.И., 2014]. В эксперименте установлено, что время активного сопротивления опытных групп, получавших 0,1, 1, 10 и 50 мг/кг соединения РУ-1205, статистически значимо не отличалось от показателей группы контроля

(двухфакторный вариационный анализ) (рис. 6.1.5). Лишь в максимальной изученной дозе (50 мг/кг), и в последней экспериментальной сессии, у грызунов наблюдалась тенденция к снижению времени активного сопротивления.

Таким образом, можно заключить, что соединение РУ-1205 не имеет депрессивного компонента дисфорических проявлений.



**Рисунок 6.1.5.** Влияние соединения РУ-1205 (при внутрибрюшинном введении) на длительность активного сопротивления у мышей в эксперименте «повторное форсированное неизбежное плавание» ( $M \pm m$ ) (Двухфакторный вариационный анализ).

Приведенные в настоящей подглаве результаты позволяют сделать заключение о том, что вещество РУ-1205 не проявляет фармакологических свойств, способствующих формированию дисфории и патологического пристрастия, и, соответственно, об отсутствии влияния на мю-опиоидные рецепторы.

## 6.2 Седативное действие соединения РУ-1205

Smith, M.A. (2003) в своей работе описывает, что седативные проявления каппа-опиоидной активации сопряжены с падением дофаминовой нейротрансмиссии мезолимбического пути, при этом наблюдается снижение локомоторной активности, прямо коррелирующее с седацией [Smith, M.A., 2003]. При изучении способности соединения РУ-1205 и препарата сравнения буторфанола провоцировать развитие седации, использовались метод актометрии и тест «удержания на вращающемся стержне» [Vanderah, T.W., 2004]. Валидность теста «удержания на вращающемся стержне» для выявления седативной активности обоснована литературными данными [Pu, X.C., 1995; De la Peña, 2015; Takemoto, H., 2015; Estrada-Reyes, R., 2015; Valerio, G.N., 2002], свидетельствующими о взаимной корреляции седации и миорелаксации. Таким образом тест применим для выявления седации, а также неспецифических нарушений координации и тонуса [Vanderah, T.W., 2004].

Результаты экспериментов представлены в таблицах 6.2 (а), 6.2 (б). В эксперименте «удержания мышей на вращающемся стержне» в контрольной группе 100% животных удерживались на стержне в течение 3-х минут. Соединение РУ-1205 статистически значимо сокращало время удержания мышей на стержне в дозе 50 мг/кг. Буторфанол также вызывал статистически значимое снижение времени удержания грызунов на вращающемся стержне в дозах 50 мг/кг и более (табл. 6.2 (а)).

Таблица 6.2 (а)

**Влияние соединения РУ-1205 и буторфанола (при внутрибрюшинном введении) на длительность удержания мышей на вращающемся стержне ( $M \pm m$ ).**

Доза, мг/кг	Удержание на стержне, сек			
	30 мин	60 мин	120 мин	180 мин
<b>Контроль</b>				
—	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0
<b>Соединение РУ-1205</b>				
<b>0,1</b>	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0
<b>1</b>	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0
<b>10</b>	163,3±10,9	149,5±15,7	153,0±15,8	161,0±11,7
<b>25</b>	142,2±23,3	141,2±24,7	154,3±12,8	162,5±11,2
<b>50</b>	132,0±24,3*	148,0±32,0	134,4±28,0	141,8±17,0
<b>100</b>	42,2±12,3*	49,2±13,6*	95,8±28,0*	97,7±22,2*
<b>Буторфанол</b>				
<b>0,1</b>	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0
<b>1</b>	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0
<b>10</b>	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0
<b>25</b>	174,4±5,6	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0
<b>50</b>	129,5±28,7*	160,0±20,0	180,0±0,0	180,0±0,0
<b>100</b>	60,4±18,5*	119,4±22,6*	117,9±29,3*	125,3±26,5*

**Примечание:** \* - статистически значимые отличия от показателей контрольных групп (двухфакторный вариационный анализ, пост-тест Туке,  $p \leq 0,05$ ).

В то же время по методу актометрии установлено, что соединение РУ-1205 и буторфанол статистически значимо снижают спонтанную локомоторную активность мышей начиная с дозы 25 мг/кг и выше (табл. 6.2 (б)).

Таблица 6.2(б)

**Влияние соединения РУ-1205 и буторфанола (при внутрибрюшинном введении) на спонтанную локомоторную активность мышей в актометре.**

Вещество/группа	Доза, мг/кг	Локомоторная активность
<b>Контроль</b>	–	56,5±8,1
<b>Соединение РУ-1205</b>	<b>0,1</b>	57,7±7,4
	<b>1</b>	56,5±8,0
	<b>10</b>	52,2±8,4
	<b>25</b>	26,2±7,3*
	<b>50</b>	16,8±4,2*
	<b>100</b>	3,5±1,3*
<b>Буторфанол</b>	<b>0,1</b>	57,0±4,7
	<b>1</b>	54,2±8,0
	<b>10</b>	49,8±7,3
	<b>25</b>	24,8±4,7*
	<b>50</b>	21,0±5,8*
	<b>100</b>	13,2±2,0*

**Примечание:** \* - статистически значимые отличия от показателей контрольных групп (двухфакторный вариационный анализ, пост-тест Туке,  $p \leq 0,01$ ).

Для установления диапазона доз соединения РУ-1205 и буторфанола, свободного от проявлений седативной активности, с применением метода нелинейной регрессии, были установлены показатели 50% седативной дозы (ЭД<sub>50</sub> (седации)), равные 24,55 мг/кг и 17,66 соответственно. Далее был определен терапевтический индекс (ТИ) соединения РУ-1205 и референтного препарата в отношении седативной и анальгетической активностей (табл. 6.2 (в)), как это описано в работе Endoh Т., (1999). Показатель рассчитывался по формуле:

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

ЭД<sub>50</sub>(седации) – доза, соответствующая 50% седативной активности исследуемых веществ в тесте актометрии, ЭД<sub>50</sub>(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).

ТИ соединения РУ-1205 по седативной активности составил 1227,5, тогда как для препарата сравнения этот показатель соответствовал 88,3.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что дозы соединения РУ-1205, в которых возможно выявить седативную активность, во много раз выше максимальных анальгетических, а по показателю ТИ седативной активности, вещество превосходит буторфанол в 14 раз.

Таблица 6.2 (в)

**Среднее значение ЭД<sub>50</sub> для анальгетической эффективности соединения РУ-1205 и буторфанола по показателю МВЭ в тесте «горячая пластина», ЭД<sub>50</sub> для седативной активности соединения РУ-1205 и буторфанола, и терапевтический индекс (ТИ= ЭД<sub>50</sub>(седации)/ЭД<sub>50</sub>(анальгезии))**

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

### 6.3 Изучение диуретического действия соединения РУ-1205

Диуретическое действие присуще большинству селективных каппа-опиоидных лигандов [Chavkin, С., 2011]. Наличие соответствующей активности зависит от периода полураспада вещества в организме, а сама активность сопряжена с падением уровня плазменного вазопрессина, что связано с влиянием агонистов каппа-опиоидного рецептора на гипоталамо-гипофизарную ось [Inan, S., 2008; Pietrzak, R.H., 2014], а также, возможно, с усилением центральной симпатической стимуляции почечной активности [Brooks, D.P., 1995; Kapusta, D. R., 1993].

В контрольной группе крыс средний суммарный диурез (за 5 часов эксперимента) составил 2,95 мл с пиком мочеиспускания на 120 минуте после водной нагрузки (табл. 6.3). Для соединения РУ-1205 экспериментально была установлена диуретическая активность, зависящая от дозы и пути введения.

Отмечено, что при пероральном пути введения вещества РУ-1205 в дозе 5 мг/кг, уровень диуреза у грызунов не имеет статистически значимых отличий (двухфакторный вариационный анализ) от показателя группы контроля. Средний суммарный уровень диуреза составлял 2,85 мл. Характер зависимости мочеотделения от времени после введения вещества РУ-1205 показал, что пик диуреза приходится на 120 минуту после водной нагрузки. В то же время, при подкожном пути введения выявлено статистически значимое повышение объема диуреза в исследованных дозах (1 и 10 мг/кг) (двухфакторный вариационный анализ, пост-тест Туке,  $p \leq 0,05$ ). При этом в меньшей дозе вещества РУ-1205 наблюдается более выраженное возрастание объема диуреза по сравнению более высокой (табл. 6.3). 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.

Таким образом, можно заключить, что для соединения РУ-1205 установлена диуретическая активность, не носящая дозозависимый характер и в диапазоне доз 1-10 мг/кг зависящая от пути введения.

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

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

## 6.4 Заключение

При изучении неанальгетических эффектов соединения РУ-1205, обусловленных каппа-рецепторной активацией было установлено, что вещество не вызывает аверсивных эффектов, а седация развивается в дозах, многократно превосходящих анальгетические. Также установлено, что тестируемое соединение оказывает диуретическое действие.

В тестах электрической самостимуляции зон «награды» головного мозга (0,01-3 мг/кг), внутривенного самовведения (0,01-1 мг/мл), условной реакции избегания места (0,1-50 мг/кг), форсированного неизбежного плавания (0,1-50 мг/кг) и оценки дискриминантных стимульных свойств (0,01-1 мг/мл) вещество РУ-1205 оказалось неактивным. Это может служить благоприятным прогностическим признаком отсутствия дисфории в клинических испытаниях. Дополнительно, отсутствие активности вещества в данных моделях является признаком, подтверждающим отсутствие у вещества РУ-1205 мю-опиоидной активности. Для мю-опиоидных агонистов в данных тестах характерны проявления аддикции и эйфории, что связано с риском формирования патологического пристрастия [Everitt, В. J., 2013]. Данные, свидетельствующие об отсутствии дисфорической активности у вещества РУ-1205 не являются характерными для класса селективных каппа-опиоидных агонистов, однако вещества с похожими свойствами описаны в источниках литературы [White, K.L., 2015; Bruchas, M. R., 2007; Jonathan, M., 2015], а механизмы, опосредующие подобную активность частично установлены [Bruchas, M.R., 2007; Chavkin, C., 2011].

При изучении седативного компонента действия соединения РУ-1205 установлено, что дозы соединения РУ-1205, в которых развивается выраженная седация, многократно превосходят анальгетию. По показателю ТИ седативной активности вещество РУ-1205 превосходит буторфанол в 14 раз.

Соединение РУ-1205 оказывает диуретическое действие в диапазоне доз 1-10 мг/кг при подкожном введении, в меньшей дозе диуретическая активность

вещества выше. При пероральном введении в дозе 5 мг/кг, соединение РУ-1205 не имеет значимого влияния на уровень диуреза.

Совокупность полученных результатов дает основание полагать, что соединение РУ-1205 не имеет мю-агонистической активности и не обладает способностью вызывать дисфорию или формировать патологическое пристрастие. Седативное действие вещества РУ-1205 может проявляться в дозах, многократно превышающих анальгетические. Диуретическая активность соединения РУ-1205 проявляется в умеренно-высоких дозах (1-10 мг/кг) и зависит от пути введения. Данные эффекты не являются типичными, и требуют дальнейшего изучения.

## **Глава 7. Взаимодействие соединения РУ-1205 с анализаторами нейромедиаторных систем**

Каппа-опиоид-рецепторная система принимает участие в модуляции нейромедиаторных систем мозга [Pietrzak, R.H., 2014; Cahill, C.M., 2014; Mansour, A., 1987; Le Merrer, J., 2009]. При этом эффекты, сопровождающие центральную каппа-опиоидную активацию (анальгезия, психоэмоциональные расстройства, увеличение диуреза, модуляция вегетативной деятельности и секреции гормонов, когнитивные изменения) протекают со сдвигами нейромедиаторного баланса в структурах мозга (кора, лимбическая система, базальные ганглии и др.) и сопряженных нейронных цепях [Pietrzak, R.H., 2014; Cahill, C.M., 2014; Tsirkin, V.I., 2010; Ehrich, J. M., 2015]. Для каппа-рецепторных лигандов характерными считаются подавление дофаминергического (мезокортиколимбический путь) [Cahill, C.M., 2014; Chefer, V.I., 2000; Martinez, D., 2003] и серотонинергического (одноименный серотонинергический путь, берущий начало в ядрах шва) сигналинга [Lalanne, L., 2014; Ehrich, J.M., 2015]. Кроме того, активация каппа-опиоидных рецепторов сопряжена с влиянием на другие нейромедиаторные системы, включая ГАМК-ергическую [Hjelmstad, G.O., 2003], норадренергическую [Al-Hasani, R., 2013] и др. Разнообразное влияние каппа-рецепторной системы на медиаторную нейротрансмиссию и зависимость психотропных эффектов каппа-опиоидных агонистов от изменений нейромедиаторного баланса, явилось предпосылкой для изучения влияния соединения РУ-1205 на эффекты основных нейромедиаторных анализаторов *in vivo*.

### **7.1 Влияние соединения РУ-1205 на функциональную активность ЦНС**

В связи с изучением влияния соединения РУ-1205 на эффекты нейромедиаторных анализаторов в поведенческих тестах в широком диапазоне доз (1-100 мг/кг), предварительно была проведена оценка активности вещества в

данных дозах на вышеуказанных экспериментальных моделях данного блока, в отсутствии анализаторов. Полученные данные приведены в сводной таблице 7.1. В результате предварительных исследований было установлено, что соединение РУ-1205 в дозах 1 и 10 мг/кг существенно не влияет на поведенческую активность и неспецифические вегетативные реакции грызунов. В то же время в дозе 100 мг/кг вещество РУ-1205 выражено угнетает локомоторную активность, температуру тела, тонус и координацию мышц, рефлексорную активность (табл. 7.1).

Таблица 7.1

**Влияние вещества РУ-1205 на поведенческую активность и вегетативные реакции мышей ( $M \pm m$ )**

Доза РУ-1205 (мг/кг) / Признак	Контроль	1	10	100
Спонтанная локомоторная активность (метод актометрии)	56,2±8,1	58,7±7,4	55,8±8,4	3,5±0,8 (↓)
Вегетативные функции (температура тела, °С)	37,20±0,40	37,86±0,19	36,91±0,47	32,55±0,41 (↓)
Мышечный тонус и координация (тест «удержание на вращающемся стержне», сек)	180,0±0,0	180,0±0,0	180,0±0,0	49,2±13,6 (↓)
Рефлексы (ипсилатеральный рефлекс)	норма	норма	норма	↓

**Обозначения:** «норма» соответствие физиологической норме, «↓» угнетение признака;

Liu, X. (2013) в своей работе приводит данные о том, что неспецифическая дезинтеграция нейронных взаимоотношений мозга (общее угнетение ЦНС), может формироваться в высоких дозах фармакологически-активных веществ, и ведет к развитию центрального торможения, проявляющегося выраженной седацией, миорелаксацией и гипорефлексией. Отмеченные в предварительных исследованиях снижение локомоторной активности и тонуса мышц, а также

гипорефлексия в ответ на соединение РУ-1205 в дозе 100 мг/кг, могут быть признаком неспецифического угнетения ЦНС. Иных проявлений влияния соединения РУ-1205 на ЦНС (паркинсонизм, фасцикуляции, генерализованные судороги, стереотипии, гиперкинезы, каталепсия) в предварительных экспериментах обнаружено не было.

## **7.2 Влияние соединения РУ-1205 на эффекты фенамина у мышей**

Фенамин является неспецифическим активатором моноаминергических нейромедиаторных систем ЦНС. Действуя пресинаптически, он усиливает концентрацию моноаминов в синаптической щели. Это сопровождается развитием поведенческих стереотипий. При введении животным, анализатор увеличивает спонтанную двигательную активность, что, предположительно, может быть связано с активирующим влиянием на дофаминовую нейротрансмиссию мезолимбической системы [Островская, Р.У., 2012; Lodge, D.J., 2008]. Из источников литературы [Cahill, С.М., 2014; Faure, А., 2008; Martinez, D., 2008; Trifilieff, P., 2013] известно, что каппа-опиоидные агонисты способны подавлять дофаминергическую активность на данном уровне.

При подкожном введении в дозе 6 мг/кг фенамин в 2 раза увеличивал показатели спонтанной двигательной активности мышей, в сравнении с группой интактного контроля (табл. 7.2). Соединение РУ-1205 при внутрибрюшинном введении оказывало дозозависимое угнетение эффекта фенамина. В дозе 1 мг/кг отмечалась тенденция к снижению спонтанной локомоторной активности на 10%. Однако в дозе 10 мг/кг показатели двигательной активности грызунов статистически значимо (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p < 0,05$ ) снизились на 65% по сравнению с животными, получавшими только фенамин. При этом указанные эффекты соответствовали показателям группы интактного контроля. Угнетение фенамин-индуцированной локомоции в дозе 10 мг/кг может быть связано с подавлением дофаминергического сигналинга в мезолимбическом и мезокортикальном трактах [Lodge, D.J., 2008; Островская, Р.У., 2012]. В

максимальной изученной дозе 100 мг/кг тестируемое вещество проявило наибольшую активность на модели, угнетая спонтанную локомоцию мышей на 80% по сравнению с животными, получавшими только фенамин, однако учитывая общее угнетение ЦНС, развивающийся в данной дозе (табл. 7.1), эффект вероятно не является специфичным.

Таблица 7.2

**Влияние соединения РУ-1205 (при внутрибрюшинном введении) на гиперактивность мышей, индуцированную внутрибрюшинным введением фенамина (6 мг/кг) ( $M \pm m$ ).**

Вещество/группа	Двигательная активность
Контроль	133,1±2,3
Фенамин	265,2±13,7*
Фенамин+РУ-1205 (1мг/кг)	240,0±35,3*
Фенамин+РУ-1205 (10мг/кг)	120,8±13,1 <sup>#</sup>
Фенамин+РУ-1205 (100мг/кг)	53,7±9,0 <sup>#</sup>

**Примечание:** \* - статистически значимые различия по отношению к интактному контролю (критерий Краскелла-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p < 0,05$ ); # - статистически значимые отличия по отношению к контрольной группе животных, получавшей только фенамин (критерий Краскелла-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p < 0,05$ ).

### 7.3 Действие соединения РУ-1205 на эффекты L-ДОФА у мышей

L-ДОФА является предшественником дофамина. Эксперименты по выявлению взаимодействия эффектов соединения РУ-1205 и прекурсора дофамина проводились для определения способности тестируемого вещества оказывать дофаминомиметическое действие, наиболее часто ассоциированное с подавлением активности ферментов-утилизаторов дофамина. Как правило, высокую активность на данной модели проявляют ингибиторы MAO [Андреева, Н.И., 2005]. Высокие дозы L-ДОФА (500 мг/кг), в отличие от низких (100 мг/кг), вызывают у грызунов развитие стереотипных поведенческих реакций. При наличии активности вещества на данной модели, у животных, получавших меньшие подпороговые для стереотипной реакции дозы L-ДОФА, наблюдаются стереотипные проявления, характерные для высоких доз анализатора.

В эксперименте L-ДОФА в дозе 500 мг/кг через 35 минут после введения вызывал развитие выраженной стереотипии, по шкале Ворониной Т.А. равной 3-м баллам у всех животных. Проявления стереотипии ослабевали в течение всего времени измерения, и к 140 минуте эксперимента выраженность признака по балльной шкале снизилась до  $1,66 \pm 0,25$  баллов. Анализатор в низких дозах не вызывал изменений поведенческой активности мышей. При комбинации соединения РУ-1205 во всем изученном диапазоне доз с L-ДОФА, статистически значимых проявлений стереотипии у грызунов не отмечалось (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна) (табл. 7.3).

Таблица 7.3

**Влияние соединения РУ-1205 (при внутрибрюшинном введении) на поведенческие эффекты, вызванные внутрибрюшинным введением L-ДОФА (100 мг/кг) у мышей ( $M \pm m$ ).**

Вводимые вещества		Время после введения L-ДОФА, мин	Баллы#
РУ-1205 (мг/кг)	L-ДОФА (мг/кг)		
-	500	35	3,00±0,00*
		70	2,33±0,25*
		105	1,66±0,25*
		140	1,66±0,25*
-	100	35	0,00±0,00
		70	0,40±0,24
		105	0,33±0,25
		140	0,00±0,00
1	100	35	0,33±0,25
		70	0,00±0,00
		105	0,00±0,00
		140	0,00±0,00
10	100	35	0,00±0,00
		70	0,40±0,24
		105	0,00±0,00
		140	0,33±0,25
100	100	35	0,00±0,00
		70	0,33±0,25
		105	0,00±0,00
		140	0,00±0,00

**Примечание:** \* - статистически значимые различия по отношению к группе, получавшей L-ДОФА в дозе 100 мг/кг (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p < 0,05$ ); # - баллы присваивались в соответствии со шкалой Ворониной Т.А. и др. для доклинической оценки аномалий двигательных реакций при введении L-ДОФА и отражали характер стереотипии (балльная шкала: 1 балл - редкие аномальные движения, которые занимают меньше 50% времени наблюдения; 2 балла - частые аномальные движения, которые занимают 50% времени наблюдения; 3 балла - непрерывные аномальные двигательные акты с сохранной реакцией на звуковой раздражитель; 4 балла - непрерывные, аномальные двигательные акты).

#### 7.4 Влияние соединения РУ-1205 на каталептогенный эффект галоперидола у мышей

«Типичные» нейролептики в экспериментах *in vivo* вызывают каталепсию, обусловленную блокадой D<sub>2</sub>-рецепторов на уровне nigростриарной системы. По данным Marin, С. (1996), агонисты каппа-опиоидных рецепторов не влияют на каталептогенный эффект антагонистов D<sub>2</sub>-рецепторов. В противоположность этому, мю-опиоидные агонисты по независимым механизмам усиливают галоперидол-индуцированную каталепсию в дозах равных, или незначительно превосходящих анальгетические [Erkent, U., 2006; Kiritsy-Roy, A. J., 1989; Marin, С., 1996; Gargiulo, S., 2012].

Галоперидол в дозе 1 мг/кг (при внутривентральном введении) индуцировал развитие состояния каталепсии у мышей, проявлявшееся в удержании позы «лектора». Средняя продолжительность удержания позы в контроле составляла 93,7±15,7 секунд. Через 20 минут после комбинированного введения галоперидола и соединения РУ-1205 в дозах 1 и 10 мг/кг, усиление каталептогенного эффекта анализатора не наблюдалось. Статистически значимое увеличение продолжительности сохранения навязанной позы отмечалось только в дозе соединения РУ-1205 100 мг/кг (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p \leq 0,05$ ) (табл. 7.4), при этом длительность удержания позы животными данной группы в 100% случаев достигала максимального времени экспозиции, составлявшего 3 минуты.

**Влияние соединения РУ-1205 на длительность удержания мышами «позы лектора» через 20 минут после внутрибрюшинного введения галоперидола (1 мг/кг) ( $M \pm m$ ).**

Группа/вещество	Доза, мг/кг	Длительность удержания позы «лектора», сек
Галоперидол (контроль)	—	93,7±15,7
РУ-1205+галоперидол	1	89,8±12,7
	10	84,4±8,6
	100	180,0±0,0*

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

Таким образом, вещество РУ-1205, вероятно, не имеет влияния на дофаминовый сигналинг нигростриарной системы. Кроме того, характерного для мю-опиоидных агонистов потенцирования каталептогенного эффекта в дозах, близких к анальгетическим ( $ED_{50}$  на модели «горячая пластина» — 0,02 мг/кг) также не наблюдалось. Усиление галоперидол-индуцированной каталепсии только в дозе 100 мг/кг вероятно связано с неспецифическим угнетением ЦНС (табл. 7.1).

### **7.5 Действие соединения РУ-1205 на стереотипное поведение крыс, вызванное апоморфином**

Известно, что стереотипия, индуцируемая апоморфином в умеренных дозах (1 мг/кг), сопровождается такими проявлениями, как принохивание, покусывание, лизание, стойки и др., и является симптомом активации дофаминовой нейротрансмиссии в нигростриарной системе [Dunn, R. W., 1986]. Тест с апоморфином направлен на выявление способности соединений влиять на дофаминергическую нейротрансмиссию. При наличии дофаминдепримирующей активности на указанном нейронном пути, наблюдается подавление стереотипии [Островская, Р.У., 2012; Skorupska, M., 1989].

Выраженность стереотипии в группе контроля, получавшей апоморфин в дозе 1 мг/кг, соответствовала 4-м баллам. Соединение РУ-1205 во всех изученных дозах не оказывало статистически значимого влияния на выраженность апоморфин-индуцированной стереотипии у мышей (критерий Краскелла-Уоллиса, пост-тест Данна) (табл. 7.5). В максимальной дозе вещества РУ-1205 отмечалась тенденция к снижению выраженности стереотипной реакции. Отсутствие влияния вещества РУ-1205 на апоморфин-индуцированную стереотипию указывает на отсутствие влияния на дофаминовую нейротрансмиссию нигростриарной системы, а статистически незначимый эффект в дозе 100 мг/кг может быть опосредован неспецифическим угнетением ЦНС (табл. 7.1).

Таблица 7.5

**Влияние соединения РУ-1205 (при внутрибрюшинном введении) на стереотипию крыс, индуцированную подкожным введением апоморфина (1 мг/кг) ( $M \pm m$ ).**

Вещество/группа	Стереотипия, баллы
Апоморфин (контроль)	4,00±0,00
РУ-1205 (1 мг/кг) + апоморфин	4,00±0,00
РУ-1205 (10 мг/кг) + апоморфин	4,00±0,00
РУ-1205 (100 мг/кг) + апоморфин	3,11±0,56

Отсутствие статистически значимой активности вещества РУ-1205 в дозах 1 и 10 мг/кг может указывать на отсутствие влияния исследуемого соединения на дофаминергический сигналинг в нигростриарной системе.

## **7.6 Воздействие соединения РУ-1205 на гиперкинез мышей, вызванный 5-гидрокситриптофаном**

5-гидрокситриптофан (5-ГТФ) является биопрекурсором серотонина. Данный анализатор вызывает подъем синаптического содержания серотонина в медиальной префронтальной коре [Lambe, E.K., 2000], что у грызунов проявляется гиперкинезом (встряхивания головой, *twitches*). Известно, что каппа-

опиоидные агонисты способны подавлять данную активность [Werkheiser, J. L., 2007; Marek, G. J., 2003].

В ходе эксперимента в группе контроля у грызунов отмечался 5-ГТФ-индуцированный гиперкинез с максимальным количеством встряхиваний в интервале между 10 и 20 минутами исследования с последующим постепенным снижением эффекта к 30 минуте регистрации (табл. 7.6). Количество встряхиваний соответствовало  $8,4 \pm 1,7$ ,  $16,1 \pm 3,2$  и  $9,1 \pm 1,2$  секунд соответственно для трех исследованных временных интервалов. При предварительном введении соединения РУ-1205 грызунам в дозе 1 мг/кг, статистически значимого влияния вещества на количество встряхиваний головой не отмечалось. В дозе 10 мг/кг вещества РУ-1205 во временной точке 10 минут отмечалось статистически значимое снижение количества встряхиваний головой (двухфакторный вариационный анализ, пост-тест Туке,  $p < 0,05$ ). В то же время в дозе 100 мг/кг вещество РУ-1205 практически полностью подавляло стереотипию у всех животных (табл. 7.6) (двухфакторный вариационный анализ, пост-тест Туке,  $p < 0,05$ ). Эффект, наблюдаемый в максимальной дозе, вероятно, может быть обусловлен неспецифическим угнетением ЦНС (табл. 7.1).

Таблица 7.6

**Влияние соединения РУ-1205 на интенсивность гиперкинеза «встряхивание головой» у мышей, индуцированного внутрибрюшинным введением 5-гидрокситриптофана (300 мг/кг) ( $M \pm m$ ).**

Вещество/группа	Количество «встряхиваний» головы за минуту, ед.		
	10 минут после введения 5-ГТФ	20 минут после введения 5-ГТФ	30 минут после введения 5-ГТФ
5-ГТФ (контроль)	8,4±1,7	16,1±3,2	9,1±1,2
РУ-1205 (1 мг/кг) + 5-ГТФ	6,2±1,8	9,8±2,7	8,8±2,7
РУ-1205 (10 мг/кг) + 5-ГТФ	5,2±1,3*	10,2±1,7	9,8±1,0
РУ-1205 (100 мг/кг) + 5-ГТФ	0,5±0,3*	4,3±2,1*	3,3±1,6*

**Примечание:** \* – статистически значимо по отношению к контролю (двухфакторный вариационный анализ, пост-тест Туке,  $p < 0,05$ ).

Таким образом, установленная способность соединения РУ-1205 подавлять 5-ГТФ-индуцированную стереотипию в дозе 10 мг/кг может свидетельствовать о способности угнетать серотонинергическую нейротрансмиссию в медиальной префронтальной коре. Данная активность может быть сопутствующим проявлением каппа-опиоидного действия [Werkheiser, J. L., 2007; Marek, G. J., 2003]. Выраженное угнетение стереотипии в дозе 100 мг/кг может быть связано с угнетением ЦНС (табл. 7.1).

### 7.7 Влияние соединения РУ-1205 на эффекты резерпина

Известно, что резерпин вызывает истощение запасов дофамина, норадреналина и серотонина и снижение нейромедиаторной передачи [Verheij, M.M., 2009]. Параметры, регистрируемые у грызунов в данном эксперименте: локомоторная активность, блефароптоз, ректальная температура.

Резерпин-опосредованное снижение локомоции связано с двумя основными факторами:

1) Подавление резерпином дофаминовой передачи в мезолимбической системе. Данный эффект устраняется дофамиметиками, а также бета-адреномиметиками и альфа-адреноблокаторами, активирующими собственные дофаминергические влияния [Verheij, M.M.M., 2009].

2) Подавление резерпином дофаминовой нейротрансмиссии в нигростриарной системе, ведущее к формированию паркинсоноподобной гипокинезии [Vonvoigtlander, P.F., 1984; Hughes, N.R., 1998]. Данный гипокинетический эффект устраняется дофаминергическими агентами и альфа-адреномиметиками [Delaville, C., 2011; Hill, M.P., 1999].

Кроме того, при активации каппа-опиоидного рецептора может отмечаться изменение эффекта резерпина в зависимости от дозы. В меньших дозах происходит устранение нигростриарного воздействия резерпина (2-й пункт) и повышение локомоции, а в более высоких – подавление мезолимбической нейротрансмиссии и снижение локомоции (1-й пункт) [Hill, M.P., 1999; Cox, H., 2007].

Также, под воздействием резерпина нарушается автономная регуляция, что сопровождается гипотермией и блефароптозом [Воронина, Т.А., 2012]. В группе контрольных животных, получавших только резерпин, статистически значимо (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p \leq 0,05$ ) проявились следующие признаки: гипокинезия (практически полное устранение спонтанной локомоторной активности грызунов относительно интактного контроля), гипотермия (среднее снижение ректальной температуры на  $2,2^\circ\text{C}$  относительно физиологической нормы в интактном контроле), и блефароптоз (соответствовал  $1,4 \pm 0,6$  баллов при максимально возможных 3-х по шкале Ворониной Т.А. (2012)) (табл. 7.7 (а) и табл. 7.7 (б)). Полученные результаты согласуются с данными литературы [Hill, M.P., 1999] об активности резерпина.

Соединение РУ-1205 во всем диапазоне доз (1-100 мг/кг) не вызывало статистически значимого устранения эффектов резерпина на спонтанную локомоцию (табл. 7.7 (а)).

В дозах вещества РУ-1205 1 и 10 мг/кг статистически значимых изменений ректальной температуры и блефароптоза относительно контрольной группы грызунов, получавших только резерпин, не отмечалось. Однако в максимальной изученной дозе соединения РУ-1205 (100 мг/кг) наблюдалось резкое усиление выраженности гипотермии и блефароптоза. Показатель ректальной температуры в данной группе животных достигал значения 32°C, что соответствует снижению более чем на 6°C ниже физиологической нормы, и нижнему порогу чувствительности термометра. Блефароптоз у животных, получавших вещество РУ-1205 в дозе 100 мг/кг статистически значимо усиливался (табл. 7.7 (б)) (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p \leq 0,05$ ).

Таким образом, установленные закономерности взаимодействия соединения РУ-1205 с эффектами резерпина, позволяют заключить, что вещество не обладает способностью усиливать активность моноаминной трансмиссии в ЦНС, а эффекты, наблюдаемые в дозе 100 мг/кг, вероятно, могут быть соотнесены с угнетением ЦНС.

Таблица 7.7 (а)

**Влияние соединения РУ-1205 на спонтанную локомоторную активность, индуцированную внутрибрюшинным введением резерпина (2,5 мг/кг) у мышей (M±m).**

Вещество/группа	Спонтанная локомоторная активность
Контроль	133,1±2,3
Резерпин	5,1±0,7*
РУ-1205 (1мг/кг) + резерпин	4,7±1,2*
РУ-1205 (10мг/кг) + резерпин	4,7±0,5*
РУ-1205 (100мг/кг) + резерпин	1,2±0,8*

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

Таблица 7.7 (б)

**Влияние соединения РУ-1205 на проявления вегето-депрессорной активности резерпина (при предварительном введении резерпина в дозе 2,5 мг/кг внутрибрюшинно) у мышей (M±m).**

Вещество/ группа	Температура, °С			Блефароптоз, баллы Ω		
	Исход	4 час	4,5 час	Исход	4 час	4,5 час
Резерпин	38,2±0,4	35,5±0,5*	35,3±0,7	3,0±0,0	1,2±0,4*	1,4±0,6*
РУ-1205 (1мг/кг) + резерпин	38,4±0,3	35,5±0,5*	35,4±0,9*	3,0±0,0	1,1±0,4*	1,5±0,5*
РУ-1205 (10мг/кг) + резерпин	38,4±0,3	35,5±0,7*	35,0±1,4*	3,0±0,0	0,5±0,1*	0,8±0,2*
РУ-1205 (100мг/кг) + резерпин	38,0±0,5	34,5±0,5*	32,1±0,2*#	3,0±0,0	0,6±0,2*	0,0±0,0*#

**Примечание:** \*- статистически значимо по отношению к исходным данным (депрессивное влияние резерпина); (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p \leq 0,05$ ); # – статистически значимо по отношению к аналогичной временной точке группы контроля (депрессивное влияние соединения РУ-1205) (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p \leq 0,05$ ); Ω - баллы присваивались в соответствии со шкалой по Ворониной Т.А. и др. для доклинической оценки блефароптоза при введении резерпина и отражали характер стереотипии (3 балла – полностью открытая глазная щель; 2 балла – 1-2 мм; 1 балл – менее 1 мм).

**Порядок проведения манипуляций и регистрации данных:** измерение исходных показателей и введение резерпина => инкубация 4 часа => измерение показателей, указывающих на развитие вегетодепрессорной активности резерпина и введение соединения РУ-1205 => измерение показателей взаимодействия эффектов обоих веществ.

## 7.8 Воздействие соединения РУ-1205 на ареколиновый тремор у мышей

Ареколин является М-холиномиметиком, способным проходить гематоэнцефалический барьер и оказывать влияние на холинергические структуры мозга, при этом у грызунов развивается паркинсоноподобный гиперкинез в виде тремора [Lukomskaia, N. Ya., 2008]. Изменение эффекта анализатора на фоне других веществ, свидетельствует о наличии центральной холинергической активности, вовлекающей м-холинорецепторы [Андреева, Н.И., 2005].

В группе контроля ареколин в дозе 25 мг/кг вызывал у всех грызунов развитие тремора выраженностью 3 балла. Латентный период начала тремора в группе контроля составлял  $67,33 \pm 9,03$  секунд, длительность была равна  $1107,00 \pm 59,59$  секунд. Соединение РУ-1205 во всем диапазоне доз (1-100 мг/кг) не оказывало статистически значимого влияния на эффекты нейромедиаторного анализатора (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна) (табл. 7.8).

Таблица 7.8

**Влияние соединения РУ-1205 (при внутрибрюшинном введении) на латентный период наступления, и выраженность тремора, индуцированного подкожным введением ареколина (25 мг/кг) ( $M \pm m$ ).**

Вещество/группа	Латентный период тремора, сек	Длительность тремора, сек	Выраженность тремора, баллы#
Ареколин (контроль)	67,33±9,03	1107,00±59,59	3,00±0,00
РУ-1205 (1мг/кг) + Ареколин	66,70±5,70	1135,17±63,16	3,00±0,00
РУ-1205 (10мг/кг) + Ареколин	65,00±1,15	1111,50±17,60	3,00±0,00
РУ-1205 (100мг/кг) + Ареколин	67,50±11,07	1167,20±86,45	3,00±0,00

**Примечание:** # - баллы присваивались в соответствии со шкалой по Ворониной Т.А. и др. (2012), применяемой для доклинической оценки аномалий двигательных реакций при введении ареколина. Балльная шкала: 0 баллов – отсутствие тремора, 1 балл - локальный мелкоамплитудный тремор головы, передних лап или хвоста, 2 балла - локальный среднеамплитудный тремор, 3 балла - генерализованный мелко- или среднеамплитудный тремор всего тела).

Отсутствие эффекта соединения РУ-1205 на данной модели указывает на отсутствие у вещества м-холинергической активности.

### 7.9 Влияние соединения РУ-1205 на никотиновый тремор у мышей

Никотин является н-холиномиметиком, способным индуцировать у грызунов тремор и судороги [Mansner, R., 1977]. Изменение эффектов нейромедиаторного анализатора на фоне действия веществ, свидетельствует о холинергической активности, возможно связанной с влиянием на н-холинорецепторы. В контрольной группе животных никотин в дозе 6 мг/кг при подкожном введении вызывал развитие тремора (латентный период 61,0±5,1) и судорог (латентный период 100,5±4,4). При предварительном введении соединения РУ-1205 эффекты нейромедиаторного анализатора не имели

статистически значимых различий с аналогичными показателями группы контроля (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна) (табл. 7.9).

Таблица 7.9

**Влияние соединения РУ-1205 (при внутрибрюшинном введении) на тремор и судороги у мышей, индуцированные подкожным введением никотина (6 мг/кг) ( $M \pm m$ ).**

Вещество/группа	Латентный период тремора, сек	Латентный период судорог, сек	Количество животных с судорогами, %
<b>Никотин (контроль)</b>	61,0±5,1	100,5±4,4	100,0
<b>Никотин + РУ-1205 (1 мг/кг)</b>	62,2±3,8	105,8±4,3	100,0
<b>Никотин + РУ-1205(10 мг/кг)</b>	63,5±7,8	108,8±12,5	100,0
<b>Никотин+РУ-1205(100 мг/кг)</b>	70,7±5,1	106,3±5,5	71,4

Отсутствие активности соединения РУ-1205 на данной модели может свидетельствовать об отсутствии у вещества н-холинергической активности.

#### **7.10 Влияние соединения РУ-1205 на судорожный эффект пикротоксина**

Пикротоксин обладает способностью устранять активирующее влияние ГАМК на ГАМК<sub>A</sub>-рецепторный комплекс. В дозе 10 мг/кг анализатор способен индуцировать тремор, клонические и клонико-тонические судороги [Kesim, M., 2012]. Известно, что каппа-опиоидная активация может подавлять активность пикротоксина [Lemos, J. C., 2010]. В настоящем эксперименте регистрация активности вещества на эффекты пикротоксина производилась по признакам латентного периода тремора и судорог, количества судорожных состояний и времени гибели.

В группе контрольных животных, получавших только пикротоксин, регистрируемые показатели равнялись 253,3±41,5 секунд для латентного периода тремора и 368,2±56,3 секунд для латентного периода судорожной активности. Количество судорожных актов составляло 24,0±4,2 секунд, а время гибели – 860,0±90,2 секунд от момента введения анализатора (табл. 7.10). Соединение РУ-

1205 в дозе 1 мг/кг не оказывало статистически значимого влияния на регистрируемые показатели. Однако в дозе 10 мг/кг вещество РУ-1205 статистически значимо увеличивало продолжительность латентного периода наступления судорог на 41%, а в дозе 100 мг/кг отмечалось выраженное статистически значимое угнетающее влияние на все регистрируемые показатели (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p \leq 0,05$ ) (табл. 7.10).

Таблица 7.10 (а)

**Влияние соединения РУ-1205 (при внутрибрюшинном введении) на эффекты, индуцируемые пикротоксином (10 мг/кг, при внутрибрюшинном введении) у мышей ( $M \pm m$ ).**

Вещество/ группа	Латентный период тремора, сек	Латентный период судорог, сек	Число судорожных состояний	Время смерти, сек
Пикротоксин (контроль)	253,3±41,5	368,2±56,3	24,0±4,2	860,0±90,2
РУ-1205 (1 мг/кг) + пикротоксин	311,8±26,7	393,2±20,8	22,6±4,0	911,7±61,0
РУ-1205(10 мг/кг) + пикротоксин	355,8±52,5	519,5±33,3*	22,8±5,8	1102,0±119,7
РУ-1205(100мг/кг) + пикротоксин	632,0±37,7*	2210,7±84,3*	3,7±0,4*	2048,0±4,0*

**Примечание:** \* – статистически значимо по отношению к контролю (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p \leq 0,05$ );

Установленная на данной модели способность соединения РУ-1205 подавлять эффекты пикротоксина в дозе 10 мг/кг, согласуется с информацией о наличии у агонистов каппа-опиоидных рецепторов ГАМК-эргического воздействия [Lemos, J.C., 2010; Frey, H.H., 1988]. Отмеченное в дозе 100 мг/кг вещества РУ-1205 угнетение всех регистрируемых показателей может быть следствием общего депримирующего влияния на ЦНС (табл. 7.1).

## 7.11 Заключение

Опиоидные рецепторы вносят разнообразный вклад в нейромедиацию ЦНС [Everitt, B. J., 2013; Chefer, V.I., 2000; Chavkin, C., 2011; Jonathan, M., 2015]. Описанные в данной главе тесты отражают влияние вещества РУ-1205 на дофаминергическую, норадренергическую, серотонинергическую, холинергическую и ГАМК-эргическую нейромедиаторные передачи. Совокупность полученных результатов исследования приведены в сводной таблице 7.11.

Таблица 7.11

### Влияние соединения РУ-1205 на эффекты нейромедиаторных анализаторов.

Эффект анализатора \ Доза РУ-1205 (мг/кг)	1	10	100
<b>Норадреналинергическая нейротрансмиссия</b>			
Резерпиновая гипотермия, блефароптоз	0	0	↓↓
<b>Холинергическая нейротрансмиссия</b>			
Ареколиновый тремор, интенсивность, длительность	0	0	0
Никотиновый тремор, судороги	0	0	0
<b>ГАМК-эргическая нейротрансмиссия</b>			
Пикротоксин-индуцированный тремор, судороги	0	↓	↓↓
<b>Серотонинергическая нейротрансмиссия</b>			
5-ГТФ-индуцированный гиперкинез	0	↓	↓↓
<b>Дофаминергическая нейротрансмиссия</b>			
Фенамин-индуцированная гиперактивность	0	↓	↓↓
Апоморфиновая стереотипия	0	0	0
Галоперидол-индуцированная каталепсия	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.

В результате проведенной работы можно сделать вывод, что каппа-опиоидный агонист, соединение РУ-1205 в дозе 10 мг/кг, может оказывать значимое угнетающее воздействие на дофаминовую нейротрансмиссию мезолимбической и мезокортикальной системы, что установлено в тесте с фенамином. Это свойственно для селективных каппа-опиоидных лигандов [Cahill, С.М., 2014]. При этом вещество, вероятно, не имеет выраженного влияния на дофаминовую нейротрансмиссию нигростриарной системы, что установлено в тестах галоперидол-индуцированной каталепсии и апоморфиновой стереотипии, а также резерпин-индуцированной гипокинезии. Вещество РУ-1205 не усиливает стереотипию, вызванную L-ДОФА. Это указывает на отсутствие подавления пресинаптической утилизации дофамина (эффект, подобный ингибиторам МАО). Соединение РУ-1205 не оказывает выраженного влияния на моноаминную регуляцию вегетативных центров в тесте резерпин-индуцированной гипотермии. Вещество РУ-1205 статистически значимо не влияет на холинергическую нейротрансмиссию, что установлено в тестах с холиномиметиками ареколином и никотином. Исследуемое соединение в дозе 10 мг/кг подавляет 5-ГТФ-индуцированную стереотипию в результате угнетения серотонинергического сигналинга на уровне медиальной префронтальной коры [Lambe, E.K., 2000]. Также вещество РУ-1205 в дозе 10 мг/кг уменьшает выраженность эффектов пикротоксина, что характерно для агонистов каппа-опиоидных рецепторов и может быть связано с влиянием на ГАМК-ергическую нейротрансмиссию [Atack, J.R., 2003; McDonal, J., 2005; Hjelmstad, G.O., 2003].

Выраженное угнетающее воздействие соединения РУ-1205 в дозе 100 мг/кг, отмеченное в тестах с фенамином, пикротоксином, резерпином и 5-ГТФ, может быть связано с неспецифическим угнетением ЦНС. Известно, что данное состояние обусловлено с неизбирательной нейронной дезинтеграцией и развивается в ответ на введение высоких доз фармакологически активных веществ [Liu, X., 2013].

Полученные данные о взаимодействии соединения РУ-1205 с эффектами нейромедиаторных анализаторов *in vivo* (резерпина, пикротоксина, никотина, ареколина, фенамина, L-ДОФА, 5-ГТФ, апоморфина и галоперидола) указывают на то, что действие вещества на нейромедиаторные взаимоотношения в ЦНС сопоставимо с таковым для селективных каппа-опиоидных агонистов [Xin, L., 1997; Benamar, K., 2002; Rawls, S.M., 2005; Salmi, P., 2003; Yakimova, K.S., 1996; Lemos, J.C., 2010; Frey, H.H., 1988; Werkheiser, J. L., 2007; Marek, G. J., 2003; Erkent, U., 2006; Kiritsy-Roy, A. J., 1989; Marin, C., 1996; Gargiulo, S., 2012].

## Глава 8. Выявление неспецифических нейротоксикологических свойств соединения РУ-1205

Нейротоксикологические исследования являются важным аспектом при изучении свойств новых веществ с фармакологической активностью [Воронина, Т.А., 2012; Iezhitsa, I.N., 2002]. Оценка неспецифической нейротоксичности новых соединений основана на изучении основных поведенческих реакций, физиологических функций и неврологического статуса животных в ответ на фармакологически активные вещества. Комплекс тестов впервые был подобран S.Irwin (1968) и является базовым для оценки неспецифической нейротоксичности [Warburton, D.M., 2002; Irwin, S., 1968].

Исследование нейротоксикологического профиля соединения РУ-1205 было разделено на категории, в зависимости от принадлежности оцениваемых параметров к блоку функций нервной системы, и оценено в соответствующих тестах: локомоция и поисковое поведение – локомоторная и ориентировочная активность в тесте «открытое поле»; бессознательные реакции – реактивность, настороженность, пассивность; возбудимость ЦНС и нервномышечная передача – симптом Штрауба, тремор, судороги; оценка тонуса и координации мышц – особенности походки, общий мышечный тонус, реакция «удержания на вращающемся стержне», «реакция удержания на горизонтальной сетке»; рефлекторная активность – оценка роговичного, слухового, ипсилатерального сгибательного рефлекса; состояние вегетативных функций нервной системы – диаметр зрачка, полуптоз, экзофтальм, саливация, пилоэррекция, ЧДД, окраска и состояние кожных покровов, температура; эмоциональные реакции – груминг, число выходов в центр и количество фекальных болюсов в тесте «открытое поле», вокализация при прикосновении и амбивалентность [Rodríguez, R.M., 2006]. Вещество изучено в геометрически возрастающих дозах: 0,1, 1, 10, 25, 50 и 100. Верхний дозовый диапазон является субтоксической дозой вещества РУ-1205.

## 8.1 Исследование влияния соединения РУ-1205 на локомоторную окомоторную и поисковую активности

Влияние соединения РУ-1205 на показатели теста «открытое поле» представлено в таблице 8.1.

Таблица 8.1

Влияние соединения РУ-1205 (при внутрибрюшинном введении) на поведение мышей в тесте «открытое поле» ( $M \pm m$ ).

Доза, мг/кг	Вертикальная активность, ед.	Горизонтальная активность, ед	Поисковая активность, ед
<b>Контроль</b>			
—	4,4±1,2	15,0±5,8	1,4±0,5
<b>Соединение РУ-1205</b>			
<b>0,1</b>	4,3±0,9	10,3±2,7	1,4±0,4
<b>1</b>	4,7±1,0	11,0±2,5	0,8±0,4
<b>10</b>	2,8±0,9	8,5±1,1	0,8±0,3
<b>25</b>	1,8±0,2	3,4±0,8*	0,3±0,1*
<b>50</b>	1,7±0,3	2,3±0,8*	0,0±0,0*
<b>100</b>	1,6±0,3	2,0±0,6*	0,3±0,2*

**Примечание:** \* - статистически значимо по отношению к контрольной группе животных (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p \leq 0,05$ ); представленные результаты зафиксированы через 60 минут после введения соединения РУ-1205.

В тесте «открытое поле» проведено исследование влияния вещества на параметры «вертикальная активность», «горизонтальная активность», «поисковая активность». В группе контроля средние значения данных показателей составили 4,4±1,2, 15,0±5,8 и 1,4±0,5 соответственно. При предварительном введении соединения РУ-1205 выявлено угнетение показателей горизонтальной и поисковой активности в дозах вещества 25 мг/кг и выше (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p \leq 0,05$ ). В то же время, для показателя вертикальной поисковой активности, статистически значимых различий с группой контроля выявлено не было.

Таким образом, можно заключить, что соединение РУ-1205 угнетает горизонтальную и поисковую активность грызунов в дозе 25 мг/кг и более.

## 8.2 Влияния соединения РУ-1205 на бессознательные реакции

Бессознательные реакции грызунов были оценены по признакам реактивности, настороженности и пассивности. Параметр настороженности определялся по выраженности ориентировочных рефлексов и стартл-реакции. Настороженность и реактивность оценивались по бальной шкале от 1 до 8 баллов (физиологическая норма – 4 балла). В группе контроля настороженность и реактивность соответствовали  $4,0 \pm 0,0$  баллам. Пассивность у грызунов данной группы не отмечалась. В результате наблюдений установлено, что соединение РУ-1205 не оказывало статистически значимого влияния на настороженность, а угнетение реактивности отмечалось только в дозе 100 мг/кг (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p \leq 0,05$ ) (табл. 8.2). Пассивность у грызунов отмечалась при предварительном введении соединения РУ-1205 в дозах 50 и 100 мг/кг (табл. 8.2).

Таким образом, можно заключить, что соединение РУ-1205 угнетает бессознательные реакции грызунов в дозе 100 мг/кг.

**Влияние соединения РУ-1205 (при внутрибрюшинном введении) на показатели бессознательной реактивности мышей**

Доза, мг/кг	Регистрируемый признак		
	Настороженность, баллы \$	Реактивность, баллы \$	Пассивность, % животных с признаком #
Контроль	4,0±0,0	4,0±0,0	0
0,1	4,0±0,0	4,0±0,0	0
1	4,0±0,0	4,0±0,0	0
10	4,0±0,0	4,0±0,0	0
25	3,0±0,7	3,1±0,4	0
50	2,5±0,7	3,0±0,4	37,8
100	2,5±0,7	2,5±0,5*	25

**Примечание:** \* - статистически значимо по отношению к контрольной группе животных (критерий Краскелла-Уоллина, пост-тест Данна,  $p \leq 0,05$ ); представленные результаты зафиксированы через 60 минут после введения соединения РУ-1205; \$ - спектр внешне наблюдаемых изменений, вызываемый соединением РУ-1205, выражен количественно по 8-балльной шкале, где 4 балла соответствуют норме, увеличение и снижение количества баллов соответствуют усилению или угнетению проявления признака; # - спектр внешних проявлений признака выражен через частоту встречаемости в экспериментальной группе.

### 8.3 Изучение действия вещества РУ-1205 на нервно-мышечную возбудимость

К признакам, указывающим на повышенную нервно-мышечную возбудимость у грызунов относятся симптом Штрауба, тремор, судорожная активность, гиперкинезы. При проведении тестирования, у грызунов контрольных и опытных групп, указанных признаков в ответ на введение соединения РУ-1205 во всем изученном диапазоне доз (0,1-100 мг/кг) отмечено не было. Это указывает на отсутствие у вещества РУ-1205 способности вызывать нервно-мышечное возбуждение.

#### **8.4 Оценка влияния соединения РУ-1205 на координацию и общий тонус скелетных мышц**

Моделями, избранными для оценки мышечного тонуса грызунов явились тесты, направленные на непосредственное исследование тонуса мышц конечностей и тела по способности животного подтягивать заднюю лапу при ее отведении назад, и по положению тела в покое, а также тесты «удержания на горизонтальной решетке» и «удержания на вращающемся стержне». Оценка мышечного тонуса производилась в соответствии с балльной шкалой от 1 до 8 (4 балла – физиологическая норма, изменение признака на 25% соответствовало 1 баллу) [Irwin S. 1968].

В группе контрольных животных тонус мышц с учетом реакции подтягивания задней лапы и положение тела в покое соответствовали значению  $4,0 \pm 0,0$  баллам. В результате проведенных экспериментов было установлено, что мышечная гипотония развивалась только в максимальной изученной дозе вещества РУ-1205 – 100 мг/кг (однофакторный вариационный анализ, пост-тест Туке,  $p \leq 0,05$ ) (табл. 8.4 (а)).

Таблица 8.4 (а)

**Влияние соединения РУ-1205 (при внутрибрюшинном введении) на показатели тонуса скелетных мышц**

Доза соединения РУ-1205, мг/кг	Регистрируемый признак	
	Тонус тела, баллы	Тонус конечностей, баллы
Контроль	4,0±0,0	4,0±0,0
0,1	4,0±0,0	4,0±0,0
1	4,0±0,0	4,0±0,0
10	4,0±0,0	4,0±0,0
25	4,0±0,0	4,0±0,0
50	4,0±0,0	4,0±0,0
100	2,6±0,2*	2,6±0,2*

**Примечание:** \* - статистически значимо по отношению к контрольной группе животных (однофакторный вариационный анализ, пост-тест Туке,  $p \leq 0,05$ ); представленные результаты зафиксированы через 60 минут после введения соединения РУ-1205;

Спектр внешне наблюдаемых изменений, вызываемый соединением РУ-1205, выражен количественно по 8-балльной шкале, где 4 балла соответствуют норме, увеличение и снижение количества баллов соответствуют усилению или угнетению проявления признака.

В тесте «удержания на горизонтальной решетке» мышечный тонус оценивался по балльной шкале. Количество баллов соответствовало количеству лап, задействованных в акте удержания. В группе контрольных животных данный показатель соответствовал 4,0±0,0 баллам. Соединение РУ-1205 статистически значимо не влияло на регистрируемые показатели (однофакторный вариационный анализ) (табл. 8.4 (б)).

Таблица 8.4 (б)

**Влияние соединения РУ-1205 (при внутрибрюшинном введении) на удержание мышей на горизонтальной решетке (M±m).**

Доза, мг/кг	Удержание на стержне, сек			
	30 мин	60 мин	120 мин	180 мин
<b>Контроль</b>				
—	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0
<b>Соединение РУ-1205</b>				
<b>0,1</b>	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0
<b>1</b>	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0
<b>10</b>	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0
<b>25</b>	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0	4,0±0,0
<b>50</b>	3,9±0,1	3,9±0,1	3,9±0,1	3,9±0,1
<b>100</b>	3,9±0,1	3,9±0,1	3,6±0,2	3,6±0,2

**Примечание:** Результаты приведены в баллах (1-4). Количество баллов соответствует количеству лап, задействованных животным в акте удержания на решетке, 1 балл соответствует падению или отсутствию фиксации на сетке.

Ранее, в подглаве 6.2, приводились результаты активности соединения РУ-1205 на модели «удержания на вращающемся стержне» (табл. 6.2 (а)). В подглаве 6.2 данная модель использовалась как метод выявления седации. Однако по данным литературы [Vanderah, T.W. 2004; Careau, V. 2012], кроме седативной активности, модель является валидной для оценки неспецифических нарушений координации и тонуса мышц. При этом было установлено, что время удержания грызунов на вращающемся стержне статистически значимо снижается в дозах 50 мг/кг и выше, многократно превосходящих анальгетические.

### **8.5 Исследование влияния вещества РУ-1205 на рефлекторную активность мышей**

Рефлекторная активность грызунов оценивалась по трем сенсомоторным рефлексам: ипсилатеральный сгибательный, роговичный, и рефлекс с ушной раковины. В группе контроля все показатели соответствовали норме. При оценке изменений рефлекторной активности в ответ на соединение РУ-1205 было установлено, что угнетение ипсилатерального сгибательного рефлекса

проявлялось в дозе 50 мг/кг и более, и рефлекса с наружного слухового прохода – в дозе 100 мг/кг (табл. 8.5).

Таблица 8.5

## Влияние соединения РУ-1205 (при внутрив брюшинном введении) на безусловные рефлексы мышей.

Доза, мг/кг	Роговичный рефлекс				Рефлекс со слухового прохода				Ипсилатеральный сгибательный рефлекс			
	Время после введения, мин											
	30	60	120	180	30	60	120	180	30	60	120	180
<b>0,1</b>	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н
<b>1</b>	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н
<b>10</b>	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н
<b>25</b>	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н
<b>50</b>	н	н	н	н	н	н	н	н	↓	↓	↓↓	↓↓
<b>100</b>	н	н	н	н	↓↓↓	↓	↓	↓	↓↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓

**Примечание:** «Н» - соответствие показателя среднестатистической норме; «↓» - снижение показателя у 15-25% группы; «↓↓» - снижение показателя у 45-55% группы, «↓↓↓» - снижение показателя у 85-95% группы; «↓↓↓↓» - показатель существенно снижен во всей экспериментальной группе.

## 8.6 Влияние соединения РУ-1205 на функции вегетативной нервной системы

К параметрам, указывающим на изменение работы вегетативной нервной системы, и оцениваемым в данном эксперименте, относились частота дыхательных движений (ЧДД), температура тела, диаметр зрачка, полуптоз, экзофтальм, саливация, пилоэррекция, окраска и состояние кожных покровов.

Влияние соединения РУ-1205 на ЧДД ранее было описано в подглаве 5.1 (табл. 5.1). Статистически значимого влияния вещества РУ-1205 на показатель ЧДД мышей в минуту не отмечалось во всем изученном диапазоне доз (0,1-100 мг-кг) (однофакторный вариационный анализ).

Оценка влияния соединения РУ-1205 на ректальную температуру показала, что исследуемое вещество вызывало снижение ректальной температуры грызунов, начиная с дозы 50 мг/кг (табл. 8.6) (однофакторный вариационный анализ, пост-тест Туке,  $p < 0,05$ ). При этом средний показатель снижения ректальной температуры составлял  $2^{\circ}\text{C}$ . В то же время, в максимальной дозе соединения РУ-1205 (100 мг/кг), ректальная температура животных была ниже предела обнаружения используемого термометра в  $32^{\circ}\text{C}$  (термометр «OMRON», Германия), без последующего восстановления до нормы в течение всего времени эксперимента (3 часа) (однофакторный вариационный анализ).

Таблица 8.6

**Влияние соединения РУ-1205 на ректальную температуру мышей**

Доза, мг/кг	Ректальная температура, °С			
	30 мин	60мин	120 мин	180 мин
<b>Контроль</b>				
—	37,51±0,39	37,20±0,40	37,05±0,34	37,05±0,33
<b>Соединение РУ-1205</b>				
<b>0,1</b>	37,56±0,18	37,86±0,19	37,03±0,26	37,04±0,29
<b>1</b>	37,58±0,28	37,86±0,19	37,56±0,31	37,48±0,14
<b>10</b>	36,43±0,29	36,91±0,47	36,08±0,47	36,31±0,45
<b>25</b>	36,29±0,38	36,50±0,37	35,26±0,64*	35,89±0,60
<b>50</b>	34,46±0,66*	34,43±0,64*	34,31±0,50*	34,80±0,64*
<b>100</b>	32,29±0,29*	32,55±0,41*	32,94±0,51*	32,78±0,46*

**Примечание:** \* - статистически значимо по отношению к контрольной группе животных (однофакторный вариационный анализ, пост-тест Туке,  $p \leq 0,05$ ).

В изученном диапазоне доз соединение РУ-1205 не вызывало полуптоза, экзофтальма, саливации, пилоэррекции, не влияло на окраску и состояние кожных покровов. Только в максимальной дозе (100 мг/кг) у мышей наблюдался незначительный мидриаз. Таким образом, можно заключить, что вещество РУ-1205 способно вызывать гипотермию в дозах 50 мг/кг и более, при этом не оказывая выраженного влияния на другие оцениваемые параметры.

**8.7 Влияние вещества РУ-1205 на эмоциональное состояние мышей**

Эмоциональная реактивность мышей оценивалась в тесте «открытое поле» по показателям числа выходов в центр, груминга и фекальных болюсов, а также по признакам амбивалентности и вокализации при прикосновении. В эксперименте «открытое поле», в группе контрольных животных, число выходов в центр в течение 2-х минут наблюдения составляло  $0,7 \pm 0,4$  раза. Болюсов и груминга не отмечалось. Соединение РУ-1205 в дозах 0,1-1 мг/кг вызывало увеличение количества выходов в центр площадки в 2,4 раза, а также нарастание актов продолжительного груминга.

Таблица 8.1

**Влияние соединения РУ-1205 (при внутрибрюшинном введении) на поведение мышей в тесте «открытое поле» ( $M \pm m$ ).**

Доза, мг/кг	Число выходов в центр, ед.	Грумминг, ед.	Болюсы, ед
<b>Контроль</b>			
—	0,7±0,4	0,0±0,0	0,0±0,0
<b>Соединение РУ-1205</b>			
<b>0,1</b>	1,6±0,8	1,0±0,3	0,0±0,0
<b>1</b>	1,7±0,5	1,7±0,4*	0,0±0,0
<b>10</b>	0,3±0,2	0,6±0,3	0,0±0,0
<b>25</b>	0,3±0,2	0,8±0,4	0,7±0,4
<b>50</b>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
<b>100</b>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

**Примечание:** \* - статистически значимо по отношению к контрольной группе животных (критерий Краскела-Уоллиса, пост-тест Данна,  $p \leq 0,05$ ); представленные результаты зафиксированы через 60 минут после введения соединения РУ-1205.

Остальные показатели эмоционального реагирования – амбивалентность, вокализация при прикосновении – в группе контрольных животных отмечены не были. У животных опытных групп, предварительно получавших соединение РУ-1205, данных признаков также не отмечалось.

Из полученных экспериментальных данных можно заключить, что соединение РУ-1205 не обладает выраженным влиянием на эмоциональную деятельность. При этом повышение числа выходов в центр поля и количества продолжительного грумминга, отмеченные для соединения РУ-1205 в дозах 0,1-1 мг/кг, позволяют предполагать наличие анксиолитического действия в низких дозах [Rodriguez, R. M. 2006], что согласуется с данными литературы о противотревожных свойствах агонистов каппа-опиоидных рецепторов [A. Van't Veer 2013].

## 8.8 Заключение

В результате оценки неспецифической нейротоксичности соединения РУ-1205, можно заключить, что данное вещество не обладает нейротоксикологическим воздействием в дозах, проявляющих анальгетическую активность. Гипорефлексия, гипотония, гипореактивность, снижение локомоторной активности в ответ на введение соединения РУ-1205 в дозах 50 и 100 мг/кг, могут быть связаны с неспецифическим угнетением ЦНС и развитием центрального торможения. Известно, что данное состояние обусловлено неизбирательной нейронной дезинтеграцией и развивается в ответ на введение высоких доз фармакологически активных веществ [Liu X. 2013; Dykstra, L.A., 1987].

Совокупные данные приведены в сводной таблице 8.8.

Таблица 8.8

## Влияние вещества РУ-1205 на общий психоневрологический статус и вегетативные реакции мышей

Функциональный блок нервной системы / признак	Локомоторная и поисковая активности			Бессознательные реакции			Нервно-мышечная возбудимость			Мышечный тонус и координация			Безусловные рефлексы			Вегетативные реакции						Эмоциональное состояние					
	Вертикальная активность*	Локомоторная активность*	Поисковая активность*	Настороженность	Реактивность	Пассивность	Тремор	Судороги	Симптом Штрауба	Тонус тела (положение в покое)	Тонус конечностей (приведение задней лапы)	Удержание на вращающемся стержне	Удержание на горизонтальной решетке	Ипсилатеральный стигматический	Рефлекс с ушной раковины	Роговичный	Частота дыхательных движений	Ректальная температура	Экзофтальм	Полуптоз	Пилоэрекция	Саливация	Диаметр зрачка	Окраска и состояние кожных покровов	Длительный груминг*	Фекальные болтосы*	Выходы в центр поля*
Доза вещества РУ-1205, мг/кг	0	0	0	0	0	×	×	×	×	0	0	0	0	0	0	0	0	×	×	×	×	×	0	0	0/↑	0	0/↑
0,1	0	0	0	0	0	×	×	×	×	0	0	0	0	0	0	0	0	×	×	×	×	×	0	0	↑	0	0/↑
1	0	0	0	0	0	×	×	×	×	0	0	0	0	0	0	0	0	×	×	×	×	×	0	0	0/↑	0	0
10	0/↓	↓	↓	0	0	×	×	×	×	0	0	0/↓	0	0	0	0	0	0/↓	×	×	×	×	0	0	0/↑	0	0
25	0/↓	↓	↓	0/↓	0	0/↑	×	×	×	0	0	↓	0	↓	0	0	0	↓	×	×	×	×	0	0	0	0	0
50	0/↓	↓	↓	0/↓	↓	0/↑	×	×	×	↓	↓	↓	0/↓	↓	↓	0	0	↓	×	×	×	×	м*	0	0	0	0
100	0/↓	↓	↓	0/↓	↓	0/↑	×	×	×	↓	↓	↓	0/↓	↓	↓	0	0	↓	×	×	×	×	0	0	0	0	0

**Обозначения:** «×» отсутствие признака, «0» соответствие показателям физиологической нормы, 0/↓ незначительное угнетение признака, «↓» угнетение признака, 0/↑ незначительное усиление признака, «↑» усиление признака, м\* - мидриаз;

**Примечание:** \* - показатели, зарегистрированные в тесте «открытое поле» (время экспозиции 2 минуты).

## Глава 9. Заключение

В настоящее время накоплен фактический материал, указывающий на перспективность класса производных бензимидазола в качестве основы для создания селективных каппа-опиоидных агонистов [Анисимова, В.А., 2009; Sasmal, P. K., 2015; Thomson Reuters Integrity, 2011; Linz, K., 2014; Salvadori, S., 2008; Kobayashi, K., 2009; Balboni, G., 2005; Satoh, A., 2009; Mabrouk, O.S., 2014].

В работе исследованы переход специфических фармакологических эффектов соединения РУ-1205 в токсические, и появление побочного действия, характерного для высоких доз. Изучена анальгетическая активность, механизм действия, и сопутствующие эффекты соединения РУ-1205 в широком диапазоне доз. Описаны изменения, происходящие на уровне различных нейромедиаторных систем мозга. Проведен анализ неспецифической нейротоксикологической активности. Результаты работы позволяют судить об особенностях специфического фармакотоксикологического действия представителя структурно-нового класса каппа-опиоидных агонистов – производного конденсированных бензимидазолов (дигидрохлорид 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил) имидазо [1,2-а] бензимидазола), обладающего обезболивающей активностью – вещества РУ-1205 [Анисимова, В.А., Пат.РФ № 2 413 512 С1 от 29.072009 г.; Спасов, А.А., 2013].

Анальгетическое действие вещества РУ-1205 было оценено в широком диапазоне доз (0,001-100 мг/кг) и сопоставлено с аналогичным действием препарата сравнения буторфанол (подглава 3.1). Максимально возможный эффект тестируемого соединения развивался в дозе 1 мг/кг и превосходил буторфанол (1мг/кг) в 1,8 раза (рис. 3.1). Увеличение дозы до 10 мг/кг вызывало статистически значимое снижение эффективности соединения в 2,1 раза. При этом кривая зависимости «доза-эффект» выходила на «плато» при введении возрастающих доз до 100 мг/кг, с сохранением эффективности на уровне 40% от максимально возможной. Для буторфанол МВЭ отмечался в дозе 10 мг/кг, а в

дозах 25 мг/кг и выше полностью нивелировался. По показателям ЭД<sub>50</sub> и ТИ соединение РУ-1205 превосходило буторфанол в 10 и 16 раз соответственно.

Анализ данных литературы показал, что для опиоидных препаратов из класса агонистов-антагонистов, к которым относится буторфанол [Gear R.W. 1999; Garner H.R. 1997], характерна колоколообразная форма кривой зависимости «доза-эффект» [Shu, H., 2011; Shu, H., 2015], аналогичная той, что была представлена для буторфанолола на рисунке 3.1. Данная зависимость объяснялась гипотезой об антагонистичном перекрестном сообщении на уровне путей серпентин-опосредованного месседжа мю- и каппа-опиоидных рецепторов [Shu, H., 2011]. Принимая во внимание предположения авторов [Shu, H., 2011], можно сделать вывод, что характер кривой «доза-эффект» для соединения РУ-1205 является следствием отсутствия его влияния на мю-опиоидные рецепторы.

С целью подтверждения механизма анальгетической активности было проведено изучение рецепторного механизма действия соединения РУ-1205. Рецептор-специфичность вещества РУ-1205 установлена с применением метода изолированных органов, опираясь на принципы тканеспецифичности локализации опиоидных рецепторов и применения селективных и неселективных опиоидных антагонистов [Mako, E., 2001; Milanés, M.V., 1997; Milanés, M.V., 1998; Oka, T., 1981; Lattanzi, R., 2001; Kaneto, H., 1990; Scopes, D.I., 1992; Saito, T., 2002; Gray, A. C., 2005, 2006].

Исследование каппа-агонистической активности проведено на изолированных семявыносящих протоках кроликов (СПК) [Oka, T., 1981], оценка мю- и дельта-рецепторного влияния выполнена на изолированной подвздошной кишке крыс (ПКК) [Gray, A. C., 2005, 2006]. Для метода угнетения сократительной активности СПК в данных литературы [Zhu, J., 1997; Calo', G., 2000] описывается достоверная корреляция с моделью трансфицированных человеческим каппа-рецептором клеточных культур. Кроме того, Hayes и Kelly охарактеризовали модель угнетения электроиндуцированных сокращений СПК, как валидную для анализа соединений с высоким уровнем каппа-рецепторной селективности [Hayes, A., 1985]. В то же время Gray, A. C., в своих работах (2005,

2006) приводит экспериментальные подтверждения тому, что в подавление электроиндуцированного сократительного ответа ПКК вовлечены мю-, дельта-, но не каппа-опиоидные рецепторы.

В результате проведенных исследований было установлено, что соединение РУ-1205 норбиналторфимин-обратимо угнетало стимулированные электрическими импульсами сокращения семявыносящего протока кролика в диапазоне наномолярных концентраций ( $ЭК_{50} 2 \cdot 10^{-9} M$ ), экспрессирующего каппа-опиоидные рецепторы, и не было эффективно на модели электроиндуцированных сокращений изолированного отрезка подвздошной кишки крысы, характеризующей мю- и дельта-рецепторный компонент действия. Тогда как морфин концентрационно-зависимо и налоксонообратимо подавлял сокращения отрезка кишечника ( $ЭК_{50} 2,6 \cdot 10^{-7} M$ ) и эти эффекты не устранялись в условиях преинкубации с норбиналторфимином.

Таким образом, можно заключить, что соединение РУ-1205 обладает каппа-агонистической активностью, и не имеет таковой в отношении мю- и дельта-опиоидных рецепторов. При этом, опираясь на данные Zhu, J. (1997) о высоком соответствии между результатами модели рецепторной трансфекции и моделью электроиндуцированных сокращений изолированного СПК, можно предположить воспроизведение каппа-рецепторной активности соединения РУ-1205 на человеческом каппа-опиоидном рецепторе.

Вислобоков, А.И. и Шабанов, П.Д. (2014) в своей научной работе описывают, что характер и выраженность фармакологических эффектов одного и того же вещества могут изменяться в зависимости от уровня структурно-функциональной организации экспериментальной системы. Commiscey, S., ранее представил информацию о способности мю-агонистического действия буторфанола подавлять каппа-опосредованное влияние в условиях целостного организма, несмотря на то, что в тестах *in vitro* буторфанол обладает свойствами каппа-рецепторного лиганда [Commiscey, S., 2005]. Таким образом, отсутствие мю-агонистической активности в экспериментах *in vitro* – не достаточное

подтверждение отсутствия мю агонистического влияния в условиях целостного организма.

При анализе данных литературы установлено, что к наиболее часто встречаемым и представляющим наибольшую опасность сопутствующим эффектам классических морфиноподобных препаратов, относят:

- 1) *Угнетение дыхания*. Формируется из-за активации мю-опиоидных рецепторов в голубом пятне и депрессии нейронной активности зоны *pre-BötC* (комплекс *pre-Bötzing* – область локализации нейронов-водителей дыхательного ритма) [Boon, M., 2012], пресинаптического торможения электрофизиологической активности респираторных бульбоспинальных и проприобульбарных нейронов, урежения микроэлектрической импульсации 10 пары черепномозговых нервов и диафрагмального нерва [Lalley P.M., 2003];
- 2) *Наркогенный потенциал*. Объединяет понятия анальгетической толерантности, физической и психической зависимостей [Kivell, B., 2010; Zvartau, E.E., 2006; Khansari, M., 2013; Aldrich, J., 2009; Pattinson, K.T.S., 2008; Johnson, S.M., 2010; Оно, Н., 2014].
- 3) *Нарушение образования нормальных перистальтических миоэлектрических комплексов ЖКТ*. Формируется при активации мю-опиоидных рецепторов в энтеральной нервной системе [Khansari, M., 2013], что ведет к ингибированию высвобождения ацетилхолина и торможению выброса регуляторных простагландинов [Holzer, P., 2009; Al-Hasani, R., 2011; Khansari, M., 2013; Twycross, R.G., 1986]), и к последующему замедлению продвижения химуса, что завершается развитием обстипации у подавляющего числа пациентов.

По результатам экспериментальной работы, приведенным в главе 5, а также подглаве 6.1, где проведено описание исследовательской работы по выявлению у соединения РУ-1205 эффектов мю-опиоидной активации, можно сделать вывод,

что вещество не обладает сопутствующими нежелательными эффектами, характерными для мю-рецепторной активации. Так, в диапазоне доз 0,1-100 мг/кг, соединение РУ-1205, в отличие от буторфанола, не обладало статистически значимой респираторно-депрессивной активностью. Также, вещество РУ-1205 при различных путях введения и в разных дозах не вызывало лекарственной зависимости (пункт 5.3.2, пункт 5.3.1, подглава 6.1). В дозах 0,1-10 мг/кг соединение РУ-1205 не влияло на продвижение угольной «метки» по ЖКТ (подглава 5.2, табл. 5.2).

Множество авторов [Freye, 1983; Castillo, 1986; Howell, 1988; Dosaka-Akita, 1993; Fujibayashi, 1996; Mutolo, 2007] в своих работах приводят убедительные доказательства того, что селективные каппа-рецепторные лиганды не вызывают значимого влияния на дыхание. Результаты испытаний соединения РУ-1205 согласуются с представлением об отсутствии респираторно-депримирующего влияния каппа-рецепторных агонистов. В то же время, угнетение дыхания при предварительном введении буторфанола развивалось, начиная с дозы 25 мг/кг, максимально в дозах 50 и 100 мг/кг на 20,1% и 27,4% соответственно.

Соединение РУ-1205 не вызывало развития толерантности к анальгетическому эффекту при различных путях введения в разных дозах.

Толерантность к анальгетическому эффекту является характерным свойством морфиноподобных препаратов [Al-Hasani, R., 2011; Van Ree, J.M., 1999; Bespalov, A., 2001; Inturrisi, C.E., 1997; Inturrisi, C.E., 2011; Mangel, A.W., 2012; Chamouard, P., 1998; Giuliani, S., 1996; Elizabeth, L., 2008]. Каппа-селективные агонисты не вызывают формирование толерантности к антиноцицептивному действию на различных моделях ноцицептивных реакций [Shippenberg, T.S., 2007; Lemos, J.C., 2011]. Очевидно, данный феномен может быть обусловлен противоположными эффектами стимуляции мю- и каппа-рецепторов в структурах спинного мозга и на периферии, их влиянием на центральную и периферическую сенсibilизацию, каппа-антагонизмом к мю-опосредованной анальгезии [Aldrich J., 2009; Wang, Y., 2010].

Вещество РУ-1205 после субхронического введения, при провокации признаков абстиненции налоксоном, не вызывало «доминантных» (прыжки), и «рецессивных» (тремор, стук зубами и др.) проявлений синдрома отмены. В то же время у подопытных животных, получавших морфин и буторфанол в аналогичных условиях, после введения налоксона, отмечалась развернутая картина абстинентного синдрома, более выраженная в группе грызунов, получавших морфин.

Формирование физической зависимости происходит при гиперактивности нейронов голубого пятна, обусловленной глутаматергической эксайтотоксичностью [Kosten, T. R., 2002]. Под действием классических опиоидных анальгетиков происходит депрессия активности данных нейронов, а при отмене – их гиперактивация, проявляющаяся страхом, беспокойством, мышечными спазмами, диареей и др. Известно, что активация каппа-опиоидной рецепторной системы уменьшает гипервозбудимость нейронов голубого пятна за счет пре- и постсинаптической ингибиции патологической активности, и, как следствие, приводит к угнетению поведенческих реакций, характерных для абстинентного синдрома [Chavkin, S., 2011].

Соединение РУ-1205 не влияло на поведенческие реакции опытных групп животных на моделях электрической самостимуляции зон «награды» головного мозга, «внутривенного самоведения» и «лекарственной дифференцировки», отражающих первичные стимульные свойства, на модели «формирования условной реакции избегания места» (УРИМ), валидной для выявления вторичной стимульной активности, а также модели «форсированного неизбежного плавания», направленной на оценку депрессивного компонента дисфорического синдрома.

Известно, что нейрохимической основой психической зависимости является стимуляция мезолимбической дофаминергической передачи [Chavkin, S., 2011], при этом активация мю- и каппа-рецепторов вызывает разнонаправленную модуляцию системы «награды», что связано с различиями в анатомическом распределении мю- и каппа-опиоидных рецепторов [Aldrich, J.V., 2009; Knoll, A.T.,

2010]. Активация дофаминового тока соответствует чувству эйфории, наслаждения, удовлетворения, в то время как угнетение может сопровождаться формированием дисфории и депрессии [Ehrich J. M. 2015; Shabanov, P.D., 2011]. Каппа-рецепторы преимущественно локализованы на афферентных терминалях дофаминергических нейронов, тогда как мю-рецепторы идентифицируются на клеточных телах ГАМК-ергических нейронов [Shippenberg, T., 2007]. Несмотря на общие (ингибиторные) влияния, стимуляция каппа-опиоидных рецепторов часто вызывает противоположные эффекты по сравнению с таковыми, индуцированными активацией мю- или дельта-рецепторов. Активация мю-опиоидных рецепторов в системе «награды» соответствует повышению дофаминового тока в мезолимбическом пути. Стимуляция каппа-рецепторной системы обеспечивает тоническую ингибицию дофаминергического сигналинга в мезолимбическом тракте [Aldrich, J.V., 2009; Wang, Y., 2010; Chen, M., 2015; Manzoni, O.J., 1999]. Отсутствие активности соединения РУ-1205 на моделях формирования условной реакции избегания места (УРИМ), «внутривенного самовведения», «лекарственной дифференцировки» и самостимуляции системы «награды» головного мозга, что описано в подглаве 6.1, указывает на отсутствие аддиктивных свойств вещества. По-видимому, соединение РУ-1205 не активирует систему «награды», как это делают мю-опиоидные агонисты, что косвенно подтверждается в тесте фенаминовой гиперлокомоции.

Отсутствие активности соединения РУ-1205 на модели продвижения «метки» по ЖКТ, согласуется с представлением о незначительном влиянии каппа-опиоидной активации на желудочно-кишечную перистальтическую активность в условиях физиологической нормы [Mangel, A.W., 2012]. В противоположность эффекту соединения РУ-1205, для референтных препаратов (морфин и буторфанол), была установлена способность замедлять продвижение «метки» в дозе 1 мг/кг. Связь антипропульсивного эффекта буторфанола с дозой была обратной – доза 1 мг/кг вызвала большее угнетение моторики, чем наивысшая исследованная (10 мг/кг) (табл. 5.2). Подобное обратное дозозависимое влияние буторфанола описано в литературе [Horan, P.J., 1989]. Угнетающее желудочно-

кишечную пропульсию действие морфина на модели угнетения продвижения «метки» по ЖКТ было дозозависимой, и в условиях модели начинала проявляться с дозы 1 мг/кг, что соответствует данным Gallantine, E.L., (2008).

Давая оценку комплексу полученных данных, направленных на выявление мю-рецептор-опосредованных эффектов соединения РУ-1205, можно заключить, что вещество не обладает мю-агонистическим влиянием, и в условиях целостного организма не приводит к формированию реакций, опосредованных указанным рецептором (угнетение дыхания, наркогенный потенциал, угнетение моторики ЖКТ).

Высокая антиноцицептивная активность и отсутствие сопутствующих негативных эффектов классических морфиноподобных препаратов у селективных каппа-опиоидных агонистов не является достаточным условием безопасности клинического применения данных веществ, ввиду наличия собственных побочных эффектов. В источниках литературы [Fujii H., 2012; Cahill, C.M., 2014; Kivell, B., 2010; Bruchas, M. R., 2007; Stoker, A., 2011] описано, что развитие каппа-опосредованной анальгезии сопровождается формированием дисфории, депрессии, седации, ангедонии и увеличением диуреза. В связи с этим, доклиническое исследование новых потенциальных анальгетиков с селективным каппа-рецепторным действием на наличие данных эффектов является необходимым.

Стимульные свойства подразделяются по «окраске» субъективного восприятия («негативные» и «позитивные»). «Позитивные» стимульные свойства говорят о возможной психической зависимости, что типично для классических морфиноподобных препаратов [Mamoop, A.M., 1995]. Противоположная – «негативная окраска», проявляется *in vivo* аверсивной реакцией, и указывает на то, что вещество предположительно является «провокатором» дисфории [Bruchas, M.R., 2007, 2008]. Аддиктивный и аверсивный эффекты могут быть оценены в тестах «внутривенное самовведение», «лекарственная дифференцировка», «самостимуляция зон награды головного мозга» и «условная реакция избегания места»). Часть данных методик, проведенных для оценки депрессивно-

дисфорического действия вещества РУ-1205 (условная реакция избегания места (УРИМ), форсированное неизбежное плавание), являются основными и рекомендованными моделями для доклинического исследования активности веществ, ответственной за развитие дисфории у каппа-опиоидных агонистов в клинических испытаниях [Porsolt, R.D., 1977; Bruchas, M., 2007]. В своих работах Bruchas описывает, что аверсивная реакция у лабораторных животных является маркером состояния, аналогичного дисфории человека [Bruchas, M.R., 2007]. Применение методики реакции электрической самостимуляции зон «награды» для достижения поставленной задачи подтверждается данными литературы [Stoker, A., 2011; DiNieri, J.A. 2009; Diotte, M., 2001] о пригодности указанной модели для выявления аверсивных свойств веществ. Имплантация электродов в данной методике производится в вентральную тегментальную область грызунов. Данный участок активно вовлечен в работу системы «награды», через сеть нейрональных контактов, связан с участками мозга, координирующими развитие аверсии, в частности прилежащими ядрами [Cahill, S. M., 2014]. Кроме этого, в работах Ahsan, H. M. (2014), экспериментально подтверждено, что результаты реакции «внутривенного самовведения» коррелируют с результатами тестирования УРИМ. Отрицательное подкрепление при этом ассоциируется с проявлением дисфорической активности [Prus, A. J., 2008].

Результаты исследования аверсивных свойств соединения РУ-1205 во всех проведенных поведенческих тестах (УРИМ, «внутривенное самовведение», самостимуляция зон «награды» головного мозга, «лекарственная дифференцировка») указывают на отсутствие у вещества аверсивного действия. Тестируемое вещество не оказывало влияния на систему «награды» и выраженность мотивации в тесте самостимуляции головного мозга крыс, не вызвало первичного подкрепления в эксперименте «внутривенного самовведения». Соединение РУ-1205 не имело статистически значимого влияния на уровень тревожности в тесте форсированного неизбежного плавания. Все это может служить благоприятным прогностическим признаком отсутствия дисфории в клинических испытаниях.

По данным Ehrich, J.M. (2015) депрессивно-дисфорические расстройства формируются при активации каппа-опиоидных рецепторов на область вентральной покрышки, а также, возможно, прилежащие и миндалевидные ядра. В естественных условиях активация каппа-рецепторной системы в нейронной цепи: миндалина – передняя часть поясной извилины – вентральный стриатум является маркером развития данных расстройств [Pietrzak, R.H., 2014]. В патогенезе данного процесса важное место занимает падение дофаминовой нейромедиации, связанное с внутриклеточной активацией каппа-рецептор-ассоциированных сигнальных молекул, к которым относится нейрональная альфа-p38-МАР-киназа [Ebner, S.R., 2010; Al-Hasani, R., 2011; Lemos, J.C., 2011; Bruchas, M.R., 2007; White, K. L., 2015]. Классические представители селективных каппа-опиоидных агонистов первого поколения, на вышеуказанных моделях вызывали формирование аверсивной реакции, коррелирующей с формированием присущего каппа-опиоидным агонистам депрессивно-дисфорического синдрома [White, K. L., 2015]. Однако вещества, обладающие селективной каппа-рецепторной активностью, и не вызывающие дисфории описаны в источниках литературы (например, TRK-820) [Bruchas, M. R., 2007; Ehrich, J. M., 2015]. Известно, что подобное состояние может развиваться при наличии у соединения способности избирательно активировать внутриклеточные каппа-рецепторные сигнальные пути, сопряженные с развитием обезболивания, без вовлечения внутриклеточных мессенджеров, ответственных за формирование дисфории и ангедонии. Одним из таких мессенджеров, активация которого сопровождается развитием депрессивно-дисфорических расстройств, является нейрональная альфа p-38-МАРК [Bruchas, M.R., 2007].

Установленные результаты указывают на отсутствие дисфорической активности соединения РУ-1205. Возможно, это может быть обусловлено ингибированием нейрональной альфа p-38-МАРК.

Наряду с оценкой дисфорического компонента действия соединения РУ-1205, была изучена седативная активность данного вещества. Исследование

проводилось по методу актометрии и в тесте «удержания на вращающемся стержне».

В данных тестах было установлено, что выраженная седация у грызунов формировалась при предварительном введении соединения РУ-1205 в дозах 50 мг/кг и более. По терапевтическому индексу (ТИ) седативной активности тестируемое вещество превосходило буторфанол в 14 раз. При сопоставлении ТИ седативной активности вещества РУ-1205 и известных селективных опиоидных агонистов, таких как соединения U-50488, ICI-199441, CI-977 и TRK-820 [Endoh, T., 1999], можно заключить, что исследуемый показатель многократно превосходит аналогичные значения указанных веществ и может носить на неспецифический характер седативной активности [Liu, X., 2013].

Также, при оценке сопутствующих эффектов каппа-опиоидной активации установлено, что вещество РУ-1205 обладает диуретическим действием. При этом диурез, отмеченный у грызунов при предварительном подкожном введении соединения РУ-1205 в дозе 1 мг/кг, превосходил по количеству отделяемой в течение 5 часов мочи, аналогичный показатель для дозы 10 мг/кг. При пероральном введении в дозе 5 мг/кг значимой диуретической активности не установлено.

Возможно, диуретическая активность соединения РУ-1205 может быть связана с влиянием каппа-рецепторной системы на активность гипоталамо-гипофизарной оси. Так, физиологически, аутокринное подавление активности каппа-опиоидных рецепторов влечет за собой активацию нейронных паттернов, отвечающих за регуляцию и секрецию вазопрессина [Pietrzak, R. H., 2014; Scott, V., 2009; Shuster, S.J., 2000]. Данный эффект может наблюдаться в условиях обезвоживания. Более того, из данных литературы известно, что в условиях провокации стресса у грызунов, была установлена связь между выраженностью эмоционального аффекта, подъемом уровня динорфинов (эндогенные каппа-рецепторные лиганды) в ЦНС и снижением концентрации вазопрессина [Inan, S., 2008]. Фармакологическое модулирование активности гипоталамо-гипофизарной системы, опосредованное селективной активацией каппа-опиоидных рецепторов,

вызывает изменение микроэлектрических потенциалов нейронов и снижение выброса вазопрессина [Inan, S., 2008]. Зарегистрированное в ходе проведенных экспериментов увеличение диуреза крыс в ответ на введение соединения РУ-1205 соответствует представлению о данном веществе, как о агонисте каппа-опиоидных рецепторов.

Внимания заслуживает тот факт, что вещество при подкожном введении в дозе 1 мг/кг оказывало более выраженное диуретическое действие, чем в дозе 10 мг/кг. Соотношение характеров анальгетической активности вещества РУ-1205 в дозах 1 и 10 мг/кг (глава 3) таково, что соединение РУ-1205 в дозе 1 мг/кг обладало более высокой обезболивающей активностью, чем в дозе 10 мг/кг. Возможно, это указывает на соответствие двух эффектов. Inan, S., (2009) в своей работе описывает подобное диуретическое действие для вещества TRK-820 (налфурафин, селективный каппа-опиоидный агонист).

Таким образом, можно заключить, что соединение РУ-1205 оказывает диуретическое действие в диапазоне доз 1-10 мг/кг при подкожном пути введения, и не эффективно при приеме внутрь.

Из данных литературы [Smith, M.A., 2003; Pietrzak, R.H., 2014; Cahill, C.M., 2014] известно, что поведенческие эффекты опиоидов могут быть связаны с вовлечением различных медиаторных систем мозга. Таким образом, следующим этапом исследований соединения РУ-1205 явилось изучение влияния вещества на эффекты нейромедиаторных анализаторов *in vivo*.

С позиций регистрации нейромедиаторных изменений, интерес представляет влияние вещества на дофаминовую трансдукцию мезолимбического и мезокортикального путей, активность дофаминергических нейронов области вентральной покрышки и базальных ганглиев, влияние на серотонинергическую, а также ГАМК-ергическую передачу. Изменения в этих структурах представляют значительный интерес, поскольку сопровождают изменение активности каппа-опиоидных рецепторов [Ehrich, J.M., 2015].

Экспериментально было оценено влияние соединения РУ-1205 в широком диапазоне доз на дофаминергическую, норадренергическую, холинергическую и

ГАМК-ергическую нейромедиаторные передачи (глава 7). В результате проведенной работы можно сделать вывод, что селективный каппа-опиоидный агонист, соединение РУ-1205 в дозе 10 мг/кг, может оказывать значимое угнетающее воздействие на дофаминовую нейротрансмиссию мезолимбической, мезокортикальной систем и вентрального стриатума (прилежащее ядро) [Островская, Р.У., 2012; Chefer, V.I., 2000], что установлено в тесте с фенамином. Это свойственно для селективных лигандов каппа-опиоидных рецепторов [Cahill, С.М., 2014]. При этом, соединение РУ-1205, вероятно, не имеет выраженного влияния на дофаминовую нейротрансмиссию дорсального стриатума и регулирующие его дофаминергические эфференты черной субстанции, что установлено в тестах галоперидол-индуцированной каталепсии и апоморфиновой стереотипии. Вещество РУ-1205 не потенцирует эффекты L-ДОФА, и, следовательно, не обладает дофаминергической активностью на уровне базальных ганглиев и нигростриарной системы. В тесте с резерпином также подтверждено, что вещество РУ-1205 не оказывает дофаминергического воздействия на дорсальную стриарную нейротрансмиссию, и не имеет адреномиметических эффектов на уровне эфферентов голубого пятна, регулирующих активность дорсального стриатума. Таким образом, статистически значимого влияния вещества РУ-1205 в дозах 1 и 10 мг/кг на эффекты резерпина не установлено. В дозе 100 мг/кг при комбинированном введении с резерпином у грызунов отмечалась выраженная гипотермия и птоз, что может быть обусловлено неспецифической реакцией.

Соединение РУ-1205 не имеет значимого влияния на холинергическую нейротрансмиссию, что установлено в тестах с холиномиметиками ареколином и никотином. Исследуемое вещество подавляет 5-ГТФ-индуцированную стереотипию, из чего можно сделать вывод об угнетении серотонинергического сигналинга на уровне медиальной префронтальной коры. Также соединение РУ-1205 в дозах 10 мг/кг и более оказывает воздействие на баланс процессов нейронного возбуждения/торможения, смещая его в сторону торможения, что установлено в тесте с пикротоксином. Данный эффект теоретически может быть связан с непосредственным активирующим влиянием на ГАМК-а-ионофор-

рецепторный комплекс (для многих производных бензимидазола предполагается возможность аллостерического взаимодействия с ГАМК-рецепторным комплексом [Atack, J.R., 2003]). Необходимо также отметить, что выраженное угнетающее воздействие соединения РУ-1205 в дозе 100 мг/кг, отмеченное в тестах с фенамином, пикротоксином, резерпином и 5-ГТФ, может быть связано с неспецифическим угнетением ЦНС [Liu, X., 2013].

Данные о влиянии вещества РУ-1205 на нейротрансмиссию в ЦНС по профилю установленных эффектов сопоставимы с приведенными в работе Chavkin, C. (2011) для агонистов каппа-опиоидных рецепторов.

Следующим этапом было изучение неспецифической нейротоксичности вещества РУ-1205 в комплексном многотестовом наблюдении по Ирвину [Irwin, S., 1968]

По результатам комплекса тестов по оценке нейротоксикологической активности соединения РУ-1205, можно заключить, что вещество не обладает значимым нейротоксикологическим влиянием в дозах 0,1-50 мг/кг. При этом установлено, что в высоких дозах (50 мг/кг и более) отмечалось неспецифическое угнетение ЦНС (глава 8).

Так, у соединения РУ-1205 наблюдается способность угнетать сознательную активность, не связанную с когнитивной деятельностью. Данный эффект можно охарактеризовать, как проявление неспецифической седации.

Снижение бессознательной реактивности также свидетельствует о развитии центрального торможения. Замедление базовых способностей ЦНС реагировать на простейшие раздражители коррелирует с проявлениями седации [Curzon, P., 2009], и этот феномен, как правило, не зависит от специфичности процесса. Таким образом, можно отметить, что данные реакции угнетаются в ответ на соединение РУ-1205 в тех же дозах, для которых характерны выраженные проявления седации.

При изучении влияния соединения РУ-1205 на тонус и координацию скелетных мышц в тестах «удержания на вращающемся стержне» (подглава 6.2) и «удержания на горизонтальной решетке» (глава 8), а также при непосредственной

оценке было установлено, что мышечная гипотония развивается в дозах 50 мг/кг и более. Имеются сведения [Dykstra, L.A., 1987], что центральное торможение, связанное с дезинтеграцией нейронального взаимодействия, проявляется снижением тонической активности скелетных мышц.

Вещество РУ-1205 не оказывает неспецифического активирующего влияния на нейронную активность ЦНС, а именно не проявляет основных признаков центрального возбуждения, таких, как симптом Штрауба, тремор, судороги и др.

В тестах по оценке влияния соединения РУ-1205 на ипсилатеральный сгибательный, роговичный, и рефлекс с ушной раковины, установлено, что предварительное введение вещества в высоких дозах вызывает гипорефлексию, что соответствует неспецифическому угнетению ЦНС.

Каппа-опиоидный рецептор вовлечен в регуляцию автономной нервной системы [Hassen, A.H., 1988; Barnes, M. J., 2004; Freye, 1983; Castillo, 1986; Howell, 1988; Dosaka-Akita, 1993; Fujibayashi, 1996; Venamar, K., 2002; Rawls, S.M., 2005; Salmi, P., 2003; Yakimova, K.S., 1996]. Для соединения РУ-1205 показано, что при его предварительном введении не наблюдается изменений моторики ЖКТ, частоты дыхательных движений, и усиливается диурез, что характерно для каппа-опиоидных агонистов [Mangel, A.W., 2012; Chamouard, P., 1998; Giuliani, S., 1996; Elizabeth, L., 2008; Xin, L., 1997]. Также отмечено, что тестируемое вещество в высоких дозах (50 мг/кг и более) вызывает выраженную гипотермию, что, может носить неспецифический характер.

При оценке влияния вещества РУ-1205 на эмоциональную деятельность грызунов в тесте «открытое поле» было установлено, что в дозах 0,1-1 мг/кг соединение РУ-1205 оказывало незначительное анксиолитическое действие, снижая время адаптации при помещении в установку и, тем самым, укорачивая латентный период начала исследовательской активности, повышая количество выходов в центр в среднем в 2 раза, и, в дозе 1 мг/кг, вызывая статистически значимое нарастание длительного груминга, который обратно пропорционален выраженности стресса [Гацура, В.В., 1974]. По данным литературы [Van't Veer,

А., 2013] известно, что каппа-рецепторные лиганды могут проявлять противотревожное действие.

Таким образом, в результате оценки неспецифической нейротоксичности вещества РУ-1205, можно заключить, что исследуемое соединение не оказывает нейротоксикологического действия в диапазоне доз 0,1-50 мг/кг. В то же время, эффекты, наблюдаемые при предварительном введении соединения РУ-1205 в высоких дозах (50-100 мг/кг), вероятно носят неспецифический характер.

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 ЭД<sub>50</sub> и ТИ соединение РУ-1205 превосходит референтный препарат в 10 и 16 раз соответственно.

В экспериментах *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», электрической 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 капта-селективным анальгетиком без негативных сопутствующих эффектов, характерных для мю- и капта-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 ЭД<sub>50</sub> 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 неизбегаемого плавания, не оказывает аверсивного 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-а]-бензимидазола – соединение РУ-1205 – рекомендуется для дальнейших исследований в качестве потенциального обезболивающего средства.

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

## Перечень используемых сокращений

ГАМК	гамма-аминомасляная кислота
МАО	моноаминооксидаза
ЦНС	центральная нервная система
5-ГТФ	5-гидрокситриптофан
in silico	общее название QSAR методов поиска лекарственных веществ
L-ДОФА	L-диоксифенилаланин
нор-БНИ	норбиналторфимин
СПК	семявыносящий проток кролика
ПКК	подвздошная кишка крысы

## ИСТОЧНИКИ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева, Н.И. Методические указания по изучению антидепрессантной активности фармакологических веществ [Текст] / Н.И. Андреева // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: под общ. ред. Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб и доп. - М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 244-253.

2. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность карботиофенил- и карботиоалкиламидов 2,9-дизамещенных имидазо-[1,2-а]-бензимидазолов [Текст] / В.А. Анисимова, О.Н. Жуковская, А.А. Спасов [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т.49. - № 10. – С. 11-14.

3. Беспалов, А.Ю. Нейропсихофармакология антагонистов NMDA-рецепторов [Текст] / А. Ю. Беспалов, Э. Э. Звартау. - СПб.: Невский Диалект, 2000. – 297 с.

4. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Дж. Хьюстон. - Высш. шк., 1991. - 398 с.;

5. Вислобоков, А.И. Клеточные и молекулярные механизмы действия лекарств [Текст] / А.И. Вислобоков, П.Д. Шабанов. – Серия: Цитофармакология. Т. 2 – СПб.: Информ-Навигатор, 2014. – 624 с.

6. Волчков, В. А. Болевые синдромы в анестезиологии и реаниматологии [Текст] / В. А. Волчков, Ю. Д. Игнатов, В. И. Страшнов. - М.: МЕДпресс-информ, 2006, - С. 318.

7. Воронина, Т.А. Методические указания по изучению противосудорожной активности новых фармакологических веществ [Текст] / Т.А. Воронина, Т.Л. Неробкова // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: под общей редакцией Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 277-295.

8. Воронина, Т.А. Новые биомолекулярные мишени для создания нейропсихотропных препаратов [Текст] / Т.А. Воронина // Эксперим. и клин. фармакол. – 2010. – № 73. Прил. – С. 5.

9. Воронина, Т.А. Перспективы поиска новых анксиолитиков [Текст] / Т.А. Воронина, С.Б. Середенин // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2002. – Т. 65. – №5. – С. 4-17.

10. Гацура, В. В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ [Текст] / В. В. Гацура. - М.: Медицина, 1974. - 131 с.

11. Гречко, О.Ю. Конденсированные бензимидазолы – новый класс каппа-опиоидных агонистов [Текст]: дисс. ... докт. мед. наук: 14.03.06 / Гречко Олеся Юрьевна. – Волгоград. - 2012. – 296 с.

12. Елисеева, Н.В. Изучение побочных эффектов нового каппа-опиоидного агониста [Текст] / Н.В. Елисеева, О.Ю. Гречко // Тез. Докладов III Всероссийского научно-практического семинара «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии» / Вестник ВолГМУ. - 2011.- С. 32-34.

13. Елисеева, Н.В. Поиск и изучение фармакологических свойств новых агонистов каппа-опиоидных рецепторов среди производных бензимидазола [Текст]: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.06 / Елисеева Наталья Владимировна – Волгоград, 2010. – 182 с.

14. Елисеева, Н.В. Экспериментальное изучение обезболивающих свойств нового производного бен-зимидазола [Текст]/ Н.В. Елисеева, О.Ю. Гречко, А.А. Спасов, В.А. Анисимова // Тез. Докладов XVIII Российского Национального конгресса «Человек и лекарство». - Москва. - 2011.- С. 435.

15. Игнатов, Ю. Д. Современные аспекты терапии боли: опиаты [Текст] / Ю. Д. Игнатов, А. А. Зайцев // Качественная клиническая практика – 2001. - № 2. – С. 2–13.

16. Калитин, К.Ю. Противосудорожная активность соединения РУ-1205 на киндлинг-модели интермиттирующих ингаляций паров алкоголя [Текст] / К.Ю. Калитин, О.Ю. Гречко, А.А. Спасов, В.А. Анисимова // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2015. – Т.78. - № 4. - С.3-5.

17. Кузьмин, А.В. Внутривенное самовведение наркотиков у мышей [Текст] / А.В. Кузьмин, Э.Э. Звартау // Журн. высш. нервн. деят. – 1991. – Т. 41. – С. 1253-1260.
18. Маслов, Л.Н. Периферические эффекты лигандов ORL-1 рецепторов [Текст] / Л.Н. Маслов, Ю.Б. Лишманов, Дж. Кало [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2003. - Т.66. – № 6. - С.64-73.
19. Маслов, Л.Н. Центральные эффекты лигандов ORL-1 рецепторов. [Текст] / Л.Н. Маслов, Ю.Б. Лишманов, Дж. Кало [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2003. - Т.66. – № 5. - С.59-68.
20. Морковин, Е.И. Разработка методики кратковременных параллельных стрессирующих воздействий [Текст] / Е.И. Морковин, А.С. Тарасов, В.В. Степанова, Е.А. Неделько // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – 12-1. С.115- 118.
21. Островская, Р.У. Методические рекомендации по изучению нейролептической активности лекарственных средств [Текст] / Р.У. Островская, К.С. Раевский, Т.А. Воронина [и др.] // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств под общей редакцией А.Н. Миронова. - М.: Гриф и К, 2012. – С. 251-263.
22. Петров, В.И. Эффективность лорноксикама и кеторолака в профилактике и лечении послеоперационного болевого синдрома у пациентов нейрохирургического профиля [Текст] / В.И. Петров, А.В. Сабанов, В.Г. Медведев [и др.] // Хирургия. – 2009. - № 2. – С. 64-70.
23. Пчелинцев, М. В. Мониторинг использования опиоидных анальгетиков у амбулаторных пациентов как способ оптимизации лечения интенсивной хронической боли [Текст] / М. В. Пчелинцев, Э. Э. Звартау, А. Н. Кубынин, Т. Е. Артеева // Журнал Биомедицина. – 2008. – Т. 1. - № 2. - С 63-73.
24. Пчелинцев, М.В. Длительность лечения хронической боли наркотическими анальгетиками у амбулаторных онкологических больных в ряде районов Санкт Петербурга [Текст] / М. В. Пчелинцев, А. Н. Кубынин, Э. Э. Звартау // Паллиативная медицина и реабилитация. – 2007. – Т. 2. - №. - С. 29-33.

25. Спасов, А.А. Анальгетические свойства производного морфолиноэтилимидазобензимидазола [Текст] / А.А. Спасов, О.Ю. Гречко, Д.М. Штарева, В.А. Анисимова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т. 76(9). – С.15-18.
26. Спасов, А.А. Анальгетические свойства производного морфолинэтилимидазобензимидазола [Текст] / А. А. Спасов, О. Ю. Гречко, Д. М. Штарёва, В. А. Анисимова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. - Т.76. - №9. – С.15-18;.
27. Спасов, А.А. Анальгетические свойства производного морфолинэтилимидазобензимидазола [Текст] / А.А. Спасов, О.Ю. Гречко, Д.М. Штарёва, В.А. Анисимова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т. 76. - № 9. – С. 15-18.
28. Спасов, А.А. Сравнительное изучение наркотического потенциала опиоидных агонистов [Текст] / А. А. Спасов, О. Ю. Гречко, Н. В. Елисеева // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН. – 2009. - №3. - С. 22-25.
29. Стуковина, А.Ю. Поиск антагонистов пуриновых рецепторов тромбоцитов среди конденсированных производных бензимидазола и изучение их фармакологических свойств [Текст]: дис. ... канд. фарм. наук: 14.03.06 / Стуковина Анна Юрьевна – Волгоград, 2007. - 189 с.
30. Тюренков, И.Н. Роль ГАМК-рецепторов в развитии патологических процессов [Текст] / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова // Экспер. и клин. фармакол. – 2011. – № 2. – С.47-52.
31. Циркин, В. И. Роль дофамина в деятельности мозга (обзор литературы) [Текст] / В. И. Циркин, В. И. Багаев, Б. Н. Бейн // Журнал Вятский медицинский вестник. – 2010. - № 1. - С. 1-24.
32. Черников, М.В. Производные бензимидазола – модуляторы рецепторов биологически активных веществ [Текст]: дисс. ... док. мед. наук. 14.00.25 / Максим Валентинович Черников – Волгоград, 2008. - 267 с.

33. Шабанов, П. Д. Динамика реакции самостимуляции мозга у крыс после форсированного введения психоактивных веществ [Текст] / П. Д. Шабанов, А. А. Лебедев, А. В. Любимов, В. А. Корнилов // Психофармакология и биологическая наркология. – 2009. – Т. 9. - №. 1–2. – С. 2524-2529.
34. Яковлев, Д.С. Поиск антагонистов 5-HT<sub>3</sub> рецепторов среди конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола и бензимидазолина и изучение их фармакологических свойств [Текст]: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.06 / Яковлев Дмитрий Сергеевич - Волгоград, 2007.-164 с.
35. Abduljawad, K.A. Effects of clonidine and diazepam on the acoustic startle response and on its inhibition by 'prepulses' in man [Text] / K. A. Abduljawad, R. W. Langley, C. M. Bradshaw, E. Szabadi // J Psychopharmacol. – 1997. – V. 11. - № 1. – P. 29-34.
36. Aldrich, J.V. Peptide Kappa Opioid Receptor Ligands: Potential for Drug Development [Text] / J.V. Aldrich, P.J. McLaughlin // J. AAPS. -2009. – 1(2). - P.312-322.
37. Al-Hasani R, McCall JG, Foshage AM, Bruchas MR. Locus coeruleus kappa-opioid receptors modulate reinstatement of cocaine place preference through a noradrenergic mechanism / R. Al-Hasani, J. G. McCall, A. M. Foshage, M. R. Bruchas // Neuropsychopharmacology. – 2013. – V. 38. - № 12. – P. 2484-2497.
38. Al-Hasani, R. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior [Text] / R. Al-Hasani, M. R. Bruchas // Anesthesiology. – 2011. – V. 115. – P. 1363–1381.
39. Alt, A. Mu and Delta opioid receptors activate the same G proteins in human neuroblastoma SH-SY5Y cells [Text] / A. Alt, M.J. Clark, J.H. Woods, J.R. Traynor // Br J of Pharmacology – 2002. – V.135. – P.217-225.
40. Anisimova, V. A. Synthesis and Pharmacological activity of salts of 3-acetyl-2-R-9-dialcyl aminoethylimidazo[1,2-a]benzimidazoles [Text] / V.A. Anisimova, I.E. Tolpygin, A.A. Spasov [et al] // Pharm. Chem. J. – 2010. – V. 44. – № 3. - С. 117-122.

41. Antony, P. Davenport and Fraser D. Russel. Radioligand Binding Assay: Theory and Practice [Text] / P. Antony // Current Directions in Radiopharmaceutical Research and Development, edited by S. J. Mather. – 1996. – V. 30. – P. 169-179.
42. Atack, J. R. Anxiolytic compounds acting at the GABA<sub>A</sub> receptor benzodiazepine binding site [Text] / J. R. Atack // Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders. – 2003. – T. 2. – №. 4. – C. 213-232.
43. Bagnol, D. Cellular localization and distribution of the cloned mu- and kappa-opioid receptors in rat gastrointestinal tract [Text] / D. Bagnol, A. Mansour, H. Akil, S.J. Watson// Neurosci. – 1997. –V. 81. – P.579-591.
44. Balboni, G. Conversion of the potent delta-opioid agonist H-Dmt-Tic-NH-CH(2)-bid into delta-opioid antagonists by N(1)-benzimidazole alkylation(1) [Text] / G. Balboni, R. Guerrini, S. Salvadori [et al] // J Med Chem. – 2005. – V. 48. - № 26. – P. 8112-8114.
45. Balerio, G.N. Baclofen analgesia: involvement of the GABAergic system [Text] / G.N. Balerio, M.C. Rubio // Pharmacological Research. – 2002. – V. 46. - № 3. – P. 281–286.
46. Banna, N.R. Selective inhibition of nociceptive flexion reflex discharge by the kappa agonist bremazocine [Text] / N. R. Banna, H. A. Al-Amin, S. J. Jabbur. // Neuropharmacology. – 1987. - V. 26. – № 2-3. – P. 271-274.
47. Barber, A. Novel developments with selective, non-peptidic kappa-opioid receptor agonists [Text] / A. Barber, R. Gottschlich // Exp. Opin. Invest. Drugs. – 1997. – V.6(10). – P.1351-1368.
48. Barnes, M. J. The effect of CNS opioid on autonomic nervous and cardiovascular responses in diet-induced obese rats [Text] / M. J. Barnes, K. C. Jen, J. C. Dunbar // Peptides. – 2004. – V. 25. - P. 71–79.
49. Bars, D.L. Animal models of nociception [Text] / D.L. Bars, M. Gozariu, S.W. Cadden // Pharmacol. Rev. - 2001. – V.53. - P.597-652.

50. Benamar, K. Role of the nitric oxide pathway in kappa-opioid-induced hypothermia in rats [Text] / K. Benamar, E. B. Geller, M. W. Adler // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2002. – V. 303. - № 1. – P.375-378.
51. Bentley, K.W. Compounds Possessing Morphine-Antagonizing or Powerful Analgesic Effects [Text] / K.W. Bentley, A.L.A. Boura, A.E. Fitzgerald [et. al] // *Nature.* - 1965. - V.206. – P.102-103.
52. Bernalov, A. Yu. Classical conditioning of electrical self-stimulation of ventral tegmental area to brief visual stimuli in rats [Text] / A. Yu. Bernalov, E. E. Zvartau // *Journal of Neuroscience Methods.* – 1996. – V. 70. – P. 1–4.
53. Bhushan, R.G. A bivalent ligand (KDN-21) reveals spinal delta and kappa opioid receptors are organized as heterodimers that give rise to delta(1) and kappa(2) phenotypes. Selective targeting of delta-kappa heterodimers [Text] / R.G. Bhushan, S.K. Sharma, Z. Xie // *J Med Chem.* – 2004. – V.47(12). – P.2969-2972.
54. Boom, M. Non-analgesic effects of opioids: opioid-induced respiratory depression [Text] / M. Boom, M. Niesters, E. Sarton [et al] // *Curr Pharm Des.* – 2012. – V. 18. - P. 5994-6004.
55. Boyle, S.J. [3H]-CI-977:a highly selective ligand for the k-opioid receptor in both guinea-pig and rat forebrain [Text] / S.J. Boyle, K.G. Meecham, J.C. Hunter, J. Hughes // *Mol. Neuropharmacol.* – 1990. – V.1. – P.23–29.
56. Bronikowski, A. M. Open-Field Behavior of House Mice Selectively Bred for High Voluntary Wheel-Running [Text] / A. M. Bronikowski, P. A. Carter, J. G. Swallow [et al] // *Jr. Behavior Genetics.* 2001. - V. 31. - № 3. – P. 309-316.
57. Brooks, D.P. Comparison of the Water Diuretic Activity of Kappa Receptor Agonists and a Vasopressin Receptor Antagonist in Dogs [Text] / D.P. Brooks, M. Valente, G. Petrone [et al] // *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.* – 1996. – V. 280. - № 3. – P. 1176-1183.
58. Brown, G.R. Stadol dependence: another case [Text] / G.R. Brown // *JAMA.* – 1985. – V.254. – P.910.

59. Bruchas, M.R. Stress-Induced p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Mediates  $\kappa$ -Opioid-Dependent Dysphoria [Text] / M. R. Bruchas, B.B. Land, M. Aita [et al] // J Neurosci. – 2007. – V. 27. - P 11614-11623.
60. Bruchas, M.R. The dynorphin/kappa opioid system as a modulator of stress-induced and pro-addictive behaviors [Text] / M.R. Bruchas, B.B. Land, Ch. Chavkin. // Brain Res. – 2009. – V. 1314. – P. 44–55.
61. Bruijnzeel, A. W. Kappa-opioid receptor signaling and brain reward function. [Text] / A. W. Bruijnzeel // Brain Res Rev. – 2009. – V.62(1). – P.127–146.
62. Budd, K. Buprenorphine - the Unique Opioid Analgesic: Pharmacology and Clinical Application [Text] // Editors K. Budd, R. B. Raffa // Georg Thieme, 2005, P. 134.
63. Bulenger, S. Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation [Text] / S. Bulenger, S. Marullo, M. Bouvier // Trends Pharmacol. Sci. - 2005. – V.26(3). – P.131–137.
64. Butelman, E.R. GR89,696: a potent kappa-opioid agonist with subtype selectivity in rhesus monkeys [Text] / E.R. Butelman, M.C. Ko, J.R. Traynor [et al.] // J Pharmacol Exp Ther. – 2001. – Supp 298(3). – P.1049-1059.
65. Cahill, C. M. Does the kappa opioid receptor system contribute to pain aversion? [Text] / C. M. Cahill, A. M. W. Taylor, C. Cook, E. Ong, J. A. Morón, C. J. Evans // Front Pharmacol. – 2014. – V. 5. - № 253. – P.1-15.
66. Cahill, C. M. Does the kappa opioid receptor system contribute to pain aversion? [Electronic resource] / : Frontiers, a community-rooted, open-access academic publisher . - URL: <http://journal.frontiersin.org/> (дата обращения 20.03.2016)
67. Cahill, C. M. Migraine and reward system-or is it aversive? [Text] / C. M. Cahill, C. Cook, S. Pickens // Curr. Pain Headache Rep. - 2014. - V. 18. - № 410. - 9 pp;
68. Cahill, C.M. Does the kappa opioid receptor system contribute to pain aversion? [Text] / C.M. Cahill, A.M.W. Taylor, C. Cook [et al.] // Front Pharmacol. - 2014. – V.5. – P.253.

69. Calo', G. Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target [Text] / G. Calo', R. Guerrini, A. Rizzi, S. Salvadori, D. Regoli // *Br J Pharmacol.* -2000. – V. 129. - № 7. - P. 1261-1283.
70. Camilleri, M. Novel pharmacology: asimadoline, a kappa-opioid agonist, and visceral sensation [Text] / M. Camilleri // *Neurogastroenterol. Motil.* – 2008. – V.20. - P.971–979.
71. Careau, V. Are Voluntary Wheel Running and Open-Field Behavior Correlated in Mice? Different Answers from Comparative and Artificial Selection Approaches [Text] / V. Careau, O.R.P. Bininda-Emonds, G. Ordonez, T.J. Garland J // *Behav Genet.* – 2012. – V.42. – P.830–844.
72. Carlezon, W.J. Kappa-opioid ligands in the study and treatment of mood disorders [Text] / W.J. Carlezon, C. Beguin, A.T. Knoll [et al.] // *J. Pharmacol. and Ther.* - 2009. – V.123(3). - P.334 – 343.
73. Castillo, R., Kissin, I., Bradley, E.L. Selective kappa opioid agonist for spinal analgesia without the risk of respiratory depression [Text] / R. Castillo, I. Kissin, E.L. Bradley // *Anesth. Analg.* – 1986. - V. 5. - P. 350-354.
74. Casy, A.F. Opioid Analgesics [Text] / A.F. Casy, R.T. Parfitt // *New York.* – N.Y.: Plenum Press,1986. – 518 pp.
75. Cerina, M. Thalamic Kv7 channels: pharmacological properties and activity control during noxious signal processing [Text] / M.Cerina, H. J.Szkudlarek, P.Coulon, [et al.] // *British Journal of Pharmacology.* – 2015. – V.172 (12). - P.3126–3140.
76. Chamouard, P. Regulatory role of enteric kappa opioid receptors in human colonic motility [Text] / P. Chamouard, A. Klein, E. Martin [et al] // *Life Sci.* – 1993. - V. 53. P. – 1149-1156.
77. Chang, K.J. Heterogeneity and properties of opiate receptors [Text] / K.J. Chang, P. Cuatrecasas // *Fed Proc.* - 1981. – V.40. - P.2729-2734.

78. Chang, K.J. Novel opiate binding sites selective for benzomorphan drugs [Text] / K.J. Chang, E. Hazum, P. Cuatrecasas // Proc Natl Acad Sci USA. - 1981. - V.78. - P.4141-4145.
79. Chang, S.D. Quantitative Signaling and Structure-Activity Analyses Demonstrate Functional Selectivity at the Nociceptin/Orphanin FQ Opioid Receptor. [Text] S.D. Chang, S.W. Mascarella, S.M. Spangler [et al.] // Mol Pharmacol. - 2015. - V.88(3). - P.502-511.
80. Chavkin, C. The Therapeutic Potential of  $\kappa$ -Opioids for Treatment of Pain and Addiction [Text] / Charles Chavkin // Neuropsychopharmacology. - 2011. - V. 36. -P. 369-370.
81. Chefer, V. I. Kappa-opioid receptor activation prevents alterations in mesocortical dopamine neurotransmission that occur during abstinence from cocaine / V. I. Chefer, J. A. Moron, B. Hope, W. Rea, T. S. Shippenberg // Neuroscience. - 2000. - V. - P. 619-627.
82. Chen, M. Morphine disinhibits glutamatergic input to VTA dopamine neurons and promotes dopamine neuron excitation [Text] / M. Chen, Y. Zhao, H. Yang [et al] // eLife. - 2015. - P. 1-55.
83. Cheung, C.W. Michael Irwin. Chronic Opioid Therapy for Chronic Non-Cancer Pain: A Review and Comparison of Treatment Guidelines [Text] / C.W. Cheung, Q. Qiu, S.W. Choi [et al.] // Pain Physician. - 2014. - V.17. - P.401-414.
84. Clark, C.R. PD117302: a selective agonist for the kappa-opioid receptor [Text] / C.R. Clark, B. Birchmore, N.A. Sharif [et al.] // Br. J. Pharmacol. - 1988. - V.93. - P.618-626.
85. Clarke, R.W. The contributions of mu-, delta- and kappa-opioid receptors to the actions of endogenous opioids on spinal reflexes in the rabbit [Text] / R.W. Clarke, T. W. Ford // Br J Pharmacol. - 1987. - V. 91. - № 3. - P. 579-589.
86. Commissey, S. Butorphanol: effects of a prototypical agonists analgesic on kappa-opioid receptors [Text] / S. Commissey, Lir-Wan Fan // J. Pharmacol Sci. - 2005. - V. 98. P. 109-116.

87. Corbett, A.D. 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail [Text] / A.D. Corbett, G. Henderson, A.T. McKnight, S.J. Paterson // *Br J Pharmacol.* – 2006. – V.147(1). – P.153-62.
88. Corbett, A.D. Selectivity of ligands for opioid receptors [Text] / A.D. Corbett, S.J. Paterson, H.W. Kosterlitz // *Handbook of experimental pharmacol.* – 1993. – V.104. – P.645–679.
89. Cosgrove, K.P. Effects of bremazocine on self-administration of smoked cocaine base and orally delivered ethanol, phencyclidine, saccharin, and food in rhesus monkeys: a behavioral economic analysis [Text] / K.P. Cosgrove, M.E. Carroll // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2002. – V.301(3). - 993-1002.
90. Coupar, I.M. The peristaltic reflex in the rat ileum: evidence for functional mu- and delta-opiate receptors [Text] / I.M. Coupar // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1995. – V.47. – P.643-646.
91. Cox, H. The selective kappa-opioid receptor agonist U50,488 reduces L-dopa-induced dyskinesias but worsens parkinsonism in MPTP-treated primates [Text] / H. Cox, D.M. Togasaki, L. Chen [et al] // *Exp Neurol.* – 2007. – V. 205. - № 1. – P. 101-107.
92. Craft, R.M. Agonist/antagonist properties of nalbuphine, butorphanol and (-)-pentazocine in male vs. female rats [Text] / R.M. Craft, D.M. McNiel // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 2003. – V.75(1). – P.235-245.
93. Cunha, T. M. Stimulation of peripheral Kappa opioid receptors inhibits inflammatory hyperalgesia via activation of the PI3Kg/AKT/nNOS/NO signaling pathway [Text] / T. M. Cunha, G. R. Souza, A. C. Domingues [et al.] // *Molecular Pain.* - 2012. – V.8. – P.10.
94. Curzon, P. The Behavioral Assessment of Sensorimotor Processes in the Mouse: Acoustic Startle, Sensory Gating, Locomotor Activity, Rotarod, and Beam Walking [Text] / P. Curzon, M. Zhang, R. J. Radek, G. B. Fox // Chapter 8, *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition, editor J. J. Buccafusco. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2009. – P. 145-177.

95. D. E. Gmerek, J. H. Woods. Kappa Receptor Mediated Opioid Dependence in Rhesus Monkeys [Text] / D. E. Gmerek, J. H. Woods // *Life Sciences*. - 1986. - V. 39. - P. 987-992.
96. De Graaf, J. S. Fully Automated Experiments with Isolated Organs In Vitro [Text] / J. S. De Graaf, C. J. De Vos, H. J. Steenbergen // *Journal of Pharmacological Methods* – 1983. – V.10. – P.113-135.
97. De la Peña, I.J., *Artemisia capillaris* Thunberg Produces Sedative-Hypnotic Effects in Mice, Which are Probably Mediated Through Potentiation of the GABAA Receptor [Text] / I.J. de la Peña, E. Hong, H.J. Kim [et al] // *Am. J. Chin. Med.* – 2015. – V.43. - № 4. – P. 667-679.
98. Delaville, C. Noradrenaline and Parkinson's disease [Text] / C. Delaville, P.D. Deurwaerdère, A. Benazzouz // *Front Syst Neurosci.* – 2011. – V. 18. – P.5-31.
99. Dietis, N. Simultaneous targeting of multiple opioid receptors: a strategy to improve side-effect profile [Text] / N. Dietis, R. Guerrini, G. Calo [et al.] // *Br. J. Anaesth.* – 2009. - V.103 (1). – P.38-49.
100. DiNieri, J.A. Altered sensitivity to rewarding and aversive drugs in mice with inducible disruption of cAMP response element-binding protein function within the nucleus accumbens [Text] / J.A. DiNieri, C.L. Nemeth, A. Parsegian [et al.] // *J Neurosci.* – 2009. – V.29(6). – P.1855–1859.
101. Diotte, M. Eleftherios Miliaressis. Factors that influence the persistence of stimulation-induced aversion [Text] / M. Diotte, C. Bielajew, M. Miguez // *Physiology & Behavior.* – 2001. – V.72. – P.661-667.
102. Dortch-Carnes, J. Bremazocine: a kappa-opioid agonist with potent analgesic and other pharmacologic properties [Text] / J. Dortch-Carnes, D.E. Potter // *CNS Drug Rev.* – 2005. – V.11(2). – P.195-212.
103. Dortch-Carnes, J. Bremazocine: a kappa-opioid agonist with potent analgesic and other pharmacologic properties [Text] / J. Dortch-Carnes, D.E. Potter // *CNS Drug Rev.* – 2005. – V.11(2). – P.195-212.

104. Dosaka-Akita, K., The kappa opioid agonist U-50,488H antagonizes respiratory effects of mu opioid receptor agonists in conscious rats [Text] / K. Dosaka-Akita, F.C. Tortella, J.W. Holaday, J.B. Long // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1993. - V. 264. - P. 631–637.

105. Dunn, R. Opiate Receptor Subtype Modulation of Dopaminergic Activity the Effects of Mu, Kappa and Sigma Opiates on the Development of Dopaminergic Supersensitivity [Text] / Robert Dunn // *Open Access Dissertations.* - 1986. -147 pp.

106. Dykstra, L. A. Kappa opioids in rhesus monkeys. I. Diuresis, sedation, analgesia and discriminative stimulus effects [Text] / L.A. Dykstra, D.E. Gmerek, G. Winger, J.H. Woods // *J Pharmacol Exp Ther.* - 1987. - V. 242. - P. 413-420.

107. Ebner, S. R. Depressive-like effects of the kappa opioid receptor agonist salvinorin A are associated with decreased phasic dopamine release in the nucleus accumbens [Text] / S. R. Ebner, M. F. Roitman, D. N. Potter [et al] // *Psychopharmacology (Berl).* - 2010. - V. 210. - № 2. - P. 241–252.

108. Ehrich, J. M. Kappa Opioid Receptor-Induced Aversion Requires p38MAPK Activation in VTA Dopamine Neurons [Text] / J.M. Ehrich, D.I. Messinger, C.R. Knakal [et al.] // *The Journal of Neuroscience.* - 2015. - V.35(37). - P.12917–12931.

109. Ehrich, J. M. Kappa Opioid Receptor-Induced Aversion Requires p38MAPK Activation in VTA Dopamine Neurons [Text] / J.M. Ehrich, D.I. Messinger, C.R. Knakal [et al] // *The Journal of Neuroscience.* - 2015. - V. 35. - № 37. - P. 12917–12931.

110. Endoh, T. Potent antinociceptive effects of TRK-820, a novel kappa-opioid receptor agonist [Text] / T. Endoh, H. Matsuura, A. Tajima [et al] // *H. Life Sci.* - 1999. - V. 65. - №16. - P. 1685-1694.

111. Endoh, T. TRK-820, a selective kappa-opioid agonist, produces potent antinociception in cynomolgus monkeys [Text] / T. Endoh, A. Tajima, N. Izumimoto // *Jpn. J. Pharmacol.* - 2001. - V.85. - P.282–290.

112. Erkent, U. The effect of nitric oxide on fentanyl and haloperidol-induced catalepsy in mice [Text] / U.Erkent, A.B.Iskit, R.Onur, M.Ilhan // *Eur J Anaesthesiol.* – 2006. – V. 23. - № 7. – P. 580-585.
113. Estrada-Reyes, R. Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; an ethnomedicine of Mexico [Text] / R. Estrada-Reyes, C. López-Rubalcava, O. A. Ferreyra-Cruz [et al] // *J Ethnopharmacol.* – 2014. – V. 153. - № 1. - P. 98-110.
114. Evans, W.S. A case of stadol dependence [Text] / W.S. Evans, J.N. Bowen, F.L. Giordano, B. Clark // *JAMA.* – 1985. – V.253. – P.2191-2192.
115. Everitt, B. J. From the ventral to the dorsal striatum: Devolving views of their roles in drug addiction. Honoring Ann Kelley [Text] / B. J. Everitt, T. W. Robbins // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* – 2013. – V. 37. – P. 1946-1954.
116. Faure, A. Mesolimbic Dopamine in Desire and Dread: Enabling Motivation to Be Generated by Localized Glutamate Disruptions in Nucleus Accumbens [Text] / A. Faure, S. M. Reynolds, J. M. Richard, K. C. Berridge // *J Neurosci.* – 2008. – V. 28. - № 28. - P. 7184-7192.
117. Feng, Y.Z.. Tolerance development to butorphanol: comparison with morphine [Text] / Y.Z. Feng, Y.T. Tseng, S.P. Jaw [et al] // *Pharmacol Biochem Behav.* – 1994. – V. 49. - P. 649–655.
118. Fernandes, M. Quantitative assessment of tolerance to and dependence on morphine in mice [Text] / Fernandes M., Kluwe S., Coper H. // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* — 1977. — V. 297. — P. 53–60.
119. Fletcher, G.H. The actions of the kappa 1 opioid agonist U-50,488 on presynaptic nerve terminals of the chick ciliary ganglion [Text] / G.H. Fletcher, V.A. Chiappinelli // *Neuroscience.* – 1993. – Supp 53(1). – P.239-50.
120. Frey, H.H. Effect of mu- and kappa-opioid agonists on the electroconvulsive seizure threshold in mice and antagonism by naloxone and MR 2266 [Text] / Hans-Hasso Frey // *Pharmacol Toxicol.* – 1988. – V. 62. - № 3. – P.150-154.

121. Freye, E. Bremazocine: an opiate that induces sedation and analgesia without respiratory depression [Text] / E. Freye, E. Hartung, G. K. Schenk // *Anesth. Analg.* – 1983. - V. 62. – P. 483–488.
122. Friese, N. Reversal by k-agonists of peritoneal irritation-induced ileus and visceral pain in rats [Text] / N. Friese, E. Chevalier, F. Angel [et al.] // *Life Sci.* – 1997. – V.60. – P.625–634.
123. Fujibayashi, K. Effects of R-84760, a selective kappa-opioid receptor agonist, on nociception, locomotion and respiration in rats [Text] / K. Fujibayashi, M. Kubota-Wantanabe, Y. Iizuka // *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* - 1996. – V. 331. - P. 153–162.
124. Fujibayashi, K. Pharmacological properties of R-84760, a novel K-opioid receptor agonist [Text] / K. Fujibayashi, K. Sakamoto, M. Watanabe, Y. Iizuka // *European Journal of Pharmacology.* – 1994. – V.261. – P.133-140.
125. Fujii, H. Opioid Kappa Receptor Selective Agonist TRK-820 (Nalfurafine Hydrochloride), Chapter 4 [Text] / H. Fujii, S. Hirayama, H. Nagase // *Pharmacology*, edited by Luca Gallelli. - Rijeka, Croatia.: InTech, 2012. - P. 81-99.
126. Fujita, W. Molecular characterization of eluxadoline as a potential ligand targeting mu-delta opioid receptor heteromers [Text] / W.Fujita, I.Gomes, L.S.Dove [et al.] // *Biochemical Pharmacology* – 2014. – V.92(3). – P.448-456.
127. Gallantine, E. L. Antinociceptive and Adverse Effects of mu- and kappa-Opioid Receptor Agonists: A Comparison of Morphine and U50488-H [Text] / E. L. Gallantine, T. F. Meert // *J Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* – 2008. – V. 103. - P. 419-427.
128. Gargiulo, S. Mice anesthesia, analgesia, and care, Part I: anesthetic considerations in preclinical research [Text] / S. Gargiulo, A. Greco, M. Gramanzini [et al.] // *ILAR J.* – 2012. – V. 53. - № 1. – P. 55-69.
129. Garner, H. R. Butorphanol-Mediated Antinociception in Mice: Partial Agonist Effects and Mu Receptor Involvement [Text] / H. R. Garner, T. F. Burke, C. D.

Lawhorn [et al] // J Pharmacol and Exper Ther. – 1997. - V. 282. - № 3. - P. 1253-1261.

130. Gavend, M. Antagonism of metergoline on the diuretic effect of cyclazocine and U-50488 drugs with a kappa agonist activity [Text] / M. Gavend, M. Mallaret, F. Caron, G. Baragatti // Biomed Pharmacother. – 1993. – V.47(8). – P. 337-344.

131. Gear, R. W. The kappa opioid nalbuphine produces gender- and dose-dependent analgesia and antianalgesia in patients with postoperative pain [Text] / R. W. Gear, C. Miaskowski, N. C. Gordon [et al] // J Pain 83, November 1999 (2): 339–45.

132. Gear, R.W. NOP receptor mediates anti-analgesia induced by agonist-antagonist opioids [Text] / R.W. Gear, O. Bogen, L.F. Ferrari [et al.] // Neuroscience. – 2014. –V.17;257. – P.139-48.

133. Georges, F. Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the striaterminalis: a novel excitatory aminoacid input to midbrain dopamine neurons [Text] / F. Georges, G. Aston-Jones // J. Neurosci. – 2002. – V. 22. - P. 5173–5187;

134. Gharagozlou, P. Pharmacological profiles of opioid ligands at kappa opioid receptors [Text] / P. Gharagozlou, E. Hashemi, T.M. DeLorey [et al.] // BMC Pharmacol. – 2006. – V.6. – P. 3.

135. Gillis, J.C. Transnasal butorphanol. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in acute pain management [Text] / J.C. Gillis, P. Benfield, K.L. Goa // Drugs. – 1995. – V.50. - P.157–175.

136. Giuliani, S. Role of kappa opioid receptors in modulating cholinergic twitches in the circular muscle of guinea-pig colon [Text] / S. Giuliani, A. Lecci, M. Tramontana, C.A. Maggi // Br J Pharmacol. – 1996. – V. 119. P. 985–989.

137. Goldberg, S. R. Some Behavioral Effects of Naloxone, Nalorphine and Morphine, Alone and in Combination, Compared in the Squirrel Monkey and the Pigeon [Text] / S. R. Goldberg, W. H. Morse // Report of the Thirty-Sixth Annual Scientific Meeting Committee on Problems of Drug Dependence, Mexico-city. – 1974. – V.10-14. – P. 883-900.

138. Goldfrank, L.R. Goldfrank's Toxicologic Emergencies 8th Ed. [Text] / L.R. Goldfrank // New York. - N.Y.: McGraw-Hill, 2006. - P.596.
139. Goodman, L.S. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 5th ed. [Text] / L.S. Goodman, A. Gilman // New York. – N.Y.: Macmillan Publishing Co., Inc., 1975. -P.273.
140. Gray, A.C. Characterisation of opioid receptors involved in modulating circular and longitudinal muscle contraction in the rat ileum [Text] / A.C. Gray, P.J. White, I.M. Coupar // Br J Pharmacol. – 2005. – V.144(5). – P.687–694.
141. Gray, A.C. Characterisation of opioid receptors involved in modulating circular and longitudinal muscle contraction in the rat ileum [Text] / A.C.Gray, P.J.White, I.M.Coupar // Br J Pharmacol. – 2005. – V.144(5). – P.687-694.
142. Gray, A.C. Comparison of opioid receptor distributions in the rat ileum [Text] / A.C.Gray, I.M.Coupar, P.J.White // Life Sci. – 2006. – V.78(14). – P.1610-1616;
143. Gray, AC. Comparison of opioid receptor distributions in the rat ileum [Text] / A.C. Gray, I.M. Coupar, P.J. White // Life Sci. – 2006. – V.78(14). – P.1610-1616.
144. Greenwald, M.K. Butorphanol agonist effects and acute physical dependence in opioid abusers: comparison with morphine [Text] / M.K. Greenwald, M.L. Stitzer // Drug Alcohol Depend. – 1998. – V.53(1). – P.17-30.
145. Gringauz, M. Tolerance to the analgesic effect of buprenorphine, butorphanol, nalbuphine, and cyclorphan, and cross-tolerance to morphine [Text] / M. Gringauz, R. Rabinowitz, A. Stav, A.D. Korczyn // J Anesth. – 2001. – V.15. – P.204–209.
146. Gringauz, M. Tolerance to the analgesic effect of buprenorphine, butorphanol, nalbuphine, and cyclorphan, and cross-tolerance to morphine [Text] / M. Gringauz, R. Rabinowitz, A. Stav, A.D. Korczyn // J Anesth. – 2001. - V. 4. - P. 204-209.
147. Haihua, S. Pentazocine-induced antinociception is mediated mainly by mu-opioid receptors and compromised by kappa-opioid receptors in mice [Text] / S.

Haihua, M. Hayashida, H. Arita [et al] // J Pharmacol Exp Ther. – 2011. – V. 338. - № 2. - P.579-87.

148. Hall, C. S. A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology [Text] / C.S. Hall, E.L. Ballachey // University of California Publications in Psychology. – 1932. – V. 6. – P. 1-12.

149. Hardman, J.G. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed. [Text] / J.G. Hardman, L.E. Limbird, A.G. Gilman // New York. - NY.: McGraw-Hill, 2006. - P.556.

150. Hassen, A.H. Selective autonomic modulation by mu- and kappa-opioid receptors in the hindbrain [Text] / A. H. Hassen, E. P. Broudy // Peptides. – 1988. – V. 9. - Suppl 1. - P. 63-67.

151. Hayers, A. Profile of activity of kappa receptor agonists in the rabbit vas deferens [Text] / A. Hayers, A. Kelly // Eur J Pharmacol. – 1985. – V. 110. – № 3. – P 317-322.

152. Hayes, A. G. (1). Determination of the receptor selectivity of opioid agonists in the guinea-pig ileum and mouse vas deferens by use of beta-funaltrexamine [Text] / A. G. Hayes, M. J. Sheehan, M. B. Tyers // Br J Pharmacol. – 1985. – V. 86. - № 4. - P. 899-904.

153. Hayes, A. Profile of activity of kappa receptor agonists in the rabbit vas deferens [Text] / Hayes, A, Kelly A// Eur J Pharmacol. – 1985. – V.16 – P.317-22.

154. Hayes, B.D. Toxicity of buprenorphine overdoses in children [Text] / B.D. Hayes, W. Klein-Schwartz, S. Doyon // Pediatrics. – 2008. – V.121(4). – P.782-786;

155. Hee Sock Park. A highly selective kappa-opioid receptor agonist with low addictive potential and dependence liability/ Hee Sock Park, Hee Yoon Lee, Yong Hae Kim [et al] // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2006. – V. 16. - P. 3609–3613.

156. Heldt, S.A. Amygdala-specific reduction of alpha1-GABAA receptors disrupts the anticonvulsant, locomotor, and sedative, but not anxiolytic, effects of

benzodiazepines in mice [Text] / S.A. Heldt, K.J. Ressler // J Neurosci. – 2010. – V. 30. – P. 7139-7151.

157. Herrero, J.F. Functional evidence for multiple receptor activation by kappa-ligands in the inhibition of spinal nociceptive reflexes in the rat [Text] / J.F. Herrero, P.M. Headley // Br J Pharmacol. – 1993. - Supp 110(1). – P.303-309.

158. Hill, M. P. The adrenergic receptor agonist, clonidine, potentiates the anti-parkinsonian action of the selective kappa-opioid receptor agonist, enadoline, in the monoamine-depleted rat / M. P. Hill, J. M. Brotchie // Br J Pharmacol. – 1999. – 128. - № 7. – P. 1577-1585.

159. Hiramatsu, M. Effects of U-50,488H on scopolamine-, mecamlamine- and dizocilpine-induced learning and memory impairment in rats [Text] / M. Hiramatsu, H. Murasawa, T. Nabeshima, T. Kameyama // J Pharmacol Exp Ther. – 1998. - V.284(3). – P.858-867.

160. Hirao, A. Pharmacological characterization of the newly synthesized nociceptin/orphanin FQ-receptor agonist 1-[1-(1-methylcyclooctyl)-4-piperidinyl]-2-[(3R)-3-piperidinyl]-1H-benzimidazole as an anxiolytic agent [Text] / A. Hirao, A. Imai, Y. Sugie [et al.] // J Pharmacol Sci. – 2008. - V.106(3). – P.361-368.

161. Hjelmstad, G. O. Kappa Opioid Receptor Activation in the Nucleus Accumbens Inhibits Glutamate and GABA Release Through Different Mechanisms [Text] / G. O. Hjelmstad, H. L. Fields. // Journal of Neurophysiology. – 2003. - V. 89. - № 5. - P. 2389-2395.

162. Ho, J. Putative kappa-2 opioid agonists are antihyperalgesic in a rat model of inflammation [Text] / J. Ho, A.J. Mannes , R. Dubner , R.M. Caudle // J Pharmacol Exp Ther. – 1997. – Supp 281(1). – P.136-141.

163. Holzer, P. Opioid receptors in the gastrointestinal tract [Text] / Peter Holzer // Regul Pept. – 2009. – V. 155. - P. 11–17.

164. Horan, P. J. Comparative Pharmacological and Biochemical Studies Between Butorphanol and Morphine [Text] / P.J. Horan, I.K. Ho // Pharmacology Biochemistry & Behavior. – 1989. - V. 34. - P. 847-854.

165. Horan, P. The physical dependence liability of butorphanol: a comparative study with morphine [Text] / P. Horan, I.K. Ho // *Eur. J. Pharmacol.* – 1991. – V.203. – P.387–391.
166. Houde, R.W. Analgesic effectiveness of the narcotic agonist-antagonists. [Text] / R.W. Houde // *Br J Clin Pharmacol.* -1979. – V.7. – Supp.3. - P.297-308.
167. Howell, L.L. Effects of levorphanol and several kappa-selective opioids on respiration and behavior in rhesus monkeys [Text] / L.L. Howell, J. Bergman, W.H. Morse // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1988. - V. 245. - P. 364–372.
168. Hughes, N.R. Kappa-opioid receptor agonists increase locomotor activity in the monoamine-depleted rat model of parkinsonism [Text] / N. R. Hughes, A. T. McKnight, G. N. Woodruff, M. P. Hill, A. R. Crossman, J. M. Brotchie // *Mov Disord.* – 1998. – V. 13. - № 2. - P. 228-233.
169. Iezhitsa, I.N. Toxic effect of single treatment with bromantane on neurological status of experimental animals [Text] / I. N. Iezhitsa, A. A. Spasov, L. I. Bugaeva, I. S. Morozov // *Bull Exp Biol Med.* – 2002. – V. 133. - № 4. P. 380-383.
170. Inan, S. Comparison of the diuretic effects of chemically diverse kappa opioid agonists in rats: nalfurafine, U50,488H, and salvinorin [Text] / A. S. Inan, D. Y. W. Lee, L. Y. Liu-Chen, A. Cowan // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* – 2009. – V. 379. - P. 263–270.
171. Inturrisi, C. E. Preclinical Evidence for a Role of Glutamatergic Systems in Opioid Tolerance and Dependence [Text] / Charles E. Inturrisi // *Seminars in Neuroscience.* – 1997. – V. 9. – P. 110–119.
172. Irwin, S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse [Text] / S. Irwin // *Psychopharmacologia.* – 1968. – V. 13. - № 3. – P. 222-257.
173. Javitt, D. C. Glutamate and Schizophrenia: Phencyclidine, N-Methyl-D-Aspartate Receptors, and Dopamine-Glutamate Interactions [Text] / Daniel C. Javitt // *International Review of Neurobiology.* – 2007. - V. 78. - P. 69-108.
174. Jaw, S.P. Opioid antagonists and butorphanol dependence [Text] / S.P. Jaw, B. Hoskins, I.K. Ho // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1993. – V.44. – P.497–500.

175. Jentsch, J. D. The Neuropsychopharmacology of Phencyclidine: From NMDA Receptor Hypofunction to the Dopamine Hypothesis of Schizophrenia [Text] / J. D. Jentsch, R. H. Roth // *Neuropsychopharmacology*. – 1999. – V. 20. – P. 201–225.
176. Kamei, J. Antitussive effects of two specific kappa-opioid agonists, U-50,488H and U-62,066E, in rats [Text] / J. Kamei, H. Tanihara, Y. Kasuya // *Eur J Pharmacol*. – 1990. – V.187(2). – P.281-286.
177. Kaneto, H. The opioid receptor selectivity for trimebutine in isolated tissues experiments and receptor binding studies [Text] / H. Kaneto, M. Takahashi, J. Watanabe // *J Pharmacobiodyn*. – 1990. – V. 13. - № 7. – P. 448-53.
178. Kapusta, D. R. Central kappa opioid receptor-evoked changes in renal function in conscious rats: participation of renal nerves [Text] / D. R.Kapusta, J. C. Obih // *J. Pharmacol. Exp. Ther*. – 1993. – V. 267. – P. 197–204.
179. Kapusta, D.R. Role of renal nerves in excretory responses to administration of kappa agonists in conscious spontaneously hypertensive rats [Text] / D.R. Kapusta, S.Y. Jones, G.F. DiBona // *J Pharmacol Exp Ther*. – 1989. – V.251. - № 1. – P.230-237.
180. Karami, R. Different effects of L-arginine on morphine tolerance in sham and ovariectomized female mice [Text] / R. Karami, M. Hosseini, F. Khodabandehloo [et al.] // *J. Zhejiang. Univ. Sci. B*. – 2011. – V.12(12). – P.1016-1023.
181. Kesim, M. The effect of Simvastatin on Picrotoxin-induced seizure in mice [Text] / M. Kesim, E. Yulug, M. Kadioglu [et al] // *J Pak Med Assoc*. – 2012. – V. 62. - № 11. – P. 1187-1191.
182. Khansari, M. The Useage of Opioids and their Adverse Effects in Gastrointestinal Practice: A Review / M. Khansari, M. Sohrabi, F. Zamani // *Middle East Journal of Digestive Diseases*. – 2013. - V.5. - No. 1. – P. 5–16.
183. Khansari, M. The Useage of Opioids and their Adverse Effects in Gastrointestinal Practice: A Review [Text] / M. Khansari, M. Sohrabi, F. Zamani. // *Middle East J Dig Dis*. – 2013. – V.5(1). – P.5–16.

184. Kiritsy-Roy, A. J. Dopamine D-1 and D-2 Receptor Antagonists Potentiate Analgesic and Motor Effects of Morphine [Text] / A. J. Kiritsy-Roy, S. M. Standish, L. Cass Terry // *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. – 1989. – V. 32. – P. 717-721.
185. Kitchen, I. Assessment of the hot-plate antinociceptive test in mice. A new method for the statistical treatment of graded data [Text] / I. Kitchen, M. Crowder // *J. Pharmacol. Methods*. – 1985. – V.13(1). – P.1-7.
186. Kivell, B. Kappa opioids and the modulation of pain [Text] / B. Kivell, T.E. Prisinzano // *Psychopharmacology* – 2010. - 210(2). P. 109-119.
187. Knoll, A.T. Dynorphin, stress, and depression [Text] / A.T. Knoll, J. Carlezon // *Brain Res.* - 2010. – V.1314. - P. 56-73.
188. Ko, M.C. Effects of atypical kappa-opioid receptor agonists on intrathecal morphine-induced itch and analgesia in primates [Text] / M.C. Ko, S.M. Husbands // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2009. – Supp 328(1). – P.193-200.
189. Kobayashi, K. Optimization of benzimidazole series as opioid receptor-like 1 (ORL1) antagonists: SAR study directed toward improvement of selectivity over hERG activity [Text] / K. Kobayashi, T. Kato, I. Yamamoto [et al] // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2009. – V. 19. - № 11. – P. 3100-3103.
190. Kosten, T. R. The Neurobiology of Opioid Dependence: Implications for Treatment [Text] / T. R. Kosten, T. P. George // *Sci Pract Perspect.* – 2002. - V. 1. – P. 13–20.
191. Kumagai, H. A novel kappa-receptor agonist, nalfurafine, for severe itch in hemodialysis patients [Text] / H. Kumagai, K. Yamamoto, T. Kushiyama [et al.] // *Kidney and Dialysis* – 2011. – V.70(4). – P.651-657.
192. Kumagai, H. Effect of a novel kappa-receptor agonist, nalfurafine hydrochloride, on severe itch in 337 haemodialysis patients: a Phase III, randomized, double-blind, placebocontrolled study [Text] / H. Kumagai, T. Ebata, K. Takamori [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2010. – V.25(4). – P.1251-1257.

193. Kumagai, H. Efficacy and safety of a novel  $\kappa$ -agonist for managing intractable pruritus in dialysis patients [Text] / H. Kumagai, T. Ebata, K. Takamori // *Am. J. Nephrol.* – 2012. – V.36(2). – P.175-83.

194. Kumor, K.M. Human psychopharmacology of ketocyclazocine as compared with cyclazocine, morphine and placebo [Text] / K.M. Kumor, C.A. Haertzen, R.E. Johnson [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1986. – V.238(3). – P.960-968.

195. Kuzeff, R.M. Inhibition of (-)-trans-(1S,2S)-U50488 hydrochloride by its enantiomer in white mice -- a placebo-controlled, randomized study [Text] / R.M. Kuzeff, M.N. Topashka-Ancheva, R.P. Mecheva // *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd.* – 2004. – Supp 11(3). – P.144-149.

196. Lalanne, L. The kappa opioid receptor: from addiction to depression, and back [Electronic resource] : Frontiers, a community-rooted, open-access academic publisher . - URL: <http://journal.frontiersin.org/> (дата обращения 22.03.2016)

197. Lalanne, L. The kappa opioid receptor: from addiction to depression, and back [Text] / L. Lalanne, G. Ayranci, B. L. Kieffer, P. E. Lutz // *FrontiersinPsychiatry | MolecularPsychiatry* December. – 2014. – V. 5. – Article 170.

198. Lalley, P.M. Mu-opioid receptor agonist effects on medullary respiratory neurons in the cat: evidence for involvement in certain types of ventilatory disturbances [Text] / P.M. Lalley // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2003. – 285. – P. 1287-2304.

199. Lambe, E.K. Serotonin Induces EPSCs Preferentially in Layer V Pyramidal Neurons of the Frontal Cortex in the Rat [Text] / E.K. Lambe, P.S. Goldman-Rakic, G.K. Aghajanian // *Cerebral Cortex.* – 2000. – V. 10. - № 10. – P. 974-980.

200. Lattanzi, R. HS-599: a novel long acting opioid analgesic does not induce place-preference in rats [Text] / R.Lattanzi, L.Negri, E.Giannini [et al.] // *British Journal of Pharmacology* – 2001. – V.134. – P.441-447.

201. Lattanzi, R. HS-599: a novel long acting opioid analgesic does not induce place-preference in rats [Text] / R. Lattanzi, L. Negri, E. Giannini, H.

Schmidhammer, J. Schutz, G. Improta // *British Journal of Pharmacology*. – 2001. - V. 134. – P. 441-447.

202. Le Merrer, J. Reward processing by the opioid system in the brain [Text] / J. Le Merrer, J. A. J. Becker, K. Befort, B. L. Kieffer // *Physiol.Rev.* – 2009. – V. 89. - P. 1379–1412;

203. Lemos, J. C. Kappa Opioid Receptor Function [Text] / J. C. Lemos, C. Chavkin // Part of the series *The Receptors*. – 2010. – V.29. - P.265-305.

204. Lemos, J.C. Kappa-opioid receptor function [Text] / J.C. Lemos, Ch. Chavkin // *Opiate receptors*, edited by G.W. Pasternak // New Jersey. – NJ.: Humana Press, 2011. - P. 226-305.

205. Lim, W. C. Stimulative and sedative effects of essential oils upon inhalation in mice [Text] / W. C. Lim, J. M. Seo, C. I. Lee [et al] // *Archives of Pharmacal Research*. – 2005. – V. 28. - № 7. – P. 770-774.

206. Lim, W.C. Stimulative and sedative effects of essential oils upon inhalation in mice [Text] / W. C. Lim, J. M. Seo, C. I. Lee [et al] // *Arch Pharm Res*. – 2005. - V. 28. - № 7. P. 770-774.

207. Linz, K. Cebranopadol: a novel potent analgesic nociceptin/orphanin FQ peptide and opioid receptor agonist [Text] / K. Linz, T. Christoph, T. M. Tzschentke [et al] // *Pharmacol Exp Ther*. – 2014. – V. 349. - № 3. - P. 535-548.

208. Little, P.J. Peripherally Restricted Opioid Analgesics [Text] / P. J. Little // *Research and Development of Opioid-Related Ligands*. – 2013. – V.2. - P.201–222.

209. Liu, X. Differential effects of deep sedation with propofol on the specific and nonspecific thalamocortical systems: a functional magnetic resonance imaging study [Text] / X. Liu, K. K. Lauer, B. D. Ward, S. J. Li, A. G. Hudetz // *Anesthesiology*. – 2013. – V. 118. - № 1. – P. 59-69.

210. Lodge, D. J. Amphetamine activation of hippocampal drive of mesolimbic dopamine neurons: A mechanism of behavioral sensitization [Text] / D. J. Lodge, A. A. Grace // *J Neurosci*. – 2008. – V. 28. - № 31. – P.7876–7882.

211. Lowe, G. Some Effects of a Hallucinogenic Compound (Cyprenorphine Hydrochloride; M 285) on the Light Reinforced Behaviour of Rats [Text] / G. Lowe, D. I. Williams // *Nature*. – 1969. – V.(224). – P.1226.
212. Lucki, I. The role of the aural head shake reflex in serotonin-mediated head shaking behavior [Text] / I. Lucki, K.M. Eberle, N. Minugh-Purvis // *Psychopharmacology*. – 1987. – V. 92. - P. 150-156.
213. Lukomskaya, N. Ya.. Involvement of Iontropic Glutamate Receptors in the Appearance of Arecoline Tremor in Mice [Text] / N. Ya. Lukomskaya, V. V. Lavrent'eva, L. A. Starshinova [et al] // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2008. - V. 38. - No. 4. - P. 421-426.
214. Mabrouk, O.S. Stimulation of  $\delta$  opioid receptor and blockade of nociceptin/orphanin FQ receptor synergistically attenuate parkinsonism [Text] / O. S. Mabrouk, R. Viaro, M. Volta [et al] // *J Neurosci*. – 2014. – V. 34. - № 39. – P. 12953-12962.
215. Mak, E. Characterization of kappa and delta opioid receptors in isolated organs by using type/subtype selective agonists and antagonists [Text] / E.Mak, A. Z. Ronai// *Med Sci Monit*. - 2001. – V.7(3). – P. 350-356.
216. Mako, E. Characterization of kappa and delta opioid receptors in isolated organs by using type/subtype selective agonists and antagonists [Text] / E. Mako, A. Z. Ronai // *Med Sci Monit*. – 2001. – V.7(3). – P. 350-356.
217. Makó, É. Characterization of kappa and delta opioid receptors in isolated organs by using type/subtype selective agonists and antagonists [Text] / É.Makó, A. Z.Rónai // *Med Sci Monit* – 2001. – V.7(3). – P.350-356.
218. Mamoon, A.M. Comparative rewarding properties of morphine and butorphanol [Text] / A.M. Mamoon, A.M. Barnes, I.K. Ho, B. Hoskins // *Brain Res. Bull.* – 1995. – V.38. – P.507–511.
219. Mamoon, A.M. Comparative rewarding properties of morphine and butorphanol [Text] / A.M. Mamoon, A.M. Barnes, I.K. Ho, B. Hoskins // *Brain Res Bull.* – 1995. – V.38. – P. 507-511.

220. Mangel, A. W. Asimadoline and its potential for the treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a review [Text] / A. W. Mangel, G. A. Hicks // *Clinical and Experimental Gastroenterology*. – 2012. – V. 5. – P. 1-10.
221. Mansner, R. Pharmacokinetics of nicotine in adult and infant mice [Text] / R. Mansner, M. J. Mattila // *Med Biol*. – 1977. – V. 55. - № 6. – P. 317-324.
222. Mansour, A. Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain [Text] / A. Mansour, H. Khachaturian, M. E. Lewis [et al] // *J. Neurosci*. – 1987. – V. 7. - P. 2445–2464;
223. Manzoni, O.J. Presynaptic regulation of glutamate release in the ventral tegmental area during morphine withdrawal [Text] / O. J. Manzoni, J. T. Williams // *J Neurosci*. – 1999. – V. 19. – P. 6629-6636.
224. Marek, G. J. Behavioral evidence for A-opioid and 5-HT<sub>2A</sub> receptor interactions [Text] / Gerard J. Marek // *European Journal of Pharmacology*. – 2003. – V. 474. – P. 77-83.
225. Marin, C. Effects of kappa receptor agonists on D1 and D2 dopamine agonist and antagonist-induced behaviors [Text] / C. Marin, T. M. Engber, P. Chaudhuri [et al] // *Psychopharmacology (Berl)*. – 1996. – V. 123. - № 2. P. 215-221.
226. Martin, W. R. History and development of mixed opioid agonists, partial agonists and antagonists [Text] / W.R. Martin // *Br J Clin Pharmacol*. - 1979. – V.7. - Supp 3. - P.273-279.
227. Martin, W.R. Opioid antagonists [Text] / W.R. Martin // *Pharmacol Rev*. – 1967. – V.19(4). – P.463-521.
228. Martinez, D. Imaging human mesolimbic dopamine transmission with positron emission tomography. Part II: amphetamine-induced dopamine release in the functional subdivisions of the striatum [Text] / D. Martinez, M. Slifstein, A. Broft [et al] // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2003. – V. 23. – № 3. – P. 285-300.
229. Matthes, H.W. Activity of the  $\delta$ -opioid receptor is partially reduced, whereas activity of the  $\kappa$ -receptor is maintained in mice lacking the  $\mu$ -receptor [Text] / H.W. Matthes, C. Smadja, O. J. Valverde [et al.] // *Neurosci*. – 1998. – V.18. – P.7285–7295.

230. McDonald, J. Opioid mechanisms and opioid drugs [Text] / J. McDonald, D.G. Lambert // *Anaesthesia & intensive care medicine*. – 2011. – V.12(1). – P.31-35.
231. McDonald, J. Opioid receptors [Text] / J. McDonald, D.G. Lambert // *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*. – 2005. – V. 5. - № 1. – P. 31-32.
232. Mello, N. K. Effects of the mixed mu/kappa opioid nalbuphine on cocaine-induced changes in subjective and cardiovascular responses in men [Text] / N. K. Mello, J. H. Mendelson, M. B. Sholar [et al.] // *Neuropsychopharmacology*. – 2005. – V.30(3). – P.618–632.
233. Milanés, M.V. Effects of chronic U-50,488H treatment on the isolated right atrium of the rat [Text] / M.V. Milanés, J.V. Rabadan, M.L. Laorden // *Neuropeptides*. - 1997. - V.31(5). – P.505-511.
234. Milanés, M.V. Effects of U-50,488H on isolated atria from rats chronically treated with the kappa-opioid agonist, U-50,488H [Text] / M.V. Milanés, J.V. Rabadan, M.T. Marin, M.L. Laorden // *J Auton Pharmacol*. – 1998. – V.18(6). – P.371-375.
235. Molenveld, P. Conformationally restricted kappa-opioid agonists: Synthesis and pharmacological evaluation of diastereoisomeric and enantiomeric decahydroquinolines [Text] / P. Molenveld, R. Bouzanne des Mazery, G.J. Sterk [et al.] // *J Bioorganic and Medical Chemistry Letters*. - 2015. – V.25. - P. 5326-5330.
236. Moore, T. T. Kappa Opioid Agonist-Induced Changes in IOP: Correlation with 3H-NE Release and cAMP Accumulation [Text] / T. T. Moore, D. E. Potter // *Exp. Eye Res*. – 2001. – V. 73. – P. 167-178.
237. Murray, R. B. The pupillary effects of opioids / R. B. Murray, M. W. Adler, A. D. Korozyn // *Life Sci*. – 1983. – V. 33. – P. 495-509.
238. Mutolo, D. Opioid-induced depression in the lamprey respiratory network [Text] / D. Mutolo, F. Bongianini, J. Einum [et al] // *Neuroscience*. – 2007. – V. 150. P. 720–729.

239. Nakagawasai, O. Enhanced head-twitch response to 5-HT-related agonists in thiamine-deficient mice [Text] / O. Nakagawasai, A. Murata, Y. Arai [et al] // *J Neural Transm (Vienna)*. – 2007. – V. 114. - №8. – P. 1003-1010.
240. Nakagawasai, O. Enhanced head-twitch response to 5-HT-related agonists in thiamine-deficient mice [Text] / O. Nakagawasai, A. Murata, Y. Arai [et al] // *J Neural Transm (Vienna)*. – 2007. – V. 114. - № 8. – P. 1003-1010.
241. Nakao, K. Effect of TRK-820, a selective kappa opioid receptor agonist, on scratching behavior in an animal model of atopic dermatitis [Text] / K. Nakao, K. Ikeda, T. Kurokawa [et al.] // *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. – 2008. - V.28. - № 2. - P.75-85.
242. Naour, M. L. Putative Kappa Opioid Heteromers As Targets for Developing Analgesics Free of Adverse Effects [Text] / M.L. Naour, M.M. Lunzer, M.D. Powers [et al.] // *J Med Chem*. – 2014. –V.57(15). – P.6383–6392.
243. Naylor, A. A potent new class of kappa-receptor agonist: 4-substituted 1-(arylacetyl)-2-[(dialkylamino)methyl]piperazines [Text] / A. Naylor, D.B. Judd, J.E. Lloyd [et al.] // *J Med Chem*. – 1993. – V.23. – Supp 36(15). – P.2075-2083.
244. Neubert, J.K. Effects of mu- and kappa2 opioid receptor agonist on pain and rearing behaviors [Text] / J.K. Neubert, H.L. Rossi, J. Pogar [et al.] // *Bahav. Brain Funct*. – 2007. – V.3. – P. 49-57.
245. Oka, T. Rabbit vas deferens: a specific bioassay for opioid kappa-receptor agonists [Text] / T. Oka, K. Negishi, M. Suda [et al.] // *Eur J Pharmacol*. – 1981. – V.73(2-3). – P.235–236.
246. Ono, H. Circular muscle contraction in the mice rectum plays a key role in morphine-induced constipation [Text] / H. Ono, A. Nakamura, K. Matsumoto, S. Horie. // *J. Neurogastroenterology & Motility*. – 2014. - Vol.26. – P.1396-1407.
247. Paris, J. J. Kappa Opioid Receptor-Mediated Disruption of Novel Object Recognition: Relevance for Psychostimulant Treatment [Text] / J. J. Paris, K. J. Reilley, J. P. McLaughlin // *J Addict Res Ther*. – 2011. - Suppl 4. - P 007.

248. Park, H.S. A highly selective kappa-opioid receptor agonist with low addictive potential and dependence liability [Text] / H.S. Park, H.Y. Lee, Y.H. Kim [et al.] // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2006. – V.16. - P.3609–3613.
249. Pasternak, G.W. Mu opioids and their receptors: evolution of a concept [Text] / G. W. Pasternak, Y.X. Pan // *Pharmacol. Rev.* – 2013. – V.65(4). – P.1257–317;
250. Paul, D. Pharmacological characterization of nalorphine, a kappa 3 analgesic [Text] / D. Paul, C.G. Pick, L.A. Tive, G.W. Pasternak // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1991. – V.257(1). – P.1-7.
251. Peachey, J.E. Clinical observations of agonist-antagonist analgesic dependence [Text] / J. E. Peachey // *Drug Alcohol Depend.* – 1987. – V.20. – P.347–365.
252. Peroutka, S.J. Two distinct central serotonin receptors with different physiological functions / S.J. Peroutka, R.M. Lebovitz, S.H. Snyder // *Science.* – 1981. – V. 212. – P.827-829.
253. Piercey, M.F. Spinal analgesic actions of  $\delta$ -receptor agonists, U-50488H and spiradoline (U-62066) [Text] / M.F. Piercey, F.J. Einspahr // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1989. – V.251. – P.267–271.
254. Pietrzak, R. H. Association of In Vivo Kappa-Opioid Receptor Availability and the Transdiagnostic Dimensional Expression of Trauma-Related Psychopathology [Text] / R. H. Pietrzak, M. Naganawa, Y. Huang [et al] // *JAMA Psychiatry.* – 2014. - V. 71. - № 11. - P. 1262-1270.
255. Porsolt, R.D. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants [Text] / R.D. Porsolt, A. Bertin, M. Jalfre // *Arch Int Pharmacodyn Ther.* – 1977. – V.229(2). – P.327-236.
256. Pranzatelli, M.R. Brainstem serotonergic hyperinnervation modifies behavioral supersensitivity to 5-hydroxytryptophan in the rat / M.R. Pranzatelli, Y.Y. Huang, A.M. Dollison, M. Stanley // *Brain. Res. Dev. Brain Res.* – 1989. – V. 50. – P.89-99.

257. Prus, A. J. Conditioned Place Preference. Chapter 4 [Text] / A. J. Prus, J. R. James, J. A. Rosecrans // *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, 2nd edition, editor: J. J. Buccafusco. – Boca Raton.: CRC Press, 2008. – P. 59-77.
258. Pu, X. C. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*) [Text] / X. C. Pu, P. T. Wong, P. Gopalakrishnakone // *Toxicon*. – 1995. – V. 33. - № 11. – P. 1425-1431.
259. Pugsley, M.K. Spiradoline, a kappa opioid receptor agonist, produces tonic- and use-dependent block of sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes [Text] / M.K. Pugsley, E.J. Yu, A.L. Goldin // *Gen Pharmacol.* – 2000. – V.34(6). – P.417-427.
260. R. M. Rodriguiz, W. C. Wetsel. Assessments of Cognitive Deficits in Mutant Mice [Text] / R. M. Rodriguiz, W. C. Wetsel // Chapter 12. *Animal Models of Cognitive Impairment*, edited by E. D. Levin, J. J. Buccafusco. - Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2006. – P. 223–282.
261. Rawl, S. M. Opioid, cannabinoid, and transient receptor potential (TRP) systems: effects on body temperature [Text] / S. M. Rawl, K. Benamar // *Front Biosci (Schol Ed)*. – 2011. – V. 3. – P. 822–845.
262. Rawls, S.M. Peripheral kappa-opioid agonist, ICI 204448, evokes hypothermia in cold-exposed rats [Text] / S. M. Rawls, Z. Ding, A. M. Gray, A. Cowan // *Pharmacology*. – 2005. – 74. - № 2. – P. 79-83.
263. Renton, P. Novel Dual Action Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitors with  $\mu$ -Opioid Agonist Activity [Text] / P. Renton, B. Green, S. Maddaford [et al.] // *NOpiate ACS Med Chem Lett.* – 2012. – V.30;3(3). – P.227-231.
264. Reynolds, J.E.F. *Martindale-The Extra Pharmacopoeia*. 28th ed, editors J.E.F. Reynolds, A.B. Prasad [Text] / London. - London: The Pharmaceutical Press, 1982. - 1032 pp.
265. Rimoy, G.H. Mechanism of diuretic action of spiradoline (U-62066E)-a kappa opioid receptor agonist in the human [Text] / G.H. Rimoy, N.K. Bhaskar, D.M. Wright, P.C. Rubin // *Br J Clin Pharmacol.* – 1991. – V.32(5). – P.611-615.

266. Rivière, P.J.M. Peripheral kappa-opioid agonists for visceral pain [Text] / P.J.M. Riviere // *Br J Pharmacol.* – 2004. – V.141(8). – P.1331–1334.
267. Roerig, S.C. Development of tolerance to respiratory depression in morphine- and etorphine-pellet-implanted mice [Text] / S.C. Roerig, J.M. Fujimoto, D.G. Lange // *Brain Res.* – 1987. – V.6. – Supp 400(2). – P.278-84.
268. Rusovici, D.E. Kappa-opioid receptors are differentially labeled by arylacetamides and benzomorphans [Text] / D.E. Rusovici, S.S. Negus, N.K. Mello, J.M. Bidlack // *Eur. J. Pharmacol.* - 2004. – V.485. - № 1. - P. 119-125.
269. Saito, T. CJ-15,208, a novel kappa opioid receptor antagonist from a fungus, *Ctenomyces serratus* ATCC15502 [Text] / T. Saito, H. Hirai, Yoon-Jeong Kim [et al] // *J Antibiot (Tokyo).* – 2002. – V. 55. - № 10. – P 847-854.
270. Salas, S.P. Diuretic effect of bremazocine, a kappa-opioid with central and peripheral sites of action [Text] / S.P. Salas, J. Roblero, H. Ureta, J.P. Huidobro-Toro // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1989. – V.250(3). – P.992-999.
271. Salmi, P. Functional interactions between delta- and mu-opioid receptors in rat thermoregulation [Text] / P. Salmi, J. Kela, U. Arvidsson, C. Wahlestedt // *Eur J Pharmacol.* – 2003. – V. 458. - № 1-2. - P 101-106.
272. Salvadori, S. Role of benzimidazole (Bid) in the delta-opioid agonist pseudopeptide H-Dmt-Tic-NH-CH(2)-Bid (UFP-502) [Text] / S. Salvadori, S. Fiorini, C. Trapella [et al] // *Bioorg Med Chem.* – 2008. – V. 16. - № 6. - P. 3032-3038.
273. Sasmal, P. K. Optimisation of in silico derived 2-aminobenzimidazole hits as unprecedented selective kappa opioid receptor agonists [Text] / P. K. Sasmal , C. V. Krishna, S. S. Adabala, M. Roshaiiah // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* – 2015. – V.25(4). – P.887–892.
274. Satoh, A. Identification of an orally active opioid receptor-like 1 (ORL1) receptor antagonist 4-{3-[(2R)-2,3-dihydroxypropyl]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzimidazol-1-yl}-1-[(1S,3S,4R)-spiro[bicyclo[2.2.1]heptane-2,1'-cyclopropan]-3-ylmethyl]piperidine as clinical candidate [Text] / A. Satoh, T. Sagara, H. Sakoh [et al] // *J Med Chem.* – 2009. – V. 52. – № 14. – P. 4091-4094.

275. Schmidt, W.K. Nalbuphine [Text] / W.K. Schmidt, S.W. Tam, G.S. Shotzberger [et al.] // Drug Alcohol Depend. – 1985. – V.14(3-4). – P.339-362.
276. Scopes, D. I. New kappa-receptor agonists based upon a 2-[(alkylamino)methyl]piperidine nucleus [Text] / D. I. Scopes, N. F. Hayes, D. E. Bays [et al.] // J Med Chem. – 1992. - V. 35. - № 3. - P. 490-501.
277. Scott, V. Dehydration-induced modulation of kappa-opioid inhibition of vasopressin neurone activity [Text] / V. Scott, V. R. Bishop, G. Leng, C. H. Brown // J Physiol. – 2009. - V. 587. - Pt 23. - P. 5679-5689.
278. Shabanov, P. D. (2). Behavioral correlations of gradual forced administration of psychoactive drugs [Text] / P. D. Shabanov, A. A. Lebedev // Eksp Klin Farmakol. – 2011. – V. 74. – № 6. – P. 3-9.
279. Shabanov, P. D. (3). The extended amygdala system and self-stimulation of the lateral hypothalamus in rats: modulation with opiates and opioids [Text] / P. D. Shabanov, A. A. Lebedev // Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova. – 2011. – V. 97. – № 2. – P. 180-188.
280. Shabanov, P. D. Participation of GABA- and dopaminergic mechanisms of the bed nucleus of stria terminalis in reinforcing effects of psychotropic drugs mediated via the lateral hypothalamus [Text] / P. D. Shabanov, A. A. Lebedev // Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova. – 2011. – V. 97. – № 8. – P. 804-813.
281. Shabanov, P.D. (1). Significance of CRF and dopamine receptors in amygdala for reinforcing effects of opiates and opioids on self-stimulation of lateral hypothalamus in rats [Text] / P. D. Shabanov, A. A. Lebedev, A. V. Liubimov, V. A. Kornilov // Eksp Klin Farmakol. – 2011. – V. 74. – № 7. – P. 3-8.
282. Shabanov, P.D. Significance of CRF and dopamine receptors in amygdala for reinforcing effects of opiates and opioids on self-stimulation of lateral hypothalamus in rats [Text] / P.D. Shabanov, A.A. Lebedev, A.V. Liubimov, V.A. Kornilov // Eksp Klin Farmakol. – 2011. – V.74. - №7. P. 3-8.
283. Shim, J. Consensus 3D model of  $\mu$ -opioid receptor ligand efficacy based on a quantitative Conformationally Sampled Pharmacophore [Text] / J. Shim, A. Coop, A.D. Jr. MacKerell // J Phys Chem B. – 2011. – V.9;115(22). – P.7487-7496.

284. Shippenberg, T.S. Dynorphin and the Pathophysiology of Drug Addiction [Text] / T.S. Shippenberg, A. Zapata, V.I. Chefer // *Pharmacol. Ther.* - 2007. – 116. - № 2. - P.306-321.
285. Shu, H. High-dose pentazocine antagonizes the antinociception induced by high-dose morphine [Text] / H. Shu, Z. Wang, F. Ye [et al] // *Life Sciences.* – 2015. – V. 130. – P. 1–6.
286. Shu, H. Pentazocine-induced antinociception is mediated mainly by mu-opioid receptors and compromised by kappa-opioid receptors in mice [Text] / H. Shu, M. Hayashida, H. Arita [et al] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2011. – V. 338. – P. 579–587.
287. Shuster, S.J.. The kappa opioid receptor and dynorphin co-localize in vasopressin magnocellular neurosecretory neurons in guinea-pig hypothalamus [Text] / S.J. Shuster, M. Ried, X. Li [et al] // *Neuroscience.* – 2000. – 96. – P. 373–383.
288. Skorupska, M. Some central effects of opioid antagonists. Part I [Text] / M. Skorupska, R. Langwiński // *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy.* – 1989. – 41(5). P. –401-411.
289. Smith, M. A. Interactions between opioids and cocaine on locomotor activity in rats: influence of an opioids relative efficacy at the mu receptor [Text] / M. A. Smith, K. A. Gordon, C. K. Craig, [et al] // *Psychopharmacology.* – 2003. – V. 167. – P. 265–273.
290. South, S.M. Apparent insensitivity of the hotplate latency test for detection of antinociception following intraperitoneal, intravenous or intracerebroventricular M6G administration to rats [Text] / S. M.South, M. T.Smith // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1998. – V. 286(3). – P.1326-1332.
291. Spasov, A. A., Grechko OIu, Shtareva DM. Kappa-opioid receptor: molecular structure and function / A. A. Spasov, O. Iu. Grechko, D. M. Shtareva // *Eksp Klin Farmakol.* – 2014. – V. 77. – № 11. - P. 27-35.
292. Stachura, Z. The influence of the  $\epsilon$  agonist spiradoline (U62066E) on the analgesic activity of some opioids at the spinal level [Text] / Z. Stachura, Z.S. Herman // *Pol. J. Pharmacol.* - 1994. – V.46. – P.37–41.

293. Stein, C. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids [Text] / C. Stein, M. Schäfer, H. Machelska // *Nature Med.* – 2003. – V.9(8). – P.1003-1008.
294. Stoker, A. The Intracranial Self-Stimulation Procedure Provides Quantitative Measures of Brain Reward Function [Text] / A. Stoker, A. Markou // *Neuromethods.* - 2011. - P.307-331.
295. Stolerman, I. Encyclopedia of psychopharmacology, edited by Ian Stolerman [Text] / Berlin.: Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. KG, 2010. - 1918 pp.
296. Su, M.T. Blockade of the development of morphine tolerance by U-50,488, an AVP antagonist or MK-801 in the rat hippocampal slice [Text] / M.T. Su, W.B. Lin, W.M. Lue [et al] // *Br J Pharmacol.* – 1998. – V. 123. – P. 625-630.
297. Takemoto, H. Inhalation administration of the sesquiterpenoid aristolene-1(10)-en-9-ol from *Nardostachys chinensis* has a sedative effect via the GABAergic system [Text] / H. Takemoto, M. Ito, Y. Asada, Y. Kobayashi // *Planta Med.* – 2015. – V. 81. - № 5. – P. 343-347.
298. Talley, N.J. Asimadoline, a kappa-opioid agonist, and satiation in functional dyspepsia [Text] / N.J. Talley, R.S. Choung, M. Camilleri [et al] // *Aliment. Pharmacol.* - 2008. - Vol. 27. № 11. –P.1122-1131.
299. Tetsuko, O. Rabbit vas deferens: a specific bioassay for opioid kappa-receptor agonists [Text] / O. Tetsuko, N. Kazuko, S. Mitsuaki [et al.] // *European Journal of Pharmacology* – 1980. – V.73. – P.235-236.
300. Traynor, J.R.  $\delta$ -Opioid receptor subtypes and cross-talk with  $\mu$ -receptors [Text] / J.R. Traynor, J. Elliott // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1993. – V.14. - P.84–86;
301. Trifilieff, P. Kappa-Opioid Receptor Signaling in the Striatum as a Potential Modulator of Dopamine Transmission in Cocaine Dependence [Text] / P. Trifilieff, D. Martinez // *Front Psychiatry.* – 2013. – V. 4. - №44. – P. 1-12.
302. Tsukahara-Ohsumi, Y. The kappa opioid receptor agonist SA14867 has antinociceptive and weak sedative effects in models of acute and chronic pain [Text] /

Y. Tsukahara-Ohsumi, F. Tsuji, M. Niwa, T. Hata, M. Narita, T. Suzuki, M. Sasano, H. Aono // *European Journal of Pharmacology*. – 2011. – V. 671. – P.53–60.

303. Twycross, R.G. Control of Alimentary Symptoms in Far Advanced Cancer [Text] / R.G. Twycross, S.A. Lack // London: Churchill Livingstone. – 1986. – V. 93. - P. 166–207.

304. Umbricht, A. Effects of high-dose intravenous buprenorphine in experienced opioid abusers [Text] / A. Umbricht, M.A. Huestis, E.J. Cone, K.L. Preston // *J Clin Psychopharmacol*. – 2004. – V.24(5). – P.479-487.

305. Vakhitova, Iu. V. Ladasten induces the expression of genes regulating dopamine biosynthesis in various structures of rat brain [Text] / Iu. V. Vakhitova, R. S. Iamidanov, S. B. Seredinin // *Eksp Klin Farmakol*. – 2004. – V. 67. – № 4. – P. 7-11;

306. Van Ree, J.M. Opioids, reward and addiction: An encounter of biology, psychology, and medicine [Text] / J. M. Van Ree, M. A. Gerrits, L. J. Vanderschuren // *Pharmacol Rev*. – 1999. – V. 51. - P. 341-396.

307. Van't Veer, A. Role of kappa-opioid receptors in stress and anxiety-related behavior [Text] / A. Van't Veer, W. A. Carlezon // *Psychopharmacology (Berl)*. – 2013. – V. 229. - № 3. - P. 435-452.

308. Vanderah, T.W. FE200041 (D-Phe-D-Phe-D-Nle-D-Arg-NH<sub>2</sub>): A Peripheral Efficacious Kappa-Opioid Agonist with Unprecedented Selectivity [Text] / T.W. Vanderah, C.D. Schteingart, J. Trojnar [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2004. - V.310. - P.326-333.

309. Vanderah, T.W. FE200041 (D-Phe-D-Phe-D-Nle-D-Arg-NH<sub>2</sub>): A Peripheral Efficacious Kappa-Opioid Agonist with Unprecedented Selectivity [Text] / T.W. Vanderah, C.D. Schteingart, J. Trojnar [et al] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2004. – 310. – P. 326-333.

310. Varamini, P. Peripherally acting novel lipo-endorphin-1 peptides in neuropathic pain without producing constipation [Text] / P. Varamini, W.H. Goh, F.M. Mansfeld, J.T. Blanchfield [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2013. – V.21. – P.1898–1904.

311. Verheij, M.M.M. Mesolimbic alpha-, but not beta-adrenoceptors control the accumbal release of dopamine that is derived from reserpine-sensitive storage vesicles [Text] / M.M.M. Verheij, A.R. Cools // *Neuroscience*. – 2009. – V. 162. - № 4. – P. 1163-1173.

312. Vonvoigtlander, P.F. Kappa opioid analgesia is dependent on serotonergic mechanisms [Text] / P. F. Vonvoigtlander, R. A. Lewis, G. L. Neff // *J Pharmacol Exp Ther*. – 1984. – V. 231. - № 2. - P. 270-274.

313. Wadenberg, M.L. A review of the properties of spiradoline: a potent and selective kappa-opioid receptor agonist [Text] / M.L. Wadenberg // *CNS Dr. Rev.* - 2003. – Supp 9(2). – P.187-201.

314. Walker, E.A. Opioid antagonists differ according to negative intrinsic efficacy in a mouse model of acute dependence [Text] / E. A. Walker, S. N. Sterious // *Br J Pharmacol*. – 2005. - V. 145. - P. 975-983.

315. Walsh, S.L. Enadoline and butorphanol: evaluation of kappa-agonists on cocaine pharmacodynamics and cocaine self-administration in humans [Text] / S.L. Walsh, B. Geter-Douglas, E.C. Strain, G.E. Bigelow // *J Pharmacol Exp Ther*. – 2001. - Supp 299(1). – P.147-58.

316. Wang, Y.H. The role of kappa-opioid receptor activation in mediating anti-nociception and addiction / Y.H. Wang, J.F. Sun, Y.M. Tao [et al.] // *Acta. Pharmacol. Sin.* – 2010. – Vol. 31. – № 9. – P.1065-1070.

317. Warburton, D. M. Commentary on: “Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse.” *Psychopharmacologia*. – 1968 [Text] / D. M. Warburton // *Psychopharmacology*. – 2002. – V. 163. - № 1, - P. 4-8.

318. Werkheiser J. L. Nalfurafine, the kappa opioid agonist, inhibits icilin-induced wet-dog shakes in rats and antagonizes glutamate release in the dorsal striatum [Text] / J. L. Werkheiser, S. M. Rawls, A. Cowan // *Neuropharmacology*. – 2007. – V. 52. - № 3. – P. 925–930.

319. White, K. L. The G-protein biased  $\kappa$ -opioid receptor agonist RB-64 is analgesic with a unique spectrum of activities in vivo [Text] / K. L. White, J. E. Robinson, H. Zhu [et al] // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2015. - V. 352. - № 1. - P. 98-109.
320. Wikström, B. Kappa-opioid system in uremic pruritus: multicenter, randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical studies [Text] / B. Wikström, R. Gellert, S.D. Ladefoged [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2005. – V.16. – P.3742–3747.
321. Woods, L.A. The pharmacology of nalorphine (N-allylnormorpine) [Text] / L.A. Woods // *Pharmacological Reviews.* - 1956. - V.8(2). - P.175-198;
322. Xin, L. Body temperature and analgesic effects of selective mu and kappa opioid receptor agonists microdialyzed into rat brain [Text] / L. Xin, E. B. Geller, M. W. Adler // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1997. – V. 281. - № 1. – P. 499-507.
323. Yakimova, K.S. Neuronal basis for the hyperthermic effect of mu-opioid agonists in rats: decrease in temperature sensitivity of warm-sensitive hypothalamic neurons [Text] / K. S. Yakimova, H. Sann, F. K. Pierau // *Neurosci Lett.* – 1996. – V. 218. - № 2. – P. 115-108.
324. Zhou, L. Development of functionally selective, small molecule agonists at kappa opioid receptors [Text] / L. Zhou, K.M. Lovell, K.J. Frankowski [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Supp 288(51). – P.36703-36716.
325. Zhu, J. Activation of the Cloned Human Kappa Opioid Receptor by Agonists Enhances [35S]GTP $\gamma$ S Binding to Membranes: Determination of Potencies and Efficacies of Ligands [Text] / J. Zhu, Lai-Yi Luo, Jian-Guo Li [et al] // *J Pharmacol and Exper Ther.* – 1997. - V. 282. - № 2. – P. 676-684.
326. Zhuang, Z.Y. Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization [Text] / Z.Y. Zhuang, H. Xu, D.E. Clapham, R.R. Ji // *J Neurosci.* – 2004. – V.24. – P.8300-8309.