

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

Лифанова Юлия Викторовна
**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ТВЕРДОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ
НОВОГО К-ОПИОИДНОГО АГОНИСТА РУ-1205**

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Спасов Александр Алексеевич –
доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН, заслуженный деятель науки РФ

Научный консультант:

Бугаева Любовь Ивановна –
доктор биологических наук

Волгоград, 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ СМЕЩЁННЫХ АГОНИСТОВ КАППА-ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ	10
1.1. Физиологическая роль, строение, локализация и функции каппа-опиоидных рецепторов	11
1.2. Лиганды каппа-опиоидных рецепторов	17
1.3. Применение агонистов каппа-опиоидных рецепторов в клинической практике	23
1.4. Новые направления разработки агонистов каппа-опиоидных рецепторов. Смещенные агонисты. Роль β -аррестинового пути и MAP-киназы в формировании побочных эффектов агонистов каппа-опиоидных рецепторов	24
1.5. Поиск агонистов каппа-опиоидных рецепторов среди производных бензимидазола	27
1.6. Фармакологические свойства соединений из числа N ⁹ -замещенных имидазо[1,2-а]бензимидазола	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
ГЛАВА 3. АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1205 В ВИДЕ АКТИВНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ И ГРАНУЛЯТА ТАБЛЕТОК В ТЕСТЕ <i>IN VIVO</i> НА МОДЕЛИ СОМАТОГЕННОЙ БОЛИ	60
ГЛАВА 4. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1205 С АДЬЮВАНТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ НА МОДЕЛИ СОМАТОГЕННОЙ БОЛИ	64
ГЛАВА 5. АВЕРСИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ АФС РУ-1205	72
ГЛАВА 6. ОБЩЕТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РУ-1205	74
6.1. Острая токсичность соединения РУ-1205	74
6.2. Хроническая токсичность соединения РУ-1205 в виде активной фармацевтической субстанции в экспериментах на крысах	79
6.3 Хроническая токсичность соединения РУ-1205 в виде гранулята таблеток в экспериментах на кроликах	99
ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ АФС РУ-1205 НА ПРОЦЕССЫ РЕПРОДУКЦИИ.....	113
7.1. Влияние на генеративную функцию	113
7.2. Эмбрио- и фетотоксическое действие изучаемого соединения.....	121
ГЛАВА 8. ВЛИЯНИЕ АФС РУ-1205 НА ГЕНОМ (ДНК-КОМЕТ ТЕСТ).....	131
ГЛАВА 9. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	136

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	158
ВЫВОДЫ.....	160
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	162
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	163
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	165

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Для терапии выраженного болевого синдрома применяют опиоидные анальгетики (морфина гидрохлорид, тримеперидин, фентанил и др.) (Осипова Н.А., Абузарова Г.Р., 2010; Manjunath A.K., Bloom D.A., 2023). Кратковременный прием препаратов данной группы сопровождается рядом побочных эффектов, среди которых: угнетение дыхания, гипотония, дискинезия, мышечная ригидность. Хронический прием опиоидных анальгетиков сопровождается развитием наркотической зависимости (аддикции), что является социально значимой проблемой, так как за 10 лет уровень смертности только в США от опиоидов увеличился в 4 раза (Lyden J., Binswanger I.A., 2019). Общее количество опиоидов в миллиграммах морфина (ММЕ), прописываемых в США в год, с 1999 г. почти утроилось (Брюн Е.А., Агибалова Т.В., 2019; CDC Clinical Practice Guideline for Prescribing Opioids for Pain, 2022). Сильнодействующие обезболивающие препараты, содержащие в составе неселективные агонисты опиоидных рецепторов, в Российской Федерации согласно ФЗ № 305 отнесены ко II списку и имеют ряд ограничений для отпуска. Для пациентов, нуждающихся в непрерывном (паллиативном) применении опиоидов, их доступность резко уменьшается (Петров В.И., Каминская И.А., Божко Н. К., 2016).

С целью снижения частоты развития побочных эффектов, вызванных приемом неселективных агонистов опиоидных рецепторов (ОР), ведется разработка новых лекарственных форм известных препаратов, а также новых соединений, проявляющих обезболивающую активность (Хныченко Л.К., Шабанов П.Д., 2021; Иванова Е.А., Воронина Т.А., Коробов Н. В.и др., 2022).

Многообещающей альтернативой общеизвестным опиоидам являются смещенные агонисты каппа-опиоидных рецепторов (КОР); эти агенты обладают выраженными анальгетическими свойствами, сниженным профилем побочных эффектов и могут применяться перорально (Lazenka M.F., 2022). Необходимость в обезболивающих препаратах, не вызывающих зависимости, очевидна. Разработка опиоидного анальгетика без наркотического потенциала является крайне актуальной задачей (Wang S., 2019; Faouzi A., Varga B.R., 2020). Её решение и внедрение в практическое здравоохранение КОР способно существенно повысить качество жизни больных и снизить социальные потери, связанные с наркотической зависимостью.

Степень разработанности темы

Опиоидные анальгетики являются наиболее широко назначаемыми лекарственными препаратами для терапии острой и хронической боли средней и высокой интенсивности (послеоперационной, неврологической, онкологической и др.) (Manjunath A.K., Bloom D.A., 2023).

В ходе программы по созданию анальгетиков с минимальными морфиноподобными побочными эффектами были синтезированы препараты смешанного действия: агонисты-антагонисты опиоидных рецепторов. Буторфанола тартрат (17-циклобутилметил-3,14-дигидроморфинан) действует как селективный агонист κ -рецепторов и парциальный агонист μ -рецепторов (Ji J., Lin W., 2020). В терапевтических дозах препарат проявляет свойства анальгетика более мощного, чем морфин (Dinges H.C., Schubert A.K., 2022), однако также способствуют развитию зависимости как в экспериментах на животных, так и у человека, увеличивая экспрессию генов каппа-опиоидных рецепторов в гиппокампе (Tanaka S., Fan L.W., 2005).

Динорфин А, α - и β -неоэндофины, производное эпоксиморфинана – налфлурафин (TRK-820) являются высокоселективным агонистами каппа-опиоидных рецепторов (Chen Y., Chen B., 2023; Wang Y., Zhuang Y., 2023; El Daibani A., Paggi J.M., 2023).

Вовлечение β -аррестина 2 и последующее фосфорилирование p38 играют важную роль в вызывании дисфории при действии агонистов, связанных с каппа-опиоидными рецепторами на центральную нервную систему (ЦНС) (Gross J.D., 2019; Faouzi A., Varga B.R., 2020). Данные побочные эффекты, такие как седативный эффект, тревога и депрессия, ограничивают применение этих агонистов в клинической практике. Предполагается, что функционально селективные агонисты каппа-ОР, которые способны избирательно активировать передачу сигналов G-белка без участия p38 α MAP-киназы, могут иметь терапевтический потенциал в качестве анальгетиков или использоваться как адьюванты для усиления действия других опиоидных анальгетиков, таких как морфин (Faouzi A., Varga B.R., 2020).

Цель исследования

Экспериментальное изучение фармакологических и токсикологических свойств твердой лекарственной формы нового каппа-опиоидного агониста, производного бензимидазола – соединения РУ-1205.

Задачи исследования

1. Изучение анальгетической активности соединения РУ-1205 в форме активной фармацевтической субстанции (АФС) и гранулята таблеток в тестах *in vivo* при однократном введении.

2. Определение механизма опиоидного действия активной фармацевтической субстанции РУ-1205 *in vivo* с использованием антагониста центральных опиоидных рецепторов.
3. Исследование коанальгетических свойств активной фармацевтической субстанции РУ-1205 с адьювантными препаратами.
4. Изучение аддиктивных свойств активной фармацевтической субстанции РУ-1205.
5. Определение острой токсичности твёрдых лекарственных форм соединения РУ-1205.
6. Исследование хронической токсичности твёрдых лекарственных форм соединения РУ-1205.
7. Определение репродуктивной токсичности АФС РУ-1205, включая изучение влияния на генеративную функцию и исследование эмбрио- и фетотоксического действия вещества.
8. Изучение ДНК-повреждений под действием АФС РУ-1205 методом щелочного электрофореза отдельных клеток (тест ДНК-комет).

Научная новизна

Впервые изучено коанальгетическое взаимодействие АФС РУ-1205 с различными группами адьювантных препаратов [агонистом альфа-адренорецепторов, антагонистом дофаминовых рецепторов, агонистами гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), м-холиноблокатором, неизбирательным ингибитором нейронального захвата моноаминов, блокатором натриевых каналов ЦНС] и более подробно определен механизм фармакологического взаимодействия. Впервые экспериментально подтверждено отсутствие у соединения РУ-1205 аверсивных/аддиктивных свойств и выдвинуто предположение о влиянии на р38-МАРК киназу. Впервые проведено расширенное изучение токсикологических свойств соединения из числа N9-замещенных имидазо[1,2-а]бензимидазола в твердой лекарственной форме (хронической токсичности на двух видах животных, влияние на генеративную функцию, эмбрио- и фетотоксическое действие, а также влияние на геном отдельных клеток).

Теоретическая и практическая значимость работы

Оценены фармакологические и токсикологические свойства агониста каппа-опиоидных рецепторов – твердой лекарственной формы соединения РУ-1205. Выявленный анальгетический эффект изучаемого соединения сопоставим с препаратами сравнения. Клонидин и мидазолам усиливают обезболивающее действие активной фармацевтической субстанции РУ-1205, в то время как атропин, amitриптилин и карбамазепин снижают. Габапентин, галоперидол, метоклопрамид и диазепам не изменяют анальгетических свойств каппа-агониста. Определены параметры острой токсичности (в диапазоне доз 10–5 000 мг/кг)

активной фармацевтической субстанции и гранулята таблеток соединения РУ-1205. Изучаемое соединение относится к классу малотоксичных веществ. При хроническом, трехмесячном его введении крысам и кроликам обоего пола в дозах 5 и 50 мг/кг не отмечено необратимых патологических изменений в клинических, лабораторных и морфологических показателях систем органов животных. По результатам исследования влияния соединения РУ-1205 в дозах 5 и 500 мг/кг на процессы репродукции крыс обоего пола патологического воздействия не отмечено. АФС РУ-1205 в диапазоне доз 5–500 мг/кг не влияет на геном отдельных клеток крыс при внутрижелудочном введении в тесте ДНК-комет. Принимая во внимание полученные результаты, для соединения РУ-1205 определены максимальная рекомендованная начальная доза (МРНД) и фармакологически активная доза (ФАД) для проведения клинических исследований.

Методология и методы исследования

Для изучения ноцицептивной активности его коанальгетического взаимодействия с адьювантными препаратами *in vivo* активной фармакологической субстанции РУ-1205 и гранулята таблеток использовались рекомендованные модели соматогенной боли (Воронина Т.А., Гузевых Л.С., 2012) (отдергивания хвоста от теплового излучения, горячая пластина). Для оценки положительно-подкрепляющего/наказующего эффекта соединения РУ-1205 использовали тест условного рефлекса избегания места (УРИМ) с ингибитором р38 МАРК-киназы – соединением SB203580. Изучение острой и хронической токсичности проводили согласно методическим рекомендациям по изучению общетоксического действия лекарственных средств (Арзамасцев Е.В., Березовская И.В., Верстакова О.Л. и др., 2012). Исследование параметров специфической токсичности АФС РУ-1205 проводили согласно методическим рекомендациям по изучению репродуктивной токсичности лекарственных средств (Дурнев А.Д., Смольникова Н.М. и др., 2012), а также рекомендациям по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток в фармакологических исследованиях (Дурнев А.Д., Меркулов В.А., Жанатаев А.К. и др., 2012).

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась следующими пакетами программ: GraphPad Prism7.0 (GraphPad, США); OriginPro 8 (OriginLab, США); Statistica 10.0 (Dell, США), а также программных продуктов Excel из пакета Office XP (Microsoft, США).

Реализация результатов исследования

Полученные данные о фармакологических и токсикологических свойствах каппа-опиоидного агониста – соединения РУ-1205 в твердой лекарственной форме внедрены

в научно-исследовательскую работу отдела экспериментальной фармакологии и токсикологии Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, включены в учебно-методический комплекс, реализуемый на кафедрах ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России: фармакологии и биоинформатики, фармацевтической, токсикологической химии, фармакогнозии и ботаники, а также организации фармацевтического дела, фармацевтической технологии и биотехнологии.

Положения, выносимые на защиту

1. На модели соматогенной боли соединение РУ-1205 в виде гранулята таблеток в дозе 5 мг/кг (в пересчете на АФС) проявляет анальгетическую активность, равную тримеперидину (1 мг/кг).

2. В тесте отдергивания хвоста от теплового излучения (tail flick) анальгетическая активность соединения РУ-1205 в виде АФС (5 мг/кг) изменялась при совместном введении с некоторыми адьювантными препаратами; усиление обезболивающих свойств отмечено в комбинациях с клонидином (1 мг/кг) и мидазоламом (0,3 мг/кг), ослабление – с атропином (2,7 мг/кг), amitриптилином (3 мг/кг) и карбамазепином (15 мг/кг).

3. Изученные общетоксические свойства соединения РУ-1205 при однократном внутрижелудочном введении мышам и крысам позволяют отнести АФС и гранулят таблеток к 3-му умеренно опасному классу (согласно ГОСТ 12.1.007-76). При хроническом (3 месяца) пероральном введении АФС и ГТ РУ-1205 в дозе 5 мг/кг крысам и кроликам обоего пола не отмечено влияния на строение, функции органов и систем животных. В дозе 50 мг/кг – микроскопически фиксировались единичные обратимые изменения печени; АФС и ГТ в дозе 500 мг/кг провоцировали необратимые отклонения в функциях и строении печени. При исследовании параметров специфической токсичности: репродуктивной и при оценке ДНК-повреждений под действием АФС РУ-1205 в диапазоне доз от 5 до 500 мг/кг негативного влияния не зафиксировано.

Степень достоверности и апробация результатов

Согласно сформулированным задачам и в соответствии с актуальными методологическими подходами были получены экспериментальные данные, подвергшиеся тщательной статистической обработке.

Основные положения диссертационной работы представлялись и обсуждались на VII Всероссийской научно-практической конференции «Беликовские чтения» (Пятигорск, 04–05 декабря 2018 года); 77-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград,

24–27 апреля 2019 года); XXIV Региональной конференции молодых ученых и исследователей Волгоградской области (Волгоград, 09 декабря 2019 года); научной конференции «Современное состояние проблем фармации и фармакологии Дальнего Востока России и стран Азиатско-Тихоокеанского региона» в рамках I Дальневосточного международного медицинского конгресса (13 октября 2020 года, г. Хабаровск); 78-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов: «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 14–16 октября 2020 года); XXV Региональной Конференции молодых учёных и исследователей Волгоградской области (Волгоград, 24 ноября 2020 года); 79-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов: «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 21–23 апреля 2021 года); 5-й Российской конференции по медицинской химии с международным участием «Медхим-Россия 2021» (Волгоград, 16–19 мая 2022 года); VI съезде фармакологов России «Смена поколений и сохранение традиций. Новые идеи – новые лекарства» (Московская область, 20–24 ноября 2023 года).

По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, из них 7 в ведущих научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Личный вклад автора

Автор принимал участие в планировании исследования. Личный вклад был реализован в экспериментальной работе. Так, на этапе подготовки был тщательно спланирован объем и ход исследования; при проведении серии опытов автор лично выполнял необходимые манипуляции, фиксируя первичные данные; на заключительном этапе проведены оценка результатов и статистическая обработка. Также был проведен тщательный анализ актуальных источников литературы, а на заключительном этапе написания диссертационной работы сформулированы выводы и положения, выносимые на защиту. Автором лично выполнено оформление рукописи. По результатам исследований написаны и подготовлены для публикации статьи в журналах, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем работы

Диссертация на соискание учёной степени кандидата медицинских наук изложена на 182 страницах машинописного текста. Состоит из введения, 9 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, перечня сокращений и условных обозначений и списка литературы. Работа иллюстрирована 27 рисунками и 72 таблицами. Библиографический указатель включает 156 источников, из них 67 отечественных, 89 иностранных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ СМЕЩЁННЫХ АГОНИСТОВ КАПША-ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Острый болевой синдром требует немедленного купирования и, зачастую, госпитализации для этиопатогенетической терапии в условиях стационара. Пациенты, имеющие диагноз «полинейропатия», злокачественные новообразования, а также многие другие, требующие паллиативной помощи, чаще всего страдают от хронического болевого синдрома (ХБС). По результатам первого в России эпидемиологического исследования, ХБС встречается у 71,0 % онкологических больных по оценке врачей и у 74,5 % – по самооценке пациентов, при этом треть опрошенных страдают от боли средней и сильной интенсивности (Новиков Г.А., Введенская Е.С., Зеленова О.В. и др., 2018). Частота развития ХБС вне зависимости от диагноза в России варьирует от 13,8 до 56,7 %, составляя в среднем 34,3 случая на 100 человек, при этом более 40 % людей с хронической болью сообщают о серьезном снижении качества жизни (Введенская Е.С., 2022).

Разработки высокоэффективных обезболивающих препаратов ведутся постоянно на протяжении многих лет. В 70-е годы XX века А.В. Вальдман в своей монографии раскрывал нейрофармакологию наркотических анальгетиков (Вальдман А.В., 1972). Опираясь на этот опыт, его последователь Ю.Д. Игнатов стал автором фундаментальных концепций нейрофармакологии боли, определил вклад опиоидных рецепторов, а также неопиатных нейромедиаторных систем в регуляцию обезболивания (Соколов А.Ю., Игнатов Ю.Д., 2010). Э.Э. Звартау обозначил психофармакологические аспекты токсикоманий, разработал концепцию роли подкрепляющих систем мозга в генезе лекарственной зависимости (аддиктивного потенциала) (Вальдман А.В., Бабаян Э.А., Звартау Э.Э., 1988), а также описал проблему социально-значимых инфекционных заболеваний, ассоциированных с наркопотреблением, и меры их профилактики (Крупницкий Е.М., Блохина Е.А., Звартау Э.Э. и др., 2020). Под руководством Т.А. Ворониной разработаны нейротропные лекарственные средства, в том числе с обезболивающей активностью, и подходы к их изучению (Иванова Е.А., Воронина Т.А., Коробов Н. В. и др., 2022).

Опиоидные анальгетики являются наиболее широко назначаемыми лекарственными препаратами для терапии острой и хронической боли средней и высокой интенсивности (послеоперационной, неврологической, онкологической и др.) (Manjunath A.K., Bloom D.A., 2023). Общее количество опиоидов в миллиграммах морфина (ММЕ), прописываемых в год в США, с 1999 г. почти утроилось (Annual Surveillance Report, 2019). Однако их прием

сопровождается нежелательными побочными эффектами, что ограничивает их назначение, а формирование зависимости ведет к потреблению в немедицинских целях.

1.1. Физиологическая роль, строение, локализация и функции каппа-опиоидных рецепторов

Обезболивающий эффект от приема опиатов опосредуется тремя типами рецепторов. В анальгезии задействованы μ -опиоидный рецептор (MOP), δ - (DOP) и κ - (KOP). Ноцицептиновый опиоидный пептидный рецептор (nociceptin opioid peptide receptor; NOP), или рецептор ноцицептина/орфарина (nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) receptor), или опиоидный рецептор каппа типа 3 (каппа-type 3 opioid receptor), согласно руководству IUPHAR/BPS (IUPHAR/BPS Guide to pharmacology) с фармакологической точки зрения не считается опиоидным, так как эффекты при его активации не являются «опиатоподобными» в отношении обезболивания. При этом все перечисленные подтипы являются членами А класса трансмембранных рецепторов, связанных с G-белком (Solomon H. Snyder, 2020; Li Z., Liu J., Dong F., 2023; El-Atawneh S., Goldblum, 2023). Из опиоидных анальгетиков наиболее часто используются агонисты μ -опиоидных рецепторов (MOA), их применение показано при различных состояниях. К ним относятся: боль (острая и хроническая, в том числе послеоперационная, раковая и т.д.), кашель и диарея. При этом наличие выраженных побочных эффектов от приёма MOA ограничивает их применение (рвота, запор, угнетение дыхания, зависимость). Перспективной заменой MOA стали KOA.

Эти соединения проявляют неотличимые анальгетические свойства, но при этом обладают иными (в отличие от MOA) побочными эффектами. Ранние попытки внедрения новых KOA в клиническую практику не увенчались успехом из-за дисфории, седации и галлюцинаций, вызванных приемом данных соединений (Bree D., 2019). Кроме того, недавно удалось разработать периферически ограниченные KOA (не проникающие через гематоэнцефалический барьер) для уменьшения побочных эффектов и токсичности.

Хроническая боль – одна из самых частых причин, по которой пациенты обращаются за медицинской помощью (Rikard S.M., Strahan A.E., 2023). Для терапии при выраженном болевом синдроме используются неселективные агонисты опиоидных рецепторов, в том числе MOA, которые связаны со многими побочными эффектами, в первую очередь с зависимостью. Например, в США, около 115 человек умирают каждый день от передозировки опиоидами (Opioid Overdose, 2019). Необходимость создания обезболивающих препаратов, лишенных наркотического потенциала, неоспорима. Смещенные агонисты каппа-опиоидных рецепторов

были названы наиболее эффективными из опиоидов для ослабления висцеральной боли и не вызывали зависимости (Beck T.C., 2019).

Каппа-опиоидный рецептор принадлежит к А классу суперсемейства метаботропных G-белок-сопряженных рецепторов, включающих также в себя М-холинорецепторы, адренорецепторы, дофаминовые, гистаминовые, пуринергические (P_2Y), серотониновые (5-НТ_{1,2,4-7}) рецепторы (Dhaliwal A., Gupta M., 2022). Семь доменов полипептидной цепи (ТМ-1-7) к-рецептора свернуты в α -спираль и интегрированы в клеточную мембрану (Kenakin T., 2007; Dhaliwal A., Gupta M., 2022). NH₂-терминаль, экстрацеллюлярные петли и верхушка ТМ-4 являются участками связывания лигандов, а интрацеллюлярные участки осуществляют взаимодействие с G-белками.

По химической структуре каппа-рецептор человека представляет собой гликопротеин, по длине состоит из 380 аминокислотных остатков и обладает приблизительно 70%-й межвидовой гомологичностью. Имеет два согласованных N-связанных участка гликозилирования на внеклеточной N-терминали и дисульфидный мостик между парой цистеина, связывающий вторую и третью экстрацеллюлярные петли (EL-2, EL-3). Изучение активности динорфина показало необходимость присутствия EL-2 в химерных структурах (Sturaro C., Malfacini D., 2022). По данным исследований, остаток глутамата в положении 297 на EL-3 играет важную роль в связывании каппа-рецепторного антагониста норбиналторфимина (El Daibani A., Paggi J.M., 2023).

Это согласуется с ранее полученными данными о том, что EL-2 и EL-3 определяют высокую аффинность связывания высокоселективных агонистов-лигандов (Kong H. et al., 1994). N-терминальный участок внеклеточной области ранее был идентифицирован как важный для связывания неселективного антагониста налоксона (Satoh M., Minami M., 1995). Два остатка тирозина (87 и 157), расположенные внутриклеточно, подвергаются фосфорилированию тирозин-киназой и отвечают за силу взаимодействия с белками, входящих в состав G-комплекса. Помимо этого, серин (369), расположенный на C-терминали, вместе с тирозином ответственен за сигнальную эффективность рецептора (Bruijnzeel A.W., 2009).

Активация каппа-опиоидного рецептора и диссоциация α , β и γ субъединиц G-белка запускает цепь реакций, включающих аденилатциклазу, цГМФ-фосфодиэстеразу и фосфолипазу С. Альфа-субъединица взаимодействует с гуанозинтрифосфатом (ГТФ), в то время как $\beta\gamma$ частица может оказывать влияние на фосфолипазу С, фосфолипазу А₂, протеинкиназы, GIRK-каналы и кальциевые каналы L-, N- и P/Q типа. Стимуляция к-опиоидных рецепторов приводит к ингибции аденилатциклазной активности и уменьшению продукции цАМФ. Разъединение G $\beta\gamma$ и G αi приводит к активации субсемейства Kir3 GIRK-каналов и увеличению калиевого тока. Есть доказательства того, что G $\beta\gamma$ также связывается с кальциевыми каналами,

что ведёт к уменьшению открытия потенциал-зависимых каналов и ингибции Ca^{2+} токов. Эти механизмы способствуют гиперполяризации клеточной мембраны и блокированию передачи ноцицептивных сигналов в ЦНС, что проявляется как анальгетический эффект к-агонистов. Кроме того, связывание к-рецептора с агонистом может вызывать мобилизацию кальция из внутриклеточных депо и активацию гиперполяризационно-активированных токов в большом ядре шва. КОА также активируют киназные каскады, включая GRK и MAPK: ERK1/2, p38 и JNK (Pan Z.Z., 2003; Sadjja R., 2003; Liu-Chen L.Y., 2004; Bruchas M.R., 2010; James A., Williams J., 2020; Dhaliwal A, Gupta M., 2022).

Считается, что лиганд-индуцированные конформационные изменения к-рецептора, которые вызывают β -аррестин-зависимую активацию p38 MAP-киназы, лежат в основе аверсивных явлений (Bruchas M.R. et al., 2007; James A., Williams J., 2020) в то время как каппа-селективные парциальные агонисты, выражено не активирующие p38 MAPK-киназу, могут быть эффективными анальгетиками без развития дисфории (Bruchas M.R., Chavkin C., 2010; James A., Williams J., 2020).

О существовании трех подтипов к-опиоидных рецепторов стало известно на основе результатов фармакологических исследований и исследований по радиолигандному связыванию, проведенных с 1980 г. (Clark J.A., et al., 1989; Connor M., Kitchen I., 2006; Che T., Majumdar S., 2018). При этом, несмотря на отсутствие различий на молекулярном уровне, κ_1 подтип связывает арилацетамид-подобные агонисты (U69,593, U50,488H, энадолин) и антагонист норбиналторфимин с высокой селективностью и аффинностью, κ_2 подтип предпочтительно связывает бремезоцин, и его аффинность для норбиналторфимина 100-кратно ниже, чем в отношении κ_1 подтипа (Neubert J.K. et al., 2007). Свидетельства существования подтипов к-рецепторов почти полностью получены методом радиолигандного анализа, проведенного с помощью неселективных лигандов. Вследствие этого было выделено 2 основных области связывания, обозначенных κ_1 - и κ_2 -, каждый из которых был также подразделен на участок с высоким (κ_{1a} -, κ_{2a} -) и низким (κ_{1b} -, κ_{2b} -) аффинитетом (Che T., Majumdar S., 2018). Был предложен также третий κ_3 подтип, селективно связывающийся с налоксоном бензилгидразоном (Connor M., Kitchen I., 2006).

Несмотря на то, что по результатам фармакологических исследований постулируется существование нескольких подтипов каппа-рецепторов, клонирован был только 1 подтип (Metcalf M.D., Coop A., 2005). Вероятно, каппа-рецептор является продуктом единственного гена у различных видов позвоночных (Stevens CW, 2015), включающих мышь (Park S.W., Ying He, 2008), крысу (Yakovlev A.G., 1995; Herráez-Baranda L.A., Carretero J., 2005), морскую свинку (Xie G.X., 1994) и человека (Yasuda K., 1994; Xu H., Wang X., 2008).

Недавно было предложено, что каппа-рецепторные подтипы, описанные в литературе, на самом деле могут быть единственным подтипом рецептора в различных аффинных состояниях (Rusovici D.E., Negus S.S., Mello N.K. et al., 2019). Также ранее Pascal G. (2005) сообщалось о существовании гомодимеров, включающих 2 каппа-рецептора, и гетеродимерах, состоящих из каппа- и дельта-рецепторов. Jordan и Devi в 1999 г. предположили, что κ_2 -подтип рецептора может являться результатом гетеродимеризации κ -рецептора. Simonin и др. (2001), используя нокаутированных трансгенных мышей, лишенных опиоидных рецепторов, отдельно и в комбинации, утверждали, что κ_2 -опиоидный рецептор фактически представляет смешанную популяцию μ -, δ - и κ -опиоидных рецепторов и не продукт отличного гена. Позднее (в 2003 и 2003 гг.) Portoghese и Waldhoer в исследованиях с использованием селективных лигандов для δ_1 - и κ_2 -предполагаемых подтипов рецепторов в спинном мозге мыши установили, что эти рецепторы представляют собой δ - κ гетеродимеры. В исследованиях Peng X. и соавт. (2007) было продемонстрировано внутриорганный объединение δ - κ опиоидных спинальных рецепторов с использованием разработанного специального двухвалентного лиганда KDN-21, который способен связываться с гетеродимерами данных рецепторов. Результаты исследований Jordan В.А. и Trapaidze N. (2001) указывают на связь между δ - или κ - рецепторами и β_2 -адренорецепторами.

Согласно современным представлениям о взаимодействии «лиганд – опиоидный рецептор», которое основывается на экспериментально подтвержденном факте, а именно, что агонисты и антагонисты взаимодействуют с различными частями опиоидных рецепторов, можно сказать, что агонисты обычно находятся ближе к межклеточной мембране, тогда как антагонисты проникают внутрь кластера рецептора, в так называемый «карман связывания» (Кузьмина Н.Е., Кузьмин В.С., 2011). Ключевые фармакофорные элементы, необходимые для связывания агонистов, были определены посредством суперпозиции пептидных и непептидных агонистов внутри рецепторного кармана связывания, и включают в себя: положительно заряженный атом азота, взаимодействующий с Asp(3.32) и, для пептидов, с Tyr(3.33); ароматическое кольцо тираминового фрагмента, формирующее взаимодействие с Trp(6.48); центральное гидрофобное ядро, взаимодействующее с аминокислотными остатками TM-6 домена; второе ароматическое кольцо (Ananthan S., Zhang W., 2009).

В ЦНС широко распространены каппа-опиоидные рецепторы. С использованием [3H]U69,593 и [3H]CI-977 в ауторадиографических исследованиях, проведенных среди различных видов животных и у человека, было выявлено, что наибольшая плотность рецепторов типа κ обнаружена в большинстве регионов коры головного мозга, базальных ганглиях, оваре мозга и гипоталамусе (Wannemachera K.M., 2008; Dalefield M.L., Scouller B., 2022).

Кроме того, эксперименты по гибридизации клеток *in situ* подтвердили присутствие иРНК каппа-рецепторов в ядрах головного мозга. Так, КОР экспрессируются в таламусе и гипоталамусе, прилежащем ядре, хвостом ядре, зрительном бугорке (Sato M, Minami M., 2004). Методы иммуноцитохимического анализа также позволили обнаружить каппа-рецепторы, расположенные преимущественно постсинаптически в нейрогипофизе, переднем и среднем мозге (Arvidsson, U., 1995).

В спинном мозге к-рецепторы представлены в незначительном количестве, в основном в поверхностных слоях задних рогов (Dalefield M.L., Scouller B., 2022).

Также большая плотность каппа-рецепторов обнаружена в и вокруг «принципиальных» клеток гиппокампа. При этом была обнаружена способность каппа-агонистов ингибировать возбуждающую нейротрансмиссию в хилусе зубчатой извилины и оказывать влияние на гиппокампальную пластичность (Racz B., 2002; Dalefield M.L., Scouller B., 2022), противосудорожную активность (Loacker et al., 2007).

Центральные каппа-рецепторы вовлечены в механизмы высвобождения различных нейромедиаторов мозга (McGehee D.S., 2008; Dalefield M.L., Scouller B., 2022). Так, каппа-агонист U-50,488 снижает экстрацеллюлярную концентрацию серотонина в дорсальном и срединном ядре шва и прилежащем ядре (Tao et al., 2002). Каппа-агонисты также угнетают высвобождение дофамина из мезолимбических дофаминергических нейронов, поэтому предполагают, что они могут быть вовлечены в модуляцию механизма позитивного подкрепления («награды») (Ford C.P., Beckstead M.J., 2006), и служить новым подходом в лечении злоупотребления психоактивными препаратами (Cahill C.M., Lueptow L., 2022).

Опиоидные рецепторы также экспрессируются на периферических нервных волокнах, вовлеченных в передачу болевого импульса (восходящие чувствительные пути) и его модуляцию (нисходящие ингибирующие пути), в спинном и головном мозге. Опиоидные рецепторы присутствуют на пептидэргических и непептидэргических С-волоках первичных чувствительных афферентных нейронов, где они предотвращают активацию и сенсбилизацию этих волокон и ингибируют высвобождение медиаторов боли (Riviere P.J.-M., 2004; Dalefield M.L., Scouller B., 2022). Также в ходе воспалительного процесса апикально расположенные опиоидные рецепторы ганглиев спинного мозга передают сигнал на периферические чувствительные нервные окончания в участке воспаления (Janson, Stein, 2003).

На периферии каппа-рецепторы обнаружены в желудочно-кишечном тракте, мочевыводящих органах, миометрии матки, плаценте, кардиомиоцитах, лимфоцитах, тромбоцитах, внутреннем ухе, тканях зубов (Dalefield M.L., Scouller B., 2022).

Каппа-опиоидные рецепторы, помимо выраженного антиноцицептивного действия, опосредуют широкий спектр физиологических функций, включая модуляцию питьевого

поведения, водный баланс, потребление пищи, перистальтику ЖКТ, температурный контроль и различные эндокринные функции, а также оказывают фундаментальное действие на когнитивные функции и сознание (Dalefield M.L., Scouller B., 2022).

При активации КОР отмечается подавление зуда при атопическом дерматите, однако точные механизмы, модулирующие эти пути, остаются областью активных исследований (Kim B.S., Inan S., 2022)

Многие каппа-агонисты вызывают выраженное диуретическое действие, за счет центрального механизма угнетения высвобождения вазопрессина (Meariman J.K., Sutphen J.C. 2022).

Располагаясь на лимфоцитах, каппа-рецепторы способны модулировать клеточный и гуморальный иммунитет (Szczepaniak A., Machelak W., 2022). У мышей, лишенных каппа-рецепторов, наблюдаются повышенные уровни иммуноглобулинов IgM, IgG₁, и IgG₂. В клеточной линии макрофагов P388D1 селективный КОА U50,488 ингибирует синтез IL-1 и TNF- α . Также показано, что в культуре человеческих микроглиальных клеток, остро зараженных HIV-1, соединение U50,488 и динорфин A угнетают вирусную экспрессию и препятствуют взаимодействию ВИЧ с иммунными клетками, что позволяет предположить потенциальную роль каппа-агонистов в лечении СПИДа (Szczepaniak A., Machelak W., 2022).

Известно, что эндогенные и экзогенные опиоиды могут влиять на функцию иммунных клеток, включая пролиферацию, созревание, хемотаксис, транспортировку, фагоцитоз, экспрессию цитокинов и хемокиновых рецепторов, синтез и секрецию цитокинов (Machelska H., Celik M.Ö., 2020). По литературным данным, при помощи ПЦР и метода Нозерн-блот мРНК каппа-опиоидного рецептора была обнаружена в лимфоцитах крови (Gaveriaux C., Peluso J., 1995), моноцитах, мононуклеарных клетках периферической крови (PBMCs) и CD4⁺ Т-лимфоцитах здоровых доноров-людей, в PBMCs макак-резусов, а также в крови мышей и иммунных клетках поврежденного нерва (Celik M.Ö., Labuz D., 2016).

По результатам исследований Н. Machelska, показан вклад агонистов опиоидных рецепторов в иммунных клетках в облегчение боли (Machelska H., Celik M.Ö., 2020). Активация рецепторов, экспрессируемых на лейкоцитах, приводила к секреции опиоидных пептидов (β -эндорфин, мет-энкефалин и динорфин A 1-17), которые впоследствии действовали на опиоидные рецепторы периферических нейронов в поврежденной ткани и облегчали боль. Эндогенные лиганды (опиоидные пептиды) опиоидных рецепторов экспрессируются в иммунных клетках, накапливающихся в периферических воспаленных тканях. Коллективом исследователей, возглавляемым М.Ö. Celik показано, что активация всех трех опиоидных рецепторов лейкоцитов экзогенными опиоидами приводит к высвобождению опиоидных пептидов, которые действуют на рецепторы периферических нейронов, уменьшая боль,

(Machelska H., Celik M.Ö., 2020). Это имеет широкое клиническое значение, поскольку большинство болезненных состояний связаны с иммунным ответом, включая воспалительные невропатии, артриты, рак и послеоперационную боль.

Экспрессия κ-рецепторов во внутреннем ухе предполагает, что они могут работать как аудиорецепторы (Vega R., García-Garibay O., 2022).

Сообщается об уменьшении потери тканей пародонта при местном введении каппа-агониста без изменения количества лейкоцитов в месте воспаления у крыс (Pacheco S.M., Queiroz-Junior C.M., 2008).

В результате проведенных исследований учёными китайского университета из г. Фудан было установлено, что активация каппа-опиоидных рецепторов буторфанолом *in vitro* приводит к снижению степени выраженности воспалительного процесса, вызванного липополисахаридами. Также наблюдается усиление экспрессии рецепторов и снижение числа апоптозов в кардиомиоцитах, что подтверждает способность буторфанола оказывать противовоспалительное и противоапоптотическое действие, связанное с активацией каппа-опиоидных рецепторов. Эти результаты могут иметь потенциальное значение для разработки новых методов лечения воспалительных заболеваний и сердечно-сосудистых патологий (Tang W., Luo L., 2021).

1.2. Лиганды каппа-опиоидных рецепторов

Динорфин А является эндогенным лигандом и высокоселективным КОА. Он связывается субнаномолярной аффинностью ($pK_i=8,3-10,8$) с каппа-опиоидными рецепторами, при этом он незначительно активен в отношении всех подтипов опиоидных рецепторов (Chen Y., Chen B., 2023). Также эндогенными лигандами каппа-рецепторов являются α- и β-неоэндофины (Wang Y., Zhuang Y., 2023).

В ходе программы по созданию анальгетиков с минимальными морфиноподобными побочными эффектами были синтезированы препараты смешанного действия агонисты-антагонисты опиоидных рецепторов. Буторфанола тартрат (17-циклобутилметил-3,14-дигидроморфинан) действует как селективный агонист κ-рецепторов и парциальный агонист μ-рецепторов (Ji J., Lin W., 2020). В терапевтических дозах препарат проявляет свойства анальгетика более мощного, чем морфин (Dinges H.C., Schubert A.K., 2022), однако также способствуют развитию зависимости как в экспериментах на животных, так и у человека, увеличивая экспрессию генов каппа-опиоидных рецепторов в гиппокампе (Tanaka S., Fan L.W., 2005).

Первыми соединениями, синтезированными в попытке создания лекарственных препаратов с большей каппа-опиоидной рецепторной селективностью были вещества, которые имели структуру, сходную с молекулой морфина, в связи с чем были названы бензоморфанами. Первые аналоги бензоморфана бремазоцин и циклазоцин, разработанные в 1962 г., являются агонистами каппа-опиоидных рецепторов с выраженной анальгетической и диуретической активностью. Бремазоцин индуцирует периферическую анальгезию за счет активации эндогенной норадренергической системы (Romero T.R., Guzzo L.S., 2012). В отличие от морфина он не вызывает развитие физической и психической зависимости на моделях животных, не угнетает дыхания или участвует в формировании незначительной респираторной депрессии. Было обнаружено, что бремазоцин не вызывает эйфорию, однако обладает способностью вызвать дисфорию, что в значительной мере ограничивает его клиническое использование. Циклазоцин обладает свойствами анальгетика в 40 раз более мощного, чем морфин (Coop A., 2002; Santino F., Gentilucci L., 2023). На основе циклазоцина был разработан препарат 8-карбоксамидоциклозацин (8-САС). Замена 8-гидроксильной группы в молекуле циклозацина на 8-карбоксамидную привела к увеличению продолжительности обезболивающего действия нового соединения по сравнению к циклазоцином в 7 раз (Bidlack J.M., 2002). Способность производных бензоморфана уменьшать самовведение этанола и кокаина в исследованиях на приматах дает основания для их дальнейшего рассмотрения в качестве возможных средств терапии алкогольной и наркотической зависимости (Santino F., Gentilucci L., 2023).

Хотя клиническая разработка производных бензоморфана была прекращена из-за галлюциногенного эффекта и дисфории, получены убедительные свидетельства низкой склонности к развитию наркотической зависимости у пациентов на стадии клинических испытаний. Психоактивные эффекты позволяют использовать их для лечения зависимостей (Santino F., Gentilucci L., 2023). Смещенные (предвзятые) каппа-агонисты могут стать эффективными и безопасными опиоидными анальгетиками, которые не будут угнетать дыхания, вызывать зависимость, а также развитие психомиметических эффектов и дисфории.

Важной структурой, на основе которой позже разрабатывались многие остальные каппа-агонисты, стало первое вещество нового класса селективных каппа-агонистов производных арилацетамидов – U-50,488. Это вещество было синтезировано компанией Upjohn в 1983 г.

Самыми известными были препараты, разработанные компаниями Upjohn в 1992 г. U62066 (спирадолин) и Parke-Davis – PD117302, каждый из которых представлял собой рацемическую смесь двух энантиомеров (Minervini V., Osteicoechea D.C., 2019). Однако было показано, что их (+)-изомеры также имеют сродство к мю-опиоидным рецепторам (Vandeputte M.M., Persson M., 2022), особенно спирадолин, а впоследствии был обнаружен дисфорический

компонент их действия у людей (Wadenberg M.L., 2003). Фураниловое производное PD117,302, названное впоследствии энадолином, также было разработано Parke-Davis в виде (-) энантиомера с высокой селективностью к каппа-рецепторам ($K_i = 0,11$ nM) и высокой антиноцицептивной активностью у грызунов (Hunter et al., 1990, Pugsley M.K., Saint D.A., 2015). В отличие от своих предшественников, энадолин продемонстрировал более выраженное анальгетическое действие. Спирадолин и энадолин также проявляют выраженную эффективность в лечении послеоперационной боли, сравнимую с таковой у морфина (Minervini V., Lu H.Y., 2018).

В экспериментальных исследованиях широко используется соединение U-50,488, несмотря на наличие более селективных каппа-агонистов, таких как U-69,593 (Kopruszinski S.M., Vizin R., 2022). В этом контексте особый интерес представляет новое производное аналога (-)U50,488H, известное под шифром LPK-26. Проведенные лабораторные исследования показали, что данное производное проявляет высокую селективность в отношении каппа-рецепторов ($K_i = 0,64$ nM) и обладает большим анальгетическим эффектом по сравнению с (-)U50,488H и морфином. Так, значения EC50 составляют 0,049 и 0,0084 мг/кг в тестах горячей пластины и укусных корчей соответственно (Тао Y.M., 2008).

Производное эпоксиморфина налфлурафин (TRK-820) является высокоселективным каппа-агонистом (El Daibani A., Paggi J.M., 2023) с выраженным антиноцицептивным эффектом. Предполагается, что TRK-820 является агонистом k_2 и/или k_3 -опиоидных рецепторов (Tsuji M., et al., 2001; Mori T., et al., 2000, 2004). Это вещество вызывает выраженную антиноцицептивную активность у приматов и является намного более эффективным анальгетиком по сравнению с U50,488H у мышей (Endoh T., Matsuura H., 1999; Ко M.-C., 2009). В настоящее время широко исследуется налфлурафин также в качестве противозудного средства (Boehlke C., Joos L., 2023). Стоит отметить, что по результатам однолетнего постмаркетингового исследования в Японии показано, что налфлурафин безопасен и эффективен, не вызывает психомиметических эффектов (Zhou Y., Freeman K., 2022). Показано, что сальвинорин А и налфлурафин уменьшали количество инъекций оксикодона при самовведении у крыс, при этом эффекты каппа-агониста нивелировались предварительным введением μ -BNI (Zamarripa C.A., Naylor J.E., 2022). Было обнаружено, что низкие дозы налфлурафина (10–40 мг/кг) не вызывают развития реакций предпочтения или избегания места, снижения локомоторной активности, нарушения координации (Zhou Y., Freeman K., 2022).

В настоящее время синтетические лиганды κ -рецепторов делятся на два больших класса: лиганды класса арилацетамидов проявляют селективность по отношению к κ_1 подтипу каппа-опиоидных рецепторов, тогда как лиганды класса бензоморфанов селективны по отношению к κ_2 подтипу каппа-рецепторов (Rusovici D.E., 2004).

К сожалению, проникающие в мозг каппа-агонисты, помимо анальгезии, вызывают седацию и дисфорию, что стало причиной непродолжительности развития первого поколения каппа-агонистов. В настоящее время активно развивается направление разработки новой генерации каппа-опиоидных анальгетиков с периферической селективностью (Prisinzano T., Kivell B., 2009). На основе ряда проведенных исследований (Riviere, 2004; Sander-Kliesling, 2002; Joshi S.K. et al., 2000) было подтверждено, что имеет место присутствие механизма периферически-регулируемой опиоидной анальгезии, который действует как на соматическую, так и на висцеральную боль, особенно в случаях воспалительных процессов. Федотоцин [(1R)-1-фенил-1-[(3,4,5-триметокси) бензилоксиметил]-N,N-диметил n-пропиламин был первым каппа-агонистом, который использовался для лечения висцеральной боли в клинических исследованиях. Федотоцин является нетипичным каппа-агонистом со смешанной каппа-/мю-опиоидной активностью, а также с высоким аффинитетом к КОР. Исследования в области эффективности вещества показали его способность устранять боли в области брюшины при вздутии живота и диспепсических расстройствах. Кроме того, было обнаружено, что оно повышает болевой порог на растяжение кишки у пациентов с синдромом раздраженного кишечника. В дополнительных исследованиях было показано, что каппа-агонист ADL-10-0101 демонстрирует высокую эффективность в снижении интенсивности болевого синдрома у пациентов с хроническим панкреатитом. ADL-10-0101 является классическим каппа-избирательным агонистом с периферической селективностью (Delvaux M., 2001, Eisenach et al., 2003). Новый каппа-агонист CR665 в дозе 0,36 мг/кг проявляет анальгетическую активность в тестах висцеральной боли, связанной с растяжением и термической стимуляцией пищевода у экспериментальных животных (Lars A.-N., 2009).

Соединение GR89,696, являющееся одним из наиболее активных каппа-агонистов, проявляет анальгетические свойства при дозировке от 0,00056 до 0,0012 мг/кг (Butelman E.R., 2001; Molenveld P., 2015).

С целью разработки каппа-селективных антагонистов фармакологи начали изучение различных подтипов опиоидных рецепторов еще на ранних этапах. Первоначальные исследования в данной области позволили создать неселективные каппа-антагонисты Mг 2266 и WIN 44,441, также известный как квадазоцин (Zimmerman D.M., Leander J.D., 1990). Первый непептидный селективный каппа-антагонист триэтиленгликоналтрексамина ТЕНА был разработан исследовательской группой Erez (Erez M., Takemori A.E., 1982) и содержал два пространственно связанных налтрексоновых фармакофора; впоследствии он оказался весьма полезным для поиска и разработки новых высокоселективных каппа-антагонистов. Многочисленные структурные модификации промежуточного линкера, включающие различные заместители, длину, подвижность и конформационные изменения, привели к заключению, что

оптимальным промежуточным звеном между 2 фармакофорами является короткое, ригидное, пиррольное кольцо. В 1987 г. Дж. Ловетт и Ф.С. Портогезе представили промежуточный линкер, который послужил основой для разработки новых, высокоселективных каппа-антагонистов – биналторфимина (BNI) и норбиналторфимина (norBNI) (Lovett J.A., Portoghese P.S., 1987).

В 1993 г. группа под руководством Ф.С. Портогезе представила серию 3 амидов на основе фармакофора налтриндола (NTI), которые изменяли селективный дельта опиоидный антагонист налтриндол до селективного каппа-антагониста гуанидиналтриндола (GNTI), превосходящего norBNI по аффинности, селективности, силе действия с показателем pA_2 10.40 на клонированных каппа-рецепторах человека, экспрессированных в культуре клеток CHO (Olmsted S.L., Takemori A.E., 1993, Metcalf M.D., Coop A., 2005). Были синтезированы многочисленные аналоги GNTI, наиболее эффективным и селективным оказалось вещество ANTI.

В 2001 г. исследовательская группа под руководством Дж. Б. Томаса представила селективный каппа-опиоидный антагонист, разработанный на основе фенилпиперидина JD1c (Thomas J.B., 2001). Через несколько лет П. Грундт представил серию аминотетраленовых аналогов, которые оказывали мю- и каппа-селективное действие (Grundt P., 2004).

Антагонисты norBNI, GNTI, JD1c обратимо связываются с каппа-опиоидным рецептором (Metcalf M.D., Coop A., 2005; Munro T.A., Huang X.P., 2013). Группа Б.Р. ди Коста разработала антагонист URH1, способный вызывать необратимую ингибицию связывания [3H] U69,593 с каппа-опиоидными рецепторами (Band L., de Costa B.R., 1990).

Следовательно, важно подчеркнуть, что, несмотря на достигнутые успехи в изучении и разработке средств, взаимодействующих с каппа-опиоидными рецепторами, все еще требуется поиск новых каппа-агонистов, которые бы сочетали высокую эффективность при минимальных побочных эффектах. Это задача, которая остается актуальной и нуждается в дальнейших исследованиях и разработках.

Далее на рисунке 1.1 представлены структуры агонистов каппа-опиоидных рецепторов и родственных соединений.

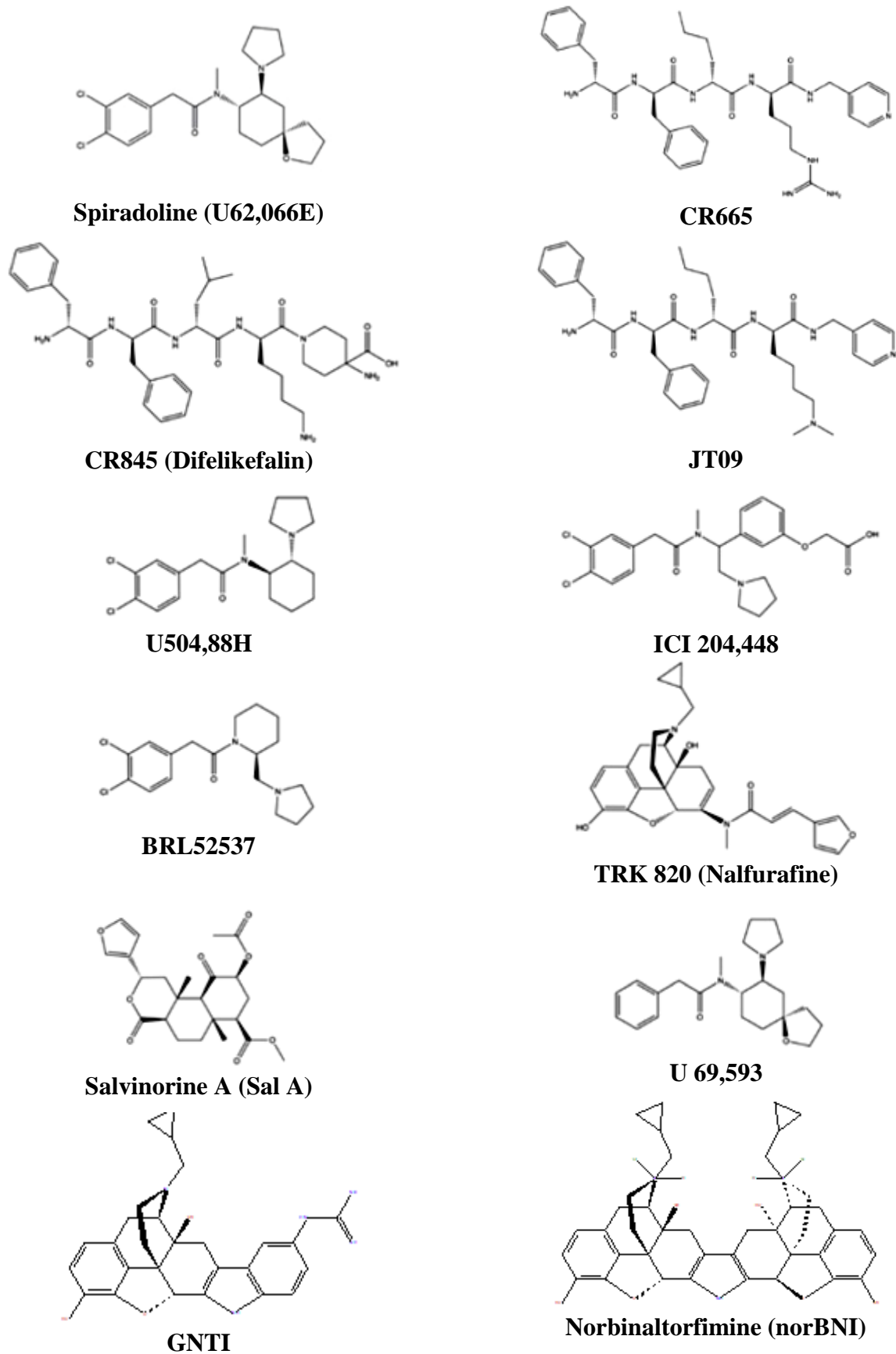


Рисунок 1.1. Соединения CR665, CR845, JT09 и ICI 204,448 являются периферически-селективными агонистами каппа-опиоидов (КОА). Спирадолин, U50,488H, BRL 52537, TRK-820, сальвинорин А и U-69,593 являются центрально-активными КОА

1.3. Применение агонистов каппа-опиоидных рецепторов в клинической практике

С точки зрения клинической проблемы боли и ее облегчения, исследования (Martin L. Dalefield, 2022) свидетельствуют, что каппа-рецепторная система является наиболее перспективной. В настоящее время каппа-агонисты рассматриваются как альтернатива для создания сильнодействующих и безопасных анальгетиков. Отличие каппа-опиоидных рецепторов от мю-рецепторов заключается в том, что агонисты каппа-опиоидных рецепторов не вызывают эйфории и лекарственной зависимости, а также не угнетают дыхательный центр. Таким образом, данные рецепторы представляют собой более безопасный вариант для разработки клинически эффективных препаратов по облегчению боли.

Буторфанол тартрат (буторфанол) является единственным применяемым в клинической практике на территории Российской Федерации агонистом каппа- и мю-опиоидных рецепторов (в меньшей степени). Влияние на мю-рецепторы ограничивает применение буторфанола при кратковременных операциях, а также при черепно-мозговых травмах, так как увеличивается риск респираторной депрессии.

Азимадолин (асимадолин) – новое производное диарицетамидной структуры, является высокоаффинным каппа-агонистом с показателем IC_{50} 1.2 нМ на рекомбинантных каппа-рецепторах человека (Camilleri M., 2008). В 12-недельном клиническом исследовании 596 пациентов с синдромом раздраженного кишечника хроническая терапия азимадолином в дозе 0,5 и 1 мг/кг приводила к адекватному облегчению боли и дискомфорта и увеличению числа «безболевых» дней (Foxh-Orenstein A.E., 2016; Graven-Nielsen C.S., 2023). При подкожном и интратекальном введении он также способен уменьшать тактильную аллодинию после перевязки спинномозговых нервов, что делает его перспективным в лечении нейропатической боли (Caram-Salas N.L., 2007). В открытом доступе имеется информация о 3 завершённых клинических исследованиях (II фаза). Азимадолин применяли при atopическом дерматите для снижения зуда, для лечения синдрома раздраженного кишечника с преобладанием диареи, а также для лечения послеоперационного илеуса (Vakharia PP, 2018).

Дифеликефалин (известный также как CR845, или FE-202845). Является периферическим высокоселективным агонистом KOR. Не вызывает седации, дисфории и галлюцинаций в отличие от других каппа-агонистов: пентазоцина и феназоцина, также разработанных компанией Cara Therapeutics. На данный момент завершено шесть клинических испытаний 3-й фазы. Дифеликефалин применяли для ослабления зуда (в том числе и уремического) у гемодиализных пациентов, а также для общего обезболивания у пациентов, перенёсших абдоминальные оперативные вмешательства. Пероральный прием дифеликефалина

значительно снижал интенсивность зуда у пациентов с хроническим заболеванием почек 3–5-й стадии и с зудом от умеренной до тяжелой степени (Yosipovitch G., Awad A., 2023).

1.4. Новые направления разработки агонистов каппа-опиоидных рецепторов. Смещенные агонисты. Роль β -аррестинового пути и MAP-киназы в формировании побочных эффектов агонистов каппа-опиоидных рецепторов

Смещенные агонисты каппа опиоидного рецептора

Вовлечение β -аррестина 2 и последующее фосфорилирование p38 играют важную роль в вызывании дисфории при действии агонистов, связанных с каппа-опиоидными рецепторами на ЦНС (Gross J.D., 2019; Faouzi A., Varga B.R., 2020). Данные побочные эффекты, такие как седативный эффект, тревога и депрессия, ограничивают применение этих агонистов в клинической практике. Предполагается, что функционально селективные агонисты каппа-ОР, которые способны избирательно активировать передачу сигналов G-белка без участия p38 α MAP-киназы могут иметь терапевтический потенциал в качестве анальгетиков или использоваться как адъюванты для усиления действия других опиоидных анальгетиков, таких как морфин (Faouzi A, Varga BR, 2020).

22-тиоцианатосальвинорин А, или RB-64, был впервые синтезирован в лаборатории доктора Джордана Зявиони как полусинтетическое структурное производное соединения сальвинорина А центральной активности (экстрагированного из растения *Salvia divinorum*) (Xu J., Chen F., 2020). *In vitro* исследования подтверждают, что RB-64 активирует β -аррестин 2, но его главной функцией является высокоэффективное активирование пути G-белка. В том же исследовании антиноцицептивный эффект RB-64 был протестирован на модели с использованием горячей пластины вместе с U69593 и сальвинорином А у нелинейных мышей, нокаутных по гену β -аррестин 2 (β -аррестин 2 KO) и нокаутных по гену каппа-ОР (KOP KO). RB-64 показал значительный и продолжительный анальгетический эффект у мышей дикого типа и β -аррестина 2 KO, в то время как у мышей KOP KO не было обнаружено антиноцицепции, что позволяет предположить, что этот эффект был в основном опосредован через каппа-ОР (Mores K.L., 2019).

В лаборатории доктора Томаса Е. Принсинзано было получено полусинтетическое структурное производное сальвинорина А, известное как *месил сальвинорин В*, в целях улучшения фармакологического профиля первого (Kivell B., 2018). Месил сальвинорин В отличается от сальвинорина А замещением месилатом в положении С-2 на его структурной основе, но при этом сохраняет селективность связывания с KOP (Kivell B., 2018). Исследования

показали, что месил сальвинорин В является полным агонистом KOR с G-смещением и способен индуцировать активацию как β -аррестина 2, так и G-белка *in vitro*. Кроме того, было установлено, что месил сальвинорин В обладает меньшей анальгетической активностью, чем у сальвинорина А, но при этом не вызывает отвращения при тестировании на моделях условно рефлекторного избегания места и не оказывает негативного влияния на двигательную активность на вращающемся стержне. Также отмечено, что месил сальвинорин В значительно сокращает употребление алкоголя у животных с экспериментально вызванным пристрастием (Zhou Y., 2018).

Триазол 1.1 – это соединение, которое было впервые обнаружено в 2013 г. в результате сотрудничества между 5 различными исследовательскими институтами (Zhou L., 2013, Lovell K.M., 2015). Триазол 1.1 является полным агонистом каппа-ОР, который, по сравнению с U50,488H и U69,593, демонстрировал агонизм со смещением в сторону G-белков. Триазол 1.1. проявляет анальгетическую активность, не влияя на локомоторную функцию, в отличие от полных агонистов каппа-ОР. В исследованиях концентрации дофамина в прилежащем ядре (NAcc) триазол 1.1 не влиял на высвобождение дофамина и не вызывал дисфории в отличие от U50,488H (Huskinson S.L., 2020).

б'GNTI. Первоначально синтезированный доктором Филипом С. Портогезе и его исследовательской группой в 2001 г., б'-гуанидинил-17-(циклопропилметил)-6,7-дегидро-4,5 α -эпокси-3,14-дигидрокси-6,7-2',3'-индолморфинан дигидрохлорид, более известный как б'GNTI (Waldhoer M., 2005, Mores K.L., 2019), является производным сильнодействующего селективного антагониста дельта-ОР налтриндола (NTI). Предполагалось, что он действует как мощный селективный лиганд для гетеромеров ДОР-KOR, и было обнаружено, что он по-разному взаимодействует с каппа- и дельта-ОР из-за своей гуанидиновой боковой цепи в б'-положении. Интересно, что близкое производное, известное как 5'-GNTI, оказалось селективным антагонистом каппа-ОР. Недавние исследования показывают, что б'-GNTI является агонистом с предвзятым отношением к KOR с преимущественной активацией G-белка по сравнению с β -аррестином 2 (White K.L., 2014). В суб-мМ диапазоне, б'-GNTI выступает в роли антагониста β -аррестина 2 и не стимулирует его вовлечение в пострецепторный каскад, а также действует как частичный агонист G-белка каппа-ОР в низких концентрациях (мкМ).

Другая группа исследователей (Rives M.-L., 2012) провела анализ уровней интернализации рецепторов под действием различных веществ и использовала это в качестве косвенной меры вовлечения β -аррестина 2. Результаты подтвердили, что б'-GNTI не оказывает значительного воздействия на интернализацию, индуцированную ЕКС KOR, в отличие от соединения U50,488 и ЕКС. Кроме того, было показано наличие у б'-GNTI анальгетического и противовоспалительных эффектов.

Изохинолинон 2.1 – это соединение, которое было впервые выявлено в 2013 г. в результате экспериментов, проведенных двумя группами из Исследовательского института Скриппса и Канзасского университета (Zhou L., 2013). Подобно сальвинорину А, этот агент лишен основного азотного центра, характерного для каркасов низкомолекулярных лигандов каппа-ОР. Сообщается, что изохинолинон 2.1 действует как мощный и высокоселективный агонист каппа-ОР, смещенный в сторону сигнального пути G-белка с минимальным привлечением β -аррестина 2. В данном исследовании была проведена оценка передачи сигналов G-белка и вовлечения β -аррестина 2 в различных клеточных линиях (CHO-hKOR и U2OS-hKOR- β -аррестин 2-EFC или U2OS-hKOR- β -аррестин 2-GFP) (Zhou L., 2013). Помимо этого, было изучено фосфорилирование ERK1/2 как дополнительная мера вовлечения β -аррестина 2.

В 1974 г. группой доктора Пьера Потье был извлечен *коллиболид* из гриба *Collybia maculata* (Basidiomycota). Коллиболид (Колли) относится к классу сесквитерпенов и является натуральным продуктом (Bui A.-M., 1974). В дальнейшем, в 2016 г., исследование демонстрировало потенциал Колли и его диастереоизомеров (9-epi-Colly) в снижении болевых ощущений (Gupta A., 2016). Из-за его структурного сходства с сальвинорином А (распространенный фурил- δ -лактонный мотив) этот агент был протестирован на человеческих опиоидных рецепторах и оказался очень селективным по отношению к каппа-ОР. Колли является высокоселективным агонистом и дозозависимо ингибирует активность аденилатциклазы и фосфорилирование ERK1/2. Предполагается, что Колли действует как предвзятый агонист каппа-ОР, хотя механизм вовлечения β -аррестина 2 остается неизвестным (Gupta A., 2016).

Ингибиторы MAPK-киназы

Как уже отмечалось выше, дисфория развивается из-за вовлечения β -аррестина 2 и последующего фосфорилирования p38 α MAPK-киназы. Для устранения проявления дисфорических расстройств можно использовать два варианта. Во-первых, применение смещенных агонистов каппа-опиоидных рецепторов, способных избирательно активировать передачу сигналов G-белка без последующей активации киназы. Во-вторых, ингибирование p38 α MAPK-киназы напрямую способно снижать проявления аверсии и дисфории.

Так, например, SB203580 – ингибитор p38 α MAPK устраняет дисфорию, вызванную приемом селективного КОА соединения U50,488, однако имеет ряд побочных эффектов, что ограничивает их совместное применение на практике. Снижения обезболивающего эффекта КОА при совместном применении с SB203580 не наблюдается (Bruchas M.R., 2007; Ehrich J.M., 2015).

Исходя из этого, поиск селективных КОА, проявляющих ингибирующее влияние на p38 α митоген-активируемую протеинкиназу является перспективным.

1.5. Поиск агонистов каппа-опиоидных рецепторов среди производных бензимидазола

Согласно научным исследованиям, определено, что большинство препаратов селективного действия, активирующих КОР, представляют собой производные сложных азотсодержащих химических соединений, включающих в себя также конденсированные бензимидазолы. Данный класс соединений известен своими уникальными фармакологическими свойствами и широким спектром действия, что позволяет использовать их в медицинской практике для лечения различных заболеваний и состояний. В связи с этим, исследования, направленные на синтез и изучение данных гетеросистем, имеют большое значение для разработки новых высокоэффективных лекарственных препаратов селективного действия. (Alamgir M. et al., 2007; Di Trana A., 2023). Так, каппа-агонисты относятся к морфинанам – налорфин, буторфанол (Corbett A.D., 2006); производным бензоморфана – циклазоцин, бремасоцин (Bidlack J.M., 2002); арилацетамидам – U50,488, энадолин, GR 89,696 (Butelman E.R., 2001; Wadenberg M.L., 2003).

В существующих литературных данных также содержится информация о наличии высокоэффективного наркотического анальгетика этонитазена, а также его структурных аналогов – клонитазена и нитазена, которые являются производными от бензимидазольных систем (Hunger A., 1960) (Рисунок 1.2).

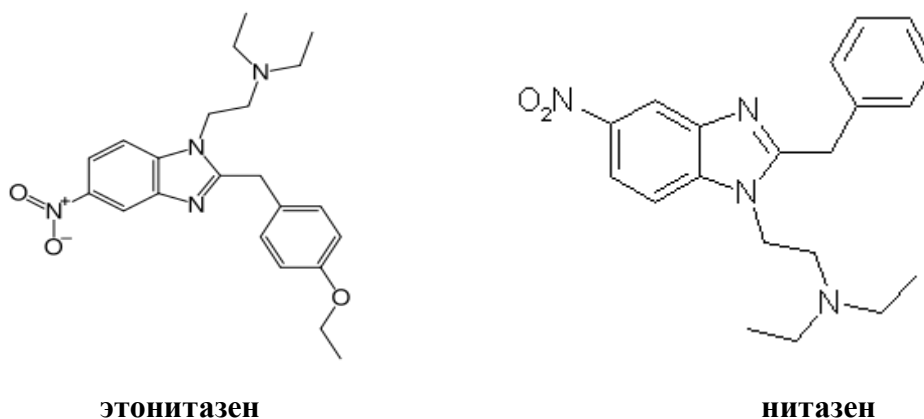
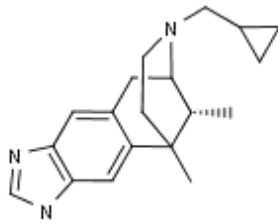


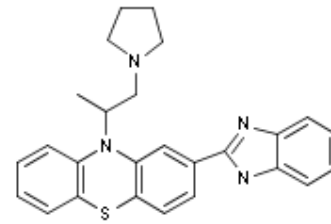
Рисунок 1.2. Химическая структура этонитазена и нитазена

Группа 2-фенилбензимидазолов известна своим выраженным каппа-опиоидным агонистическим действием. В настоящее время идет разработка различных аналогов бензимидазола, включая полные, изоэлектронные и стерические аналоги, с целью создания высокоселективных каппа-агонистов. Одним из таких аналогов является соединение SA14867, также известное как (+)-3-ацетил-6-хлоро-2-[2-(3-(N-(2-этоксиэтил)-N-

изопропиламино)пропокси)-5-метоксифенил]бензотиазолинО,О'-диацетил-L-тарtrat (Tsukahara-Ohsumi Y. et al., 2010; Tsukahara-Ohsumi Y. et al., 2011). Еще одним примером такого аналога является соединение RP-61127, также известное как (2-(2-бензимидазолил)-10-[1-метил-2-(1-пирролидинил)этил]фенотиазин и соединение SR-14136, представляющее собой (1-(2R,6S,9aR)-6-фен-илпергидроквинолизин-2-ил]-2,3-дигидро-1H-бензимидазол, и другие подобные аналоги (Рисунок 1.3).



7-(циклопропилметил)-10,12(R)-диметил-5,6,7,8,9,10-гексагидро-1H-6,10-метаноимидазо[4,5-i][3] бензазоцин



2-(2-бензимидазолил)-10-[1-метил-2-(1-пирролидинил)этил]фенотиазин

Рисунок 1.3. Химическая структура аналогов бензимидазола с каппа-агонистическими свойствами

Конформационный анализ позволил идентифицировать потенциальные биологически активные состояния типичных представителей высокоселективных КОА, включая арилацетамиды и бензоморфаны. Для этого организовали внутри рецепторного кармана связывания состояние суперпозиции, после чего были получены 3D-модели каппа-рецепторов. С изучением зависимости «структура – активность» и при помощи сайт-направленного мутагенеза были определены ключевые фармакофорные элементы, контролирующие процесс взаимодействия агонистов с рецепторами. Важным условием этого взаимодействия является образование солевого мостика между карбоксилем Asp138 и протонированным атомом азота (N⁺), связанным с агонистом. Полученные комплексы демонстрируют улучшенные показатели минимизации энергии и молекулярной динамики (Kane В.Е., 2008; Pogozheva I.D., 2008).

Производные бензимидазола, представляющие собой конденсированные полициклические системы обладают различными видами фармакологической активности, поэтому к ним вполне применимо определение «привилегированные структуры» (Mahmood K. et al., 2019). Оно обозначает группу веществ, представители которой могут демонстрировать множество различных видов биологической активности (Спасов А.А., Иежица И.Н., Бугаева Л.И., 1999).

Функции различных типов опиоидных рецепторов могут быть модулированы производными бензимидазола, согласно многочисленным литературным данным. Первый селективный непептидный NOR-антагонист – J-113397 (Bigoni R. et al., 2000). Некоторые 2-

амино-замещенные, а также 1-пиперидил-замещенные бензимидазолы PCPB, MCOPPB являются Nociceptin/Orphanin FQ-рецепторными агонистами (Hirao A. et al., 2008). 2-фенилбензимидазолы оказывают отчетливое каппа-опиоидное агонистическое действие. N-Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid (UFP-502) является дельта-селективным агонистом, а его N₁-алкилированные 1*H*-аналоги проявляют смешанные дельта-/мю-антагонист/агонистические свойства (Nagase H. et al., 2020).

Различные мембранные рецепторы, такие как гистаминовые, серотониновые и пуриновые, взаимодействуют с конденсированными производными имидазобензимидазола, что было подтверждено экспериментальными исследованиями, проведенными в ВолгГМУ (Черников М.В., 2000; Киабия С.Т., 2003; Яковлев Д.С., 2007; Горягин И.И., 2008).

В ранее проведенных исследованиях путем направленного синтеза были получены различные классы соединений бензимидазола (Рисунок 1.4) и проведен скрининг их активности (Гречко О.Ю., Черников М.В., Спасов А.А., 2007).

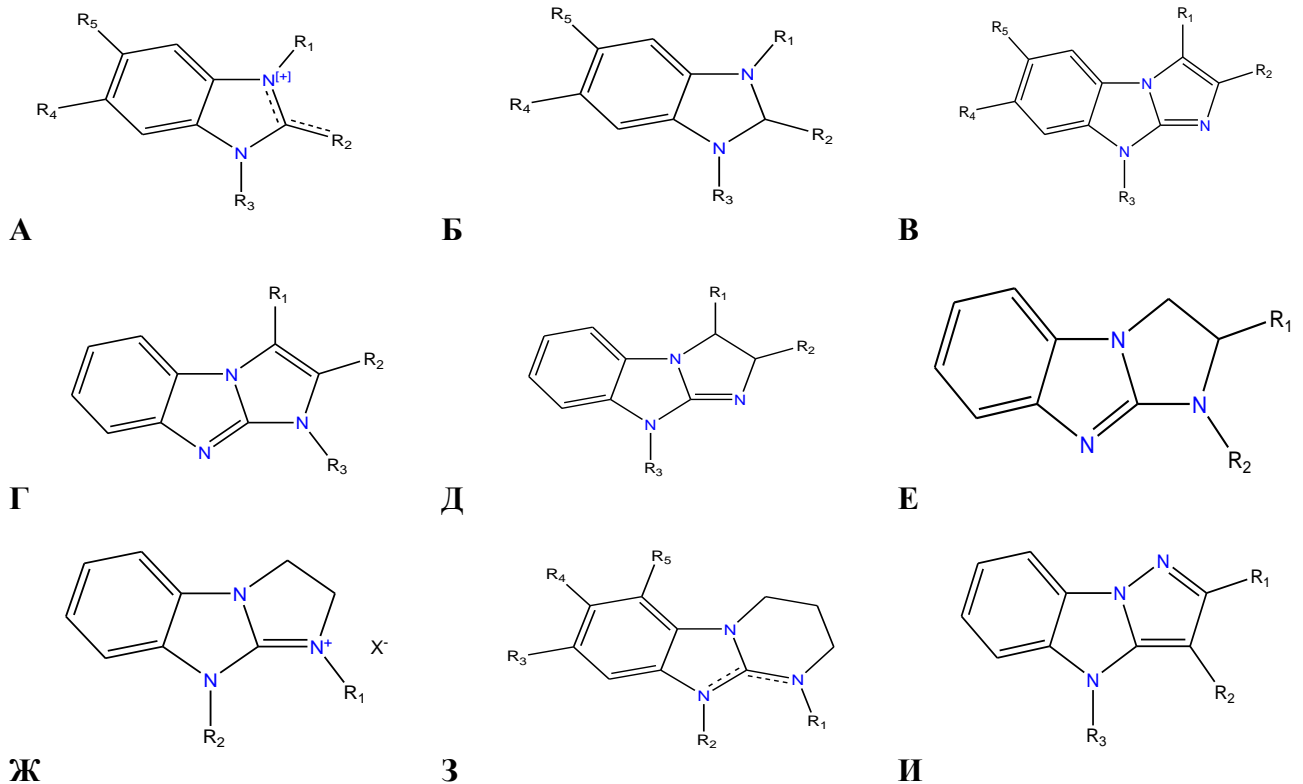


Рисунок 1.4. Классы соединений из числа конденсированных производных бензимидазола, использованные в скрининге: **А** – 1*H*-бензимидазолы; **Б** – 2,3-дигидробензимидазолы; **В** – N⁹-замещенные имидазо[1,2-а]бензимидазолы; **Г** – N¹-замещенные имидазо[1,2-а]бензимидазолы; **Д** – N⁹-замещенные 2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы; **Е** N¹-замещенные 2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы; **Ж** – N¹,N⁹-замещенные 2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы; **З** – 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолы; **И** – пиразоло[1,5-а]бензимидазолы (IX)

По результатам скрининга для наиболее активных веществ определяли EC_{50} , LD_{50} и условный терапевтический индекс соединений (отношение LD_{50} к EC_{50}) (Спасов А.А., Гречко О.Ю. и др., 2010).

В результате проведенного анализа (QSAR-закономерности) установлено, что наиболее перспективными каппа-агонистами являются структуры из числа N^9 -замещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола. Аффинитет к опиоидным рецепторам в большей степени определяется наличием фенильного радикала в положении C^2 трициклической конденсированной системы (наличие галогена в фенильном радикале усиливает сродство к каппа-рецептору в ряду фтор- = дихлор- > хлорфенильный заместитель). При этом аминоэтильный заместитель у атома N^9 (с пирролидиновым, морфолиновым и пиперидиновым циклами) также вызывает усиление аффинности к каппа-опиоидным рецепторам и обеспечивает взаимодействие с их сайтом связывания. В литературе подобные эффекты описаны для сальвинорина А (Кане В.Е., 2008). Затем был выполнен частотный анализ для установления закономерностей влияния физико-химических показателей изучаемых соединений из числа N^9 -замещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола на их аффинитет к каппа-опиоидным рецепторам (Гречко О.Ю., Васильев П.М., 2007).

По результатам проведенных исследований и с учетом литературных данных о перспективности разработки агонистов каппа-опиоидных рецепторов (Dalefield ML, Scouller B, 2022) являлось целесообразным изучение фармакологических свойств соединений лидеров из числа N^9 -замещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (Анисимова В.А., Спасов А.А., 2010; Гречко О.Ю., Спасов А.А. и др., 2016).

1.6. Фармакологические свойства соединений из числа N^9 -замещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола

Согласно руководству по проведению доклинических исследований (Воронина Т.А., Гузевых Л.С., 2012), *анальгетические свойства соединений* оцениваются методами соматогенной и нейрогенной альгезии.

Соединение РУ-1203, известное как 2-(4-фторфенил)-9-пирролидиноэтил имидазо[1,2-*a*]бензимидазол, проявляет высокоселективный агонизм в отношении КОР. В контексте каппа-рецепторного действия проведенные эксперименты *in vitro* показали, что эффективность соединения РУ-1203 превышает эффективность буторфанол и U50,488 (Гречко О.Ю., Елисеева Н.В., 2012).

Проведенные исследования показали, что соединение РУ-1203 обладает дозозависимым налоксонообратимым анальгетическим эффектом на разные модели ноцицептивных реакций. Это было определено в тестах соматической, висцеральной и тонической боли, вызванной механическими, электрическими, термическими и химическими стимулами, и подтверждено исследованиями А.А. Спасова и О.Ю. Гречко в 2010 г. (Спасов А.А., Гречко О.Ю., 2010).

Кроме того, вещество РУ-1203 проявляет выраженное каппа-агонистическое действие на препаратах семявыносящего протока кролика. Помимо этого, оно также обладает мембранотропной активностью и подавляет трансмембранные ионные токи нейронов прудовика. Эти результаты были получены в исследованиях О.Ю. Гречко и А.И. Вислобокова в 2010 г. (Гречко О.Ю., Вислобоков А.И., 2010).

В отличие от буторфанола, соединение РУ-1203 при 100-кратном увеличении анальгетической дозы не вызывает респираторную депрессию. Оно также не проявляет признаков наркотической зависимости и абстинентного синдрома при остром и хроническом введении (Grchko O., Eliseeva N., 2011). В ходе тестов условной реакции избегания места, «вынужденного плавания», «открытого поля» и «удержания на вращающемся стержне» было обнаружено, что РУ-1203 не обладает значимым седативным действием и не вызывает нарушений двигательной активности или аверсивных расстройств при дозах, 10-кратно превышающих максимально эффективные анальгетические дозы, в отличие от буторфанола (Гречко О.Ю., Елисеева Н.В., 2012).

При этом вещество РУ-1203 проявляет налоксонообратимый дозозависимый эффект, способствующий снижению интенсивности судорожного синдрома. Кроме того, оно существенно увеличивает выживаемость животных в тестах максимального электрошока и коразол-индуцированных судорог.

Каппа-опиоидный рецептор соединения РУ-1203 проявляет способность избирательного усиления числа взятий воды в тесте наказуемого взятия воды (по методике Вогеля) (под воздействием налоксона эффекты нивелировались). Помимо этого, изучаемое соединение статистически значимо повышает количество выходов животных в центр «открытого поля» и продолжительность пребывания грызунов в открытых рукавах «крестообразного лабиринта». Из проведенных тестов следует, что соединение РУ-1203 в указанном диапазоне доз достигает выраженной анксиолитической эффективности, сопоставимой с диазепамом, в то время как буторфанол не оказывает существенного влияния на уровень тревожности животных на стандартных моделях ангиогенеза (Литвинов Р.А., Елисеева Н.В., 2018).

В классификации, предложенной Т.А. Гуськовой в 2008 г., изучаемое вещество отнесено к категории малотоксичных соединений. При проведении оценки нейротоксикологического профиля производного бензимидазола РУ-1203 было выявлено, что признаки седации,

угнетения двигательной активности, миорелаксации и снижение ректальной температуры наблюдаются при дозах, превышающих максимальные антиноцицептивные дозы в сотни раз.

По результатам исследований для (дигидрохлорида 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-а]-бензимидазола) под лабораторным шифром РУ-1205 показано наличие анальгетических свойств в широком ряду рекомендованных тестов (Гречко О.Ю., Черников М.В., 2007; Spasov A.A., Grechko O.Yu., 2018).

Технология синтеза соединения РУ-1203 более сложная, чем РУ-1205 (Анисимова В.А., Спасов А.А., Толпыгин И.Е. и др. 2010). В связи с этим в качестве соединения-лидера, сочетающего в себе высокоселективные каппа-агонистические свойства и простоту химического синтеза, было выбрано соединение РУ-1205.

В исследованиях, проведенных на кафедре фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ (Spasov A.A., Grechko O.Yu., 2018), оценивали анальгетическую активность и широту терапевтического действия соединения РУ-1205 и препарата сравнения буторфанол. Результаты эксперимента «горячая пластина» показали, что соединение РУ-1205 превосходит буторфанол по параметрам и анальгетической активности (в 3,3 раза), и широте терапевтического действия (в 5,3 раза).

Далее были проведены эксперименты по электрическому раздражению корня хвоста крыс. В тестах «вокализация» и «продолгованная вокализация», где механизмы алгезии связаны с продолговатым мозгом и таламусом, исследуемое соединение проявило в среднем 5-кратное превосходство над эффектами препарата сравнения. На модели соматогенной боли, которая отображает спинальный уровень алгезии и измеряется по параметру «латентное время отдергивания хвоста», ED_{50} изучаемого соединения оказалось равным буторфанолу (Spasov A.A., Grechko O.Yu., 2018).

При моделировании формалиновой гипералгезии наблюдается двухфазная поведенческая ноцицептивная реакция (I фаза/острая и II фаза/воспалительная). При подкожном введении изучаемого соединения (РУ-1205) выраженность формалиновой гипералгезии дозозависимо снижалась в двух фазах сопоставимо с препаратом сравнения. Схожие результаты получены на модели механического раздражения воспаленной конечности (на фоне формалиновой гипералгезии) (Randall-Selitto test) (Гречко О.Ю., Елисеева Н.В., Спасов А. А. и др., 2016).

Для оценки перитовисцеральной боли используется тест «уксусных корчей». Раздражение серозных оболочек при внутрибрюшинном введении уксусной кислоты мышам вызывает сокращение абдоминальной мускулатуры – корчи. Соединение РУ-1205 дозозависимо снижало количество корчей относительно контрольной группы сопоставимо с препаратом сравнения (Spasov A.A., Grechko O.Yu., 2018).

Выраженность нейропатического болевого синдрома, вызванного перевязкой седалищного нерва у животных, оценивается по величине порога тактильной аллодинии (Randall-Selitto test). Соединение РУ-1205 статистически значимо увеличивало значение 50%-го порога болевой реакции относительно группы контроля, при этом уступая препарату сравнения буторфанолу (Spasov A.A., Grechko O.Yu., 2018).

Принимая во внимание наличие выраженных анальгетических свойств, необходимым было установление механизма фармакологического действия соединения из числа N⁹-замещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола. При анализе структуры соединения РУ-1205 *in silico* (2D,3D) отмечена её выраженная гомологичность с селективным каппа-агонистом – U-50,488, а также подтверждена высокая аффинность с сайтом связывания, расположенном на каппа-опиоидном рецепторе (Гречко О.Ю., Спасов А.А., Анисимова В.А. и др., 2016).

Норбиналторфимин является антагонистом КОР и не влияет на мю- и дельта рецепторы, и используется для детализации механизма действия новых соединений (Патент № 2108579, Деркачев Э.Ф. и др. 1998). В исследованиях *in vitro* с использованием метода малоуглового светорассеяния предварительное внесение норбиналторфимина в кювету с рабочим раствором тромбоцитов препятствовало их активации под действием соединения РУ-1205 (Елисеева Н.В., Гречко О.Ю., 2018).

В ранее проведенном исследовании (Гречко О.Ю., Спасов А.А., Штарева Д.М. и др., 2014) были использованы модели электроиндуцированного сокращения семявыносящего протока кролика (СПК) и подвздошной кишки крысы (ПКК), где присутствуют различные типы опиоидных рецепторов. Особое внимание было уделено изучению рецепторного компонента действия соединения РУ-1205 с целью получения более полного представления о его воздействии. В тестах на СПК (экспрессируются КОР) соединение РУ-1205 ожидаемо проявляло норбиналторфимин-обратимо ингибирующие электростимуляционные свойства в наномолярных концентрациях (ЭК50 $2,2 \times 10^{-9}$ М) и превосходило препарат сравнения – буторфанол. В то же время в тестах на ПКК (экспрессируются МОР) изучаемое соединение уступало препарату сравнения морфину в максимальной концентрации (100 мкМ), что согласуется с литературными источниками (Gray A., 2005).

Несмотря на убедительные результаты, полученные *in silico* и *in vitro*, необходимым этапом детализации механизма действия изучаемого соединения является установление эффектов в условиях целостного организма – *in vivo*. В тесте «горячая пластина» у соединения РУ-1205 отмечено налоксон- (неселективный антагонист опиоидных рецепторов) и норбиналторфимин-обратимое снижение активности в 6 раз (Spasov A.A., Grechko O.Yu., 2018). Полученные результаты находят подтверждение в литературе (Wei Y.Y., Ma Y., 2022).

При исследовании влияния соединения РУ-1205 на различные *нейромедиаторные системы* не отмечено взаимодействия с холинергической, адренергической и серотонинергической системами (Spasov A.A., Grechko O.Yu., 2017; Litvinov R.A., Eliseeva N.V., 2017; Литвинов Р.А., Елисеева Н.В., 2018). При введении соединения РУ-1205 отмечалось снижение дофаминергической передачи, предположительно на уровне мезолимбической системы головного мозга мышей (снижение фенаминовой гиперактивности), хотя избыточная двигательная активность может быть обусловлена выработкой и других нейромедиаторов (серотонина, норадреналина). В контексте исследования установлено аллостерическое взаимодействие с компонентами ГАМК-А-рецепторного комплекса посредством, возможно, влияния на Ca^{2+} -зависимые- K^{+} токи. Это воздействие проявляется в снижении тремора в тестах, проведенных с использованием пикротоксина и бикикуллина. Полученные результаты согласуются с литературными источниками (Birnie B., 2000; Pflieger J.F., 2002; Robertson S.D., 2009; Kleijn J., 2012). Помимо анальгетической активности у изучаемого вещества отмечены противосудорожные свойства в тестах максимального электрошока и коразоловых судорог (Спасов А.А., Калитин К.Ю., 2015), а также антиэпилептиформная активность, подтвержденная электрофизиологическими тестами (снижение фоновой фокальной активности отдельных кортикальных нейронных колонок) (Калитин К.Ю., Спасов А.А., 2017).

При оценке *толерантности к антиноцицептивному действию* соединения РУ-1205 анализировали развитие синдрома отмены с провокацией налоксоном (курс введения изучаемого соединения, морфина и буторфаноло составлял 5 дней). У животных, получавших препарат сравнения морфин, провокация синдрома отмены налоксоном сопровождалась характерными для классических опиатов признаками: птоз, прыжки, тремор, потеря веса; в группе мышей, получавших буторфанол, данные признаки были менее выражены; в группе животных, получавших изучаемое соединение, проявлений синдрома отмены не наблюдалось (Гречко О.Ю., Штарева Д.М., 2016; Гречко О.Ю., Спасов А.А., 2017; Елисеева Н.В., Гречко О.Ю., 2018).

Согласно проведенному исследованию фармакокинетики и метаболизма изучаемого соединения, установлено, что соединение РУ-1205 демонстрирует высокую степень распределения в органы и ткани организма, при этом его концентрация в данных органах оказывается ниже, чем в плазме крови. Интересно отметить, что данное соединение проявляет наименьшую аффинность к сердцу, легким, селезенке и мышцам. Высокое содержание изучаемого вещества обнаружено в органах, ответственных за его выведение – печени и почках. В то же время при подкожном введении концентрация соединения РУ-1205 в головном мозге в незначительных количествах сохраняется до 4-го часа. Судя по всему, биотрансформация вещества протекает в основном путем образования окисленных форм исходной молекулы через

механизмы первой фазы метаболической трансформации, возможно под влиянием изоформы CYP3A1 цитохрома. Соединение РУ-1205, по всей видимости, не подвергается синтетическим реакциям во второй фазе биотрансформации и не образует конъюгатов (Spasov A.A., Smirnova L.A., Grechko O.Yu. et al., 2021).

Для субстанции соединения лидера из числа N⁹-замещенных имидазо[1,2-а]бензимидазола под лабораторным шифром РУ-1205 была изучена эффективность с детализацией механизма действия, особенностей фармакокинетики и метаболизма. Вышеописанные эксперименты выполнены по Госконтракту с Минпромторгом РФ № 11411.1008700.13.090.

Для изучаемого соединения в НИИ фармакологии РАМН им В. В. Закусова (г. Москва) была создана твердая лекарственная форма (таблетки для внутрижелудочного введения, гранулят таблеток) (Патент РФ № 2 413 512 С1 от 29.07.2009).

Настоящее исследование является продолжением работы коллектива авторов (Гречко О.Ю., 2012; Елисеева Н.В., 2010; Калитин К.Ю., 2018; Литвинов Р.А., 2016; Ращенко А.И., 2014; Штарева Д.М., 2014) и направлено на изучение свойств соединения в твердой лекарственной форме.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Правила и рекомендации к проведению экспериментальных исследований

Основой проведения экспериментальной работы было соблюдение требований ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и правил лабораторной практики, установленных для выполнения доклинических исследований в Российской Федерации. При этом также соблюдались «Принципы надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ Р 33044-2014, 2015) и «Правила надлежащей лабораторной практики», утвержденные Министерством здравоохранения РФ приказом № 199н от 1 апреля 2016 года. Важной составляющей было также соблюдение директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года, регулирующей вопросы защиты животных, используемых в научных целях.

Перед проведением экспериментов все работы получили одобрение от Регионального независимого этического комитета (протокол № 2077-2018 от 30.10.2018 г.) с регистрационным номером IRB0005839 IORG0004900 (OHRP). Эвтаназия животных проводилась в соответствии с требованиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985 г.).

На этапе подготовки и планирования диссертационного исследования получен допуск для работы с наркотическими средствами (Удостоверение № 180001802281 от 21.02.2019 г. «Порядок и правила осуществления деятельности, связанной с оборотом наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров»).

Моделирование экспериментальных патологий осуществлялось в соответствии с указаниями, представленными в руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов А.Н. и др., 2012).

Реактивы и вещества

Соединение РУ-1205 представляет собой дигидрохлорид 2-(4-фторфенил)-9-морфолиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола (Рисунок 2.1), синтезировано в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета г. Ростов-на-Дону * (патент РФ № 2

* Выражаем благодарность сотрудникам лаборатории органического синтеза к. х. н. В.А. Анисимовой, к. х. н. О.Н. Жуковской и д. х. н. А.С. Морковнику за синтез активной фармацевтической субстанции РУ-1205.

413 512 С1 от 29.07.2009). Чистота соединения составляла не менее 99,46 %. Для данного соединения оформлена фармакопейная статья, где описаны требования, предъявляемые к активной фармацевтической субстанции (АФС) РУ-1205.

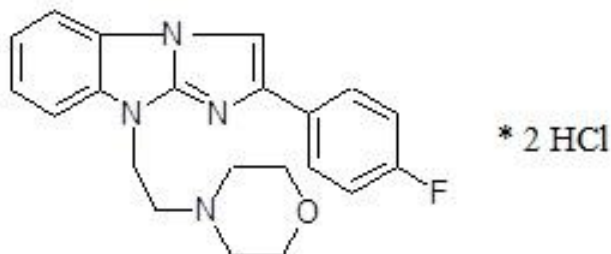


Рисунок 2.1. Структурная формула соединения РУ-1205

Для данного соединения была создана твердая лекарственная форма (таблетки для внутрижелудочного введения) в НИИ фармакологии РАМН им В. В. Закусова (г. Москва). В составе 1 таблетки, покрытой оболочкой: соединение РУ-1205 – дигидрохлорид 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-а]-бензимидазол (НИИ ФОХ ЮФУ, Россия) – 10 мг, а также вспомогательные вещества: лактоза (USP), лудипресс (Eur. Ph), магния стеарат (ТУ 6-09-16-1553-90), оболочка опадрай (Opadry 200 f280000) (USP) до 0,210 г.

При исследовании были использованы соединения: морфина гидрохлорид (1 мг/кг) (Московский эндокринный завод, Россия, лицензия на деятельность по обороту наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров № ФС-34-03-000004-16 от 25 октября 2016 г.); галоперидол (0,45 мг/кг) (ООО «Озон», Россия); мидазолам (0,3 мг/кг) (Cenexi SAS, Швейцария); диазепам (1 мг/кг) (Московский эндокринный завод, Россия); метоклопрамид (5 мг/кг) (Новосибхимфарм АО, Россия); атропина сульфат (2,7 мг/кг) (Дальхимфарм, Россия); клонидин (1 мг/кг) (Органика АО, Россия); габапентин (90 мг/кг) (ПИК-ФАРМА, Россия); amitriptilin (3 мг/кг) (Московский эндокринный завод, Россия); карбамазепин (15 мг/кг) (Синтез, Россия); буторфанола тартрат (0,01–0,3 мг/кг) (ФГУП Московский эндокринный завод, Россия); селективный агонист каппа-опиоидных рецепторов соединение U-50488 (10 мг/кг) (SIGMA, США); ингибитор MAP-киназы соединение SB203580 (0,05 мг/кг) (SIGMA, США).

При изучении показателей хронической токсичности соединения РУ-1205 были использованы следующие реактивы: гимза Романовского (Ольвекс, Россия); гематоксилин-эозин (Реахим, Россия); цитрат натрия (Реахим, Россия); цитрат калия (Реахим, Россия); хлорид натрия (Реахим, Россия); уксусная кислота (Реахим, Россия).

Применяли биохимические наборы для определения, белка в крови, глюкозы, мочевины, креатинина, холестерина, щелочной фосфатазы, аланин- и аспартаттрансаминазы в сыворотке

крови (Lachem, Чехия); белка, глюкозы и кетоновых тел в моче (индикаторные диагностические полоски (Биоскан, Россия).

При изучении генотоксических свойств методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток в работе использовались: агароза, тип VII производства Sigma-aldrich (США); метилметансульфонат (Sigma-Aldrich, США), дигидроортофосфат калия (ЧДА), гидроксид натрия (ЧДА), хлористый натрий (ЧДА), хлористый калий (ЧДА), гидрофосфат натрия (ЧДА), этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) производства «Реахим» (Россия); трис-(гидроксиметил)-аминометан производства Reanal (Венгрия); диметилсульфоксид (ДМСО) производства «Тульская фармацевтическая фабрика» (Россия); Тритон X-100 производства SERVA (Германия); хлорид железа(III) 6-водный (ч) (Россия); 70%-й спирт (Россия); краситель SYBR Green I производства Applichem (Германия); галловая кислота (Россия); 3%-я перекись водорода (Россия).

Средства для наркоза – тиопентал натрия (Сандоз ГмбХ, Кундль, Австрия).

Оборудование и программное обеспечение

При изучении анальгетической активности использовалась установка для исследования отдергивания хвоста от теплового излучения (tail flick) (Ugo Basile, Италия). Установка представляет собой платформу размером 37,5 (ш) × 38,5 (г) × 13 (в) см, в центре которой вмонтирован инфракрасный источник, чья лучистая энергия регулируемой интенсивности фокусируется встроенным параболическим зеркалом на хвост животного (Рисунок 2.2).

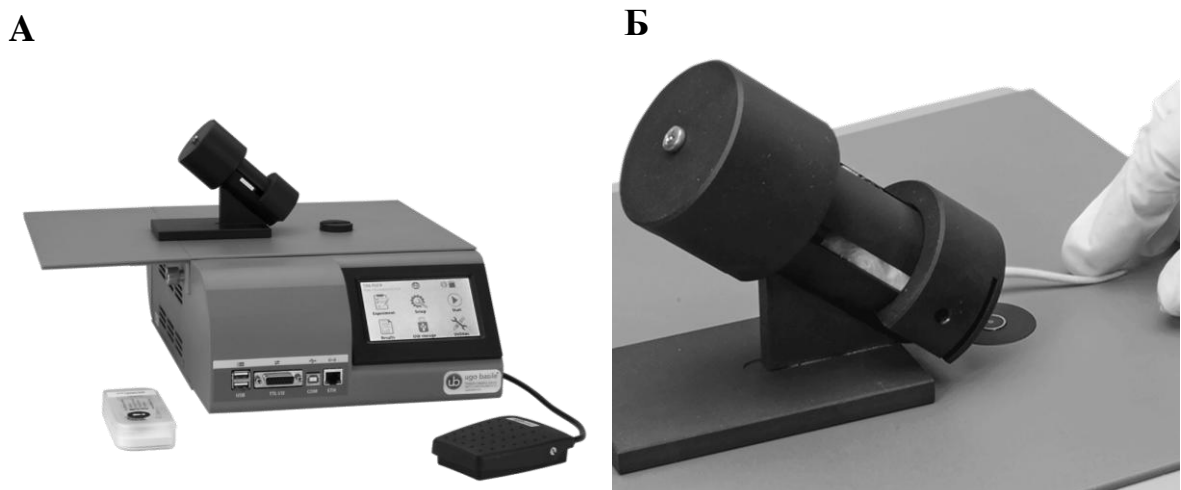


Рисунок 2.2. Установка для исследования отдергивания хвоста от теплового излучения (tail flick): А – общий вид установки; Б – животное, помещенное в фиксатор во время проведения эксперимента (изображение с сайта <https://ugobasile.com/products/categories/pain-and-inflammation/tail-flick-unit-thermal-stimulation,-damour-smith-method>)

Для оценки аверсивных свойств изучаемого соединения была использована установка предпочтения/избегания места (Ugo Basile, Италия). Она представляет собой двухсекционный бокс, состоящий из двух отсеков ($25 \times 16 \times 15$ см), отличающихся друг от друга по цвету и узору на стенках, а также по узору и текстуре пола (Рисунок 2.3). Методику выработки условной реакции избегания места осуществляли в модификации с исходно сбалансированным выбором отсеков экспериментальной камеры (unbiased procedure). В течение недели были выполнены следующие этапы эксперимента: в первый день подбирали животных – мышей-самцов, которые проводили в отсеках камеры равное количество времени в течение 15 минут (сбалансированный выбор отсека) – и случайным образом распределяли их в экспериментальные группы. Со второго по пятый день (период обусловливания) дважды в день животным вводили исследуемые вещества, затем через один час их помещали в отсек при закрытой перегородке на 30 минут (в равной степени вероятности). На третий день после заключительного обусловливания проводили тестирование в течение 15 минут при открытой перегородке. АФС РУ-1205 вводили в дозе 5 мг/кг, соединение U-504,88 – 10 мг/кг, внутривентриально. Для детализации механизма возникающей дисфории, вызванной соединением U-504,88, две группы мышей за 20 минут до его введения получали ингибитор p38 MAP-киназы соединение SB203580 (0,05 мг/кг, внутривентриально) или АФС РУ-1205 (5 мг/кг). За критерий развития аверсии принимали статистически значимое избегание животными отсека, ассоциированного с веществом.

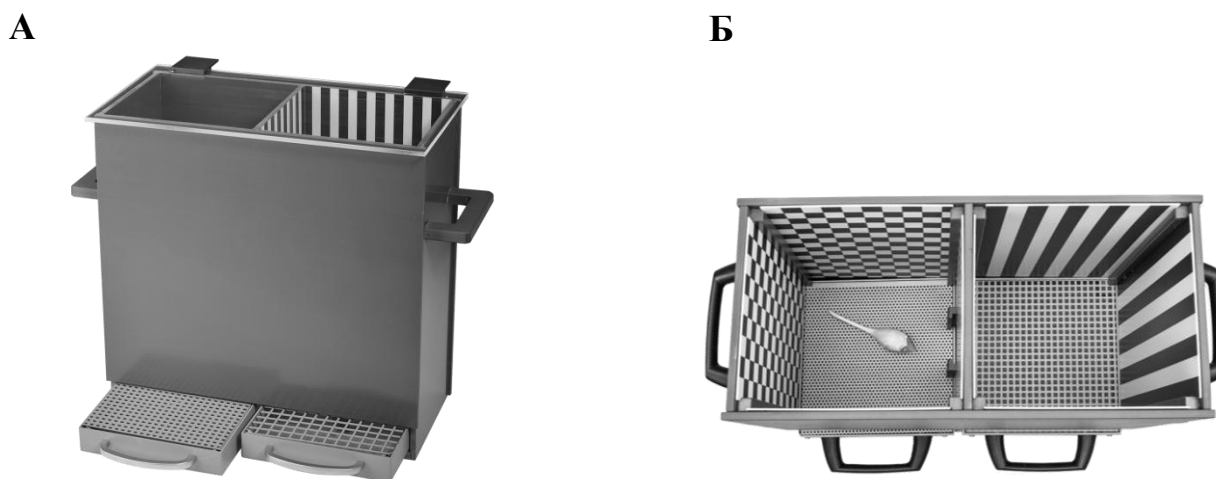


Рисунок 2.3. Установка предпочтения/избегания места (Ugo Basile, Италия): А – общий вид установки; Б – схематичное изображение процесса эксперимента (изображение с сайта <https://ugobasile.com>)

Для оценки мнестических реакций использовали условный рефлекс пассивного избегания (тест УРПИ). Экспериментальная установка УРПИ (Ugo Basile, Италия) размером 580 × 487 × 330 мм состояла из двух соединенных смежных отсеков, различающихся текстурой пола и изображениями на стенах.

В работе были использованы следующие виды лабораторного и аналитического оборудования: аквадистиллятор ДЭ-4-2, № 24994 (Россия, Саранск); микроскопы биологические рабочие МБР-1, МБР-1А № 683671 и № 6945 (ЛОМО) (Россия, Санкт-Петербург); термостат водяной комбинированный ТК-37, ТУ-64-1-2395-79, № 1010 (Россия, Казань); спектрофотометр СФ-46, МИ-536-84 № 5290 (Россия, Санкт-Петербург); спектрофотометр APeL-303UV (Япония); тепловой трехканальный электрокардиограф ЭКЗТ-02 № 01372645 (АКСИОН, Россия, Ижевск); аппарат Панченкова (Украина, Одесский экспериментальный завод лабораторной и медицинской техники); шкаф сушильно-стерилизационный ШСС-80П, № 1931 (Россия, Казань); облучатель бактерицидный передвижной (Генерис, Россия, Челябинск); № В00093; колориметр КФК-2 № 833895 (Россия, Загорск); микроскоп Leica DM 750 № 851327646GZ0034 (ООО «АТМ-Практика», Россия, Санкт-Петербург); гематологический анализатор Abacus junior 2,75 release № 01351269 (Diatron Messtechnik GmbH, Австрия); рН-метр милливольтметр рН-340 № 4908 (Украина, Одесса); центрифуга лабораторная клиническая ОПН-3 № 1043 (Россия, Санкт-Петербург); центрифуга лабораторная клиническая МГЦ-8 № 10037 (Россия, Санкт-Петербург); центрифуга Elmi CM-6M № 01351355 (Латвия); микроцентрифуга ELMi CM-6 (6000 об./мин, 2 мин), № 932197; лупа бинокулярная БЛ-2-1 № 4321 (Россия, Санкт-Петербург); приспособление для фиксации и окраски мазков крови ФОМК-1 № 87 (Украина, Львов); счетчик лабораторный СЛФ-16 № 47-к (Украина, Киев); автомат для гистологической обработки тканей АТ-4 (Россия, Санкт-Петербург); микротом МС-2 (Россия, Санкт-Петербург); холодильник Samsung № 01638319 (Корея); весы односташечные Vicoint (Венгрия); электронные весы MW-120 № 456 (Корея); торсионные весы однодиапазонные типа WT № 473774, (Польша); комплект дозаторов пипеточных КДП-1 №115 (Россия, Санкт-Петербург); камера для горизонтального электрофореза (CSL-com20, Великобритания); блок питания (PharmaciaFineChemicals, Швеция); микроскоп (CarlZeiss, Германия); цифровой фотоаппарат Samsung SMART Camera NX300 (Южная Корея); портативный рН-метр (НІ 8314, Россия); термостат TW-2 Elmi (Латвия); весы аналитические АВ 120-01 (Веста, Россия); микроскоп инвертированный МИБ-Р (ЛОМО, Россия); высокоскоростная центрифуга TgI16MW (Китай).

Экспериментальные животные

Для экспериментов были выбраны белые беспородные лабораторные крысы и мыши (половозрелые самцы и самки), а также кролики породы шиншилла, с отклонением по возрасту и массе тела не более 10 %. Оценка и интерпретация эффектов, полученных в ходе данного исследования на животных, проводились на достаточном их количестве. Число особей соответствует требованиям, приведенным в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств, которое рекомендует использовать не менее 5 животных в каждой группе. При этом данная практика не противоречит конвенции Совета Европы, утвержденной в 1986 г., по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях.

На двух видах нелинейных лабораторных животных (мышях и крысах) было проведено исследование фармакологических свойств данного соединения. В эксперименте были задействованы самцы мышей, их количество составило 240 особей, и самцы крыс, их количество составило 120 особей. Масса мышей находилась в пределах от 18 до 24 г, а масса крыс – от 180 до 200 г. Все животные имели соответствующие ветеринарные свидетельства от 08.12.2020 г. под № 15702 и были доставлены из ООО «Питомник РАМТН», расположенного в Москве.

Исследования параметров острой токсичности проведены на нелинейных половозрелых животных обоего пола: 160 белых мышях массой 19–25 г, 150 белых лабораторных крысах массой 180–220 г при однократном интрагастральном введении (самки и самцы в соотношении 50/50). Все животные были доставлены из ООО «Питомник РАМТН» (г. Москва, ветеринарное свидетельство от 08.12.2020 г. № 15702).

Исследования по изучению хронической токсичности выполнены на 120 половозрелых беспородных крысах (60 самцов, 60 самок) 3–3,5-месячного возраста и на 80 половозрелых кроликах (40 самках и 40 самцах) породы шиншилла 4,5-месячного возраста, доставленных из специализированных питомников ГУВ МО «Павлово-Посадская вет. СББЖ» (г. Электрогорск, Московская область).

Оценка влияния изучаемого вещества на генеративную функцию проводилось на 196 половозрелых беспородных белых крысах обоего пола (114 самках и 82 самцах) массой 220–240 г 3,5–4-месячного возраста.

В данном исследовании проведены эксперименты для определения эмбриотоксических и фетотоксических свойств изучаемого соединения. Для этого было использовано 180 виргинных половозрелых самок белых крыс возрастом 3,5–4 месяца, с исходной массой тела от 180 до 240 г. Также было изучено потомство, полученное от 30 крыс-самок. Все животные

были доставлены из питомника ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора в г. Волгограде.

При исследовании влияния соединения на геном методом ДНК-комет были использованы белые беспородные крысы обоего пола (самцы и самки) в количестве 90 особей массой 180–200 г, доставленные из питомника ООО «Питомник РАМТН» (г. Москва).

После доставки из питомников все животные проходили 2-недельный карантин в виварии ФГБОУ ВО ВолгГМУ. В течение этого периода дважды проводился клинический осмотр животных, особи с выявленными отклонениями не включались в эксперимент.

В соответствии с постановлением от 29.08.2014 г. № 51 содержание животных осуществлялось в стандартных условиях вивария. Данное постановление «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 "Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)"» было разработано в соответствии с директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г., которая регулирует защиту животных, используемых для научных целей.

В ходе проведения эксперимента для идентификации каждому животному приписывалась соответствующая метка, которая регистрировалась в протоколе. Для этой цели использовались специальные обозначения, которые наносилось на различные участки тела животного при помощи несмываемого маркера.

Методы исследования фармакологических свойств изучаемого соединения

Анальгетическая активность в тесте in vivo на модели соматогенной боли

Эксперименты проведены на половозрелых мышах-самцах массой 19–25 г. Животные случайным образом были разделены на группы по 5 особей. В качестве растворителя использовали очищенную воду, которую вводили перорально (п/о) и парентерально (внутрибрюшинно – в/б). Активную фармацевтическую субстанцию РУ-1205 в дозе 5 мг/кг вводили в/б. Гранулят таблеток (ГТ) РУ-1205 в дозе 5 мг/кг, пересчитанной на фармацевтическую субстанцию, вводили п/о. В качестве препаратов сравнения вводили морфин гидрохлорид в дозе 1 мг/кг в/б, тримеперидин в дозе 1 мг/кг п/о.

Исследование обезболивающей активности соединения РУ-1205 осуществлялось с использованием АФС и ГТ. Применялась модель соматогенной боли, основанная на отдергивании хвоста в ответ на тепловое воздействие (метод tail flick) (D'Amour F.E., Smith D.L., 1941). При этом был изучен спинальный флексорный рефлекс в ответ на постепенное увеличение интенсивности теплового излучения на поверхности кожи.

Наличие анальгетического действия оценивали путем регистрации латентного периода реакции отдергивания хвоста. Время, которое требовалось для избавления от болевого раздражителя, увеличивалось после введения изучаемых веществ. Раздражение наносили на дистальную часть хвоста при помощи инфракрасного источника (55 °С), максимальное время воздействия составляло 15 секунд.

Кроме того, для детализации механизма действия изучаемого соединения использовали тест «горячая пластина» (Ankier S.I., 1974). Регистрировали время полизывания задней лапы животного, находящегося в камере прибора (Hot/Cold Plate, Ugo Basile, Италия), пол которой был нагрет до 55 °С. Мыши-самцы массой 19–23 г были разделены на 7 групп по 5 особей в каждой. Гранулят таблеток РУ-1205 и соединение U-50.488 вводили в дозе 5 мг/кг, а антагонисты опиоидных рецепторов – налоксон и норбиналторфимин в дозе 10 мг/кг за 20 минут до введения агонистов. Животные контрольной группы вместо активных соединений получали растворитель – очищенную воду в эквивалентном объеме.

По результатам теста рассчитывали активность соединений:

$$\text{Активность, \%} = \frac{\text{ЛП в опытной группе}}{\text{ЛП в контрольной группе}} * 100 - 100\%$$

где ЛП – латентный период полизывания задней лапы.

*Взаимодействие исследуемого соединения с адъювантными препаратами
на модели соматогенной боли*

В экспериментах использовались 110 нелинейных половозрелых мышей-самцов массой 25–30 г. Группирование животных проводилось случайным образом. Животные каждой из групп получали вещество / комбинацию веществ.

Первая группа, которая выступала в качестве контроля, получала очищенную воду в объеме 100 мкл на 10 г веса. Остальным (опытным) группам животных вводили следующие вещества/комбинации: АФС РУ-1205 в дозировке 5 мг/кг, морфина гидрохлорид (м.г.) в дозировке 1 мг/кг, м.г. в дозировке 1 мг/кг в сочетании с клонидином в дозировке 1 мг/кг (Andurkar SV, 2012), АФС РУ-1205 в дозировке 5 мг/кг в сочетании с клонидином в дозировке 1 мг/кг, м.г. в дозировке 1 мг/кг в сочетании с галоперидолом в дозировке 0,45 мг/кг (Leppert W., 2014), АФС РУ-1205 в дозировке 5 мг/кг в сочетании с галоперидолом в дозировке 0,45 мг/кг, м.г. в дозировке 1 мг/кг в сочетании с метоклопрамидом в дозировке 5 мг/кг (Leppert W., 2014), АФС РУ-1205 в дозировке 5 мг/кг в сочетании с метоклопрамидом в дозировке 5 мг/кг, м.г. в дозировке 1 мг/кг в сочетании с диазепамом в дозировке 1 мг/кг (Pang C.S., 2001), АФС РУ-1205

в дозировке 5 мг/кг в сочетании с диазепамом в дозировке 1 мг/кг, м.г. в дозировке 1 мг/кг в сочетании с мидазоламом в дозировке 0,3 мг/кг (Leppert W., 2014), АФС РУ-1205 в дозировке 5 мг/кг в сочетании с мидазоламом в дозировке 0,3 мг/кг, м.г. в дозировке 1 мг/кг в сочетании с атропином в дозировке 2,7 мг/кг (Leppert W., 2014), АФС РУ-1205 в дозировке 5 мг/кг в сочетании с атропином в дозировке 2,7 мг/кг, м.г. в дозировке 1 мг/кг в сочетании с габапентином в дозировке 90 мг/кг (Papathanasiou T., 2016), АФС РУ-1205 в дозировке 5 мг/кг в сочетании с габапентином в дозировке 90 мг/кг, м.г. в дозировке 1 мг/кг в сочетании с amitriptилином в дозировке 3 мг/кг (Jagla G., Mika, 2014), АФС РУ-1205 в дозировке 5 мг/кг в сочетании с amitriptилином в дозировке 3 мг/кг, м.г. в дозировке 1 мг/кг в сочетании с карбамазепином в дозировке 15 мг/кг (Naseri K., 2012) и АФС РУ-1205 в дозировке 5 мг/кг в сочетании с карбамазепином в дозировке 15 мг/кг.

Изучение влияния адьювантных препаратов на выраженность анальгетического эффекта проводилась по вышеописанной методике отдергивания хвоста от теплового изучения. При исследовании коанальгетических эффектов морфина / АФС РУ-1205 введение данных веществ производилось за 15 минут до адьювантных препаратов. Для проведения исследования, изучаемые вещества были растворены в очищенной воде и введены однократно в/б в объеме 100 мкл на 10 г веса животного. После введения адьювантного препарата болевое раздражение наносили трижды: через 30, 60 и 90 минут (Leppert W., 2014).

Оценка изменений производилась при помощи величины максимально возможного эффекта (МВЭ, %) (Воронина Т.А., Гузеватых Л.С., 2012):

$$\text{МВЭ} = \frac{\text{ЛП}_{\text{ОП}} - \text{ЛП}_{\text{КОНТР}}}{\text{МАХ}_{\text{ВРЕМЯ}} - \text{ЛП}_{\text{КОНТР}}} \times 100\% ,$$

где ЛПОП – латентный период реакции после введения вещества, ЛПКОНТР – латентный период реакции до введения вещества, МАХвремя – максимальное время нанесения раздражителя (15 секунд).

Аверсивный потенциал изучаемого соединения в тесте условной реакции избегания места

Формирования условного рефлекса избегания/предпочтения места выполнялось при использовании предварительно типированных животных (с несмещенным выбором отсеков экспериментальной камеры), что позволяло быть уверенными в определении избирательных «награждающих» (УРПМ) или аверсивных (УРИМ) эффектов соединения (Воронина Т.А., 1989). В установке предпочтения/избегания места (Conditioned Place Preference Cages for Mice, UgoBasile, Италия) число особей в каждой группе достигало 5, число групп – 5.

Экспериментальная сессия включала периоды предтеста (подбор животных, 1-й день), обуславливания (формирования ассоциативной связи с отсеком при закрытой перегородке, 2–5-й дни) и тестирования (через 72 часа после последней сессии).

Данное исследование включало проведение этапа обуславливания, который состоял из 8 сессий, каждая из которых продолжалась в течение 30 минут и проводилась с закрытой перегородкой. Сессии проводились дважды в день: в 10:00 и в 16:00 часов. Последовательность введения была равновероятной, и в качестве изучаемых соединений использовались АФС РУ-1205 и U-50488. Доза АФС РУ-1205 составляла 5 мг/кг, а доза U-50488 – 10 мг/кг. В качестве растворителя использовалась очищенная вода.

При изучении возможного антидисфорического действия АФС РУ-1205 на U-50488 эффект от их совместного введения сравнивали с другой комбинацией – U-50488 и ингибитора р38 МАРК-киназы SB203580 (0,05 мг/кг). Вещества АФС РУ-1205 и SB203580 вводились в течение периода обуславливания, продолжительностью со 2-го по 5-й день эксперимента (внутрибрюшинно, за 20 минут до U-50488).

В последний день эксперимента было проведено измерение времени, которое животные провели в каждом из отсеков при открытой перегородке. Измерение продолжалось в течение 900 секунд. За критерий развития аверсии принимали статистически значимое избегание животными отсека, ассоциированного с веществом.

Методы исследования токсикологических свойств

При изучении токсикологических свойств новых лекарственных средств необходимым является определение их общетоксических (параметров острой и хронической токсичности), а также специфических (репродуктивная токсичность *, генотоксичность) свойств. Исследования проводились согласно методическим рекомендациям по изучению общетоксического действия лекарственных средств (Арзамасцев Е.В., Березовская И.В., Верстакова О.Л. и др., 2012) и Приказу Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 № 199н «Правила надлежащей лабораторной практики».

Острая токсичность

В процессе определения параметров острой токсичности АФС РУ-1205 на мышах на первом этапе, изучаемое соединение вводили в виде субстанции в дозах 10, 50, 100, 300, 500, 1000, 2000, 3000 и 5000 мг/кг. В эксперименте было использовано по 10 мышей в каждой из групп.

* Выражаем благодарность сотрудникам лаборатории токсикологии НЦИЛС к. б. н. Татьяне Дмитриевне Денисовой, к. б. н. Елене Александровне Кузубовой за помощь при выполнении экспериментов.

На втором этапе соединение РУ-1205 вводили в виде гранулята таблеток мышам в дозах 1000; 5000; 10000 и 20000 мг/кг, содержащий 50; 250; 500 и 1000 мг/кг АФС РУ-1205 соответственно (N = 6) и крысам в дозах 5000; 10000 и 20000 мг/кг (содержание каппа-агониста 250; 500 и 1000 мг/кг соответственно) (N = 5).

Группы интактного контроля не подвергались никаким манипуляциям. Группы контроля получали растворитель (дистиллированную воду) в максимально допустимом объеме (0,5 мл для мышей и 3,0 мл для крыс) (Арзамасцев Е.В., Березовская И.В., Верстакова О.Л. и др., 2012).

После введения веществ устанавливался непрерывный мониторинг состояния животных в течение 10 часов в индивидуальных камерах с последующей ежедневной оценкой состояния в течение 14 дней в общих клетках.

Хроническая токсичность на крысах

Исходно масса тела у животных в зависимости от пола составляла у крыс-самок 225–240 г, у самцов – 275–305 г. Активную фармацевтическую субстанцию РУ-1205 вводили внутривенно крысам в виде водного раствора в дозах 5,0; 50,0 и 500,0 мг/кг в течение 3 месяцев. Рандомизировано крысы были распределены на группы с равным количеством особей обоего пола (3 опытных и 1 контрольная группы). Контрольной группе крыс вводили отстоянную воду из расчета 2 мл/100 г.

В проводимых исследованиях изучали влияние АФС РУ-1205 на органы и системы животных при 3-месячном введении и одном месяце отмены введения в диапазоне доз терапевтического и токсического уровней.

В общем состоянии у животных ежедневно оценивали шерстный покров (опрятность, ухоженность, окрас), слизистые оболочки (чистоту и окрас), поведенческие реакции, пищевую и питьевую активности. В поведении обращали внимание на подвижность, безусловно-рефлекторные реакции на внешние раздражители (шумы, постукивания, болевые раздражители и др.). В период проведения исследований фиксировали динамику массы тела (еженедельно, CAS MW-1200, Южная Корея). На период окончания курса введения АФС РУ-1205 и через месяц отмены проводили исследование поведенческой активности (тест «открытое поле»), а также электрокардиографические, гематологические, биохимические и функциональные исследования, проводили патоморфологическую оценку внутренних органов и их тканей после эвтаназии и некропсии животных.

Для гематологических исследований периферическую кровь забирали из хвостовой вены и на гематологическом анализаторе (Abacus junior 2,75 realease, Diatron Messtechnik GmbH, Австрия) определяли следующие показатели: число эритроцитов ($1 \times 10^{12}/л$), число тромбоцитов ($1 \times 10^9/л$), число лейкоцитов ($1 \times 10^9/л$), относительное (%) количество палочкоядерных

гранулоцитов, сегментоядерных гранулоцитов, эозинофилов, базофилов, моноцитов и лимфоцитов. Используя аппарат Панченкова, определяли скорость оседания эритроцитов (СОЭ) (мм/час). В данном исследовании цветовой показатель (ЦП) эритроцитов был рассчитан по формуле $ЦП = (Hb \times 0,273)/Э$, где Hb – гемоглобин, а Э – количество эритроцитов. Для пересчета величин крыс использовался коэффициент 0,273. Определение времени свертывания крови проводилось с использованием метода Мас – Магро и измерялось в секундах.

Для проведения биохимических исследований взятую при декапитации центральную кровь центрифугировали при 3000 оборотах в минуту. После этого плазму отделяли с помощью микропипетки. Затем определяли в ммоль/л содержание глюкозы, общего холестерина, мочевины, креатинина, а также в мккат/л – активность ферментов: щелочной фосфатазы, аланиновой и аспарагиновой трансаминаз с использованием наборов Био-Ла Тест (Чехия, Лахема диагностика). Для определения общего белка использовался набор «Общий белок» производства Ольвекс Диагностикум (Россия).

Запись электрокардиограммы проводили на наркотизированных животных (водный раствор гексенала 60 мг/кг) при помощи трехканального кардиографа (ЭКЗТ-02, Аксион, Россия) во втором стандартном отведении.

В функциональных исследованиях на крысах в тестах с красителем бромсульфалеин (Sigma Aldrich, США) и гексеналом (60 мг/кг), проведенных по окончании введения и после отмены испытуемой субстанции соединения, исследовали поглотительно-выделительную и детоксицирующую функции печени. Для исследования экскреторной и реабсорбционной функциональной активности почек использовали нагрузочный тест с красителем феноловый красный.

В нагрузочном тесте краситель бромсульфалеин вводили подопытным крысам внутрибрюшинно в дозе 150 мг/кг (Тугаринова В.Н., Миклашевский Г. Г., Скобцова Г. Г., 1967), а через 45 мин определяли его остаточное содержание в сыворотке крови.

В эксперименте, проведенном по методике, предложенной М.С. Гижлярном в 1976 г., крысам внутрибрюшинно вводится 10%-й водный раствор гексенала в дозе 60 мг/кг. У животных было зафиксировано время латентного периода от введения гексенала до принятия бокового положения, а также продолжительность пребывания в этом положении (в минутах)

В работе была проведена функциональная проба с использованием фенолового красного в соответствии с рекомендациями Е.Б. Берхина и Ю.И. Иванова (Берхин Е.Б., Иванов Ю.И., 1972). Феноловый краситель был приготовлен в виде 1%-го раствора и вводился животным внутрибрюшинно. Параллельно с этим крысам вводили отстоянную воду через металлический зонд, объем воды составлял 2 мл на каждые 100 г массы животного. Затем крыс помещали в специальную камеру для сбора мочи на протяжении 2 часов. Для определения содержания

красителя в пробах мочи был использован колориметр КФК-2 (АООТ «Загорский оптико-механический завод» (ЗОМЗ), Россия). Расчет производился согласно формуле $K = 0,49 \times V \times E$, где K – количество выделившегося красителя в мг за 2 часа, V – объем выделенной мочи, $0,49$ – коэффициент пересчета, E – экстинкция пробы.

Патоморфологические исследования проводились по окончании 3-месячного курса введения АФС РУ-1205 и через 1 месяц после отмены введения.

Перед вскрытием животных подвергали декапитации при помощи гильотины (WPI, США). При проведении аутопсии осуществлялся осмотр внутренних органов. Для детального изучения микроструктуры животных, были выбраны следующие органы: головной мозг, сердце, легкие, тимус, печень, почки, надпочечники, желудок, отделы кишечника, включая тонкую и толстую часть, поджелудочная железа, селезенка и гонады.

Выделенные органы макроскопически осматривали на предмет выявления видимых изменений в окраске и размерах. В последующем органы взвешивали на электронных весах (CAS Corporation MW-120, Южная Корея). На основании данных веса животных и массы органов, рассчитывали коэффициенты масс органов (выражали в %). Далее для проведения гистологических исследований забирали часть органа, фиксировали, обезвоживали в этиловом спирте при помощи автолаборанта АТ-4, парафинировали. Полученные блоки разрезали на санном микротоме МС-2 (срезы толщиной от 3 до 5 мкм). Готовые срезы фиксировали на предметных стеклах, окрашивали гематоксилин-эозином для последующей микроскопии (ЛЮМАМ И2, окуляр 7 и объектив 40).

Хроническая токсичность на кроликах

Исходно масса тела кроликов в зависимости от пола составляла 2,3–2,8 кг у самок, 2,4–2,9 кг у самцов. В данном исследовании проводили ежедневное внутрижелудочное введение ГТ соединения РУ-1205 в пересчете на АФС в дозах 5, 50 и 500 мг/кг (100, 1000 и 10000 мг/кг ГТ соответственно). Продолжительность эксперимента составляла три месяца. Рандомизировано кролики были распределены на группы с равным количеством особей обоего пола (3 опытных и 1 контрольная группы). Контрольной группе кроликов вводили 1%-ю крахмальную взвесь 10 мл/кг.

В период проведения исследования ежедневно оценивали общее состояние животных, еженедельно – массу тела, по окончании 3-месячного курса введения соединения и через 1 месяц отмены фиксировали гематологические и биохимические показатели крови, ЭКГ, частоту дыхания, состояние мочи, проводили патоморфологические исследования.

В общем состоянии оценивали шерстный покров (его опрятность, ухоженность, частоту), слизистые оболочки (чистоту слизистых их окрас). В поведении кроликов обращали внимание

на подвижность, безусловно-рефлекторные реакции на внешние раздражители (шумы, постукивания, болевые раздражители и др.), потребность в корме и питье.

Массу тела кроликов измеряли на электронных односторонних весах (Vicoint, Венгрия) еженедельно. Вес тела выражали в кг, прирост массы тела относительно исходных значений отмечали в %. Потребление корма и питья отслеживали у животных визуально.

Влияние ГТ РУ-1205 на состояние сердечно-сосудистой системы оценивали по электрокардиограмме на наркотизированных животных (тиопентал натрия 50 мг/кг, внутривенно). Запись ЭКГ проводили на трехканальном электрокардиографе ЭКЗТ-02 (Ижевск, «АКСИОН») во втором стандартном отведении.

Частоту дыхания (количество актов/мин) подсчитывали визуально у наркотизированных кроликов (тиопентал натрия 50 мг/кг, внутривенно).

Для гематологических исследований периферическую кровь забирали из краевой ушной вены и на гематологическом анализаторе (Abacus junior 2,75 release, Diatron Messtechnik GmbH, Австрия) определяли следующие показатели: число эритроцитов ($1 \times 10^{12}/л$), число тромбоцитов ($1 \times 10^9/л$), число лейкоцитов ($1 \times 10^9/л$), относительное (%) количество палочкоядерных гранулоцитов, сегментоядерных гранулоцитов, эозинофилов, базофилов, моноцитов и лимфоцитов. Используя аппарат Панченкова, определяли СОЭ (мм/час). В данном исследовании ЦП эритроцитов был рассчитан по формуле $ЦП = (Hb \times 0,273)/Э$, где Hb – гемоглобин, а Э – количество эритроцитов. Для пересчета величин кроликов использовался коэффициент 0,273. Определение времени свертывания крови проводилось с использованием метода Мас – Магро и измерялось в секундах.

Для детального анализа биохимических свойств крови использовали взятую из бедренной вены кровь, центрифугировали, отбирали плазму. Были измерены уровни в ммоль/л: глюкозы, общего холестерина, мочевины, креатинина, а также активность печеночных ферментов [АЛАТ, АСАТ, ЩФ (мккат/л)]. Для этого использовались высокочувствительные наборы Био-Ла Тест (Чехия, Лахема диагностика). Общий белок (г/л) определяли, используя набор «Общий белок» (Россия, Ольвекс Диагностикум).

Мочу для исследования забирали у наркотизированных кроликов (тиопентал натрия, 50 мг/кг) из мочевого пузыря. С помощью индикаторных диагностических полосок (ООО «Биоскан» Россия) в моче у кроликов определяли наличие белка (мг/100 мл), глюкозы (ммоль/л), кетоновых тел и рН.

Патоморфологические исследования. Перед вскрытием животных наркотизировали внутрибрюшинным введением тиопентала натрия (60 мг/кг). После эвтаназии на аутопсии у животных проводился визуальный осмотр внутренних органов на предмет выявления видимых внешне изменений в окраске и размерах. Для оценки влияния изучаемого соединения на

организм при хроническом введении были выбраны следующие органы: головной мозг, сердце, легкие, тимус, печень, почки, надпочечники, желудок, отделы тонкого и толстого кишечника, поджелудочная железа, селезенка и гонады.

В последующем органы выделяли, взвешивали на электронных весах (CAS Corporation MW-120, Южная Корея). На основании данных веса животных и массы органов рассчитывали коэффициенты масс органов (выражали в %). В последующем для проведения гистологических исследований, забирали часть органа, фиксировали, обезвоживали в этиловом спирте при помощи автолаборанта АТ-4, парафинировали. Полученные блоки разрезали на санном микротоме МС-2 (срезы толщиной от 3 до 5 мкм). Готовые срезы фиксировали на предметных стеклах, окрашивали гематоксилин-эозином для последующей микроскопии (ЛЮМАН И2, окуляр 7 и объектив 40).

Влияние на процессы репродукции

В рамках данной работы было выполнено исследование воздействия АФС РУ-1205 на процессы репродукции с использованием методических подходов, описанных в руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Дурнев А.Д., Смольникова Н.М., 2012). В первую очередь было исследовано влияние АФС РУ-1205 на генеративную функцию. Далее было проведено изучение эмбрио- и фетотоксического действия данного соединения, которое регистрируется в антенатальном и постнатальном периодах развития

Влияние на генеративную функцию крыс

Перед началом исследования животных распределяли по группам (с использованием метода рандомизации по массе тела $\pm 10\%$): контроль и опыт (Таблица 2.1). Опытным группам ежедневно внутрижелудочно вводили АФС РУ-1205 (для получения раствора использовали очищенную воду). Первая доза (экспериментально доказанная терапевтическая) составляла 5 мг/кг; вторая – 500 мг/кг, которая превышала терапевтическую дозу в 100 раз. Группа контрольных животных содержалась в идентичных опытным группам условиям, но вместо исследуемого соединения животные получали очищенную воду. Длительность введения испытуемого соединения составляла 2 месяца для самцов крыс (приблизительно один цикл сперматогенеза) и 15 дней для самок крыс (3–4 эстральных циклов).

Влияние субстанции АФС РУ-1205 на генеративную функцию крыс оценивали по показателям полового поведения, сперматогенеза и овогенеза, способности к оплодотворению у самцов и к оплодотворяемости у самок.

Таблица 2.1 – Распределение животных по экспериментальным группам при изучении генеративной функции крыс

№п/п	Группа	Количество особей	Вводимое вещество	Доза
Самцы				
1	Контроль	19	Вода очищенная	20 мл/кг
2	Опыт-1	14	АФС РУ-1205	5 мг/кг
3	Опыт-2	19	АФС РУ-1205	500 мг/кг
4	Интактные животные*	30	–	–
Самки				
1	Контроль	22	Вода очищенная	20 мл/кг
2	Опыт-1	22	АФС РУ-1205	5 мг/кг
3	Опыт-2	22	АФС РУ-1205	500 мг/кг
4	Интактные животные**	48	–	–

* – использовались для спаривания в исследованиях с самками крыс из контрольной и опытных групп; ** – использовались для спаривания в экспериментах на самцах из контрольной и опытных групп.

Опыты на самцах

Половое поведение у самцов в паре с интактной крысой-самкой исследовали в «площадке зоосоциальных предпочтений» (ПЗП) после окончания 2-месячного курса введения изучаемого соединения.

В период проведения исследований испытуемого самца за 5 минут до начала тестирования помещали в центральную зону площадки, затем в эту же зону подсаживали эстрирующую крысу-самку. Наблюдения за животными вели в полной темноте при инфракрасном освещении в течение 1 часа. За данный промежуток времени регистрировали: латентный период половой активности [время (в секундах) от подсадки самки до первого проявления самцом элементов «эмоционального» поведения, выражающегося в форме обнюхивания, груминга, облизывания гениталий]; подсчитывали количество таких подходов самца к самке; суммировали длительность «эмоциональных» подходов, что интерпретировали как длительность половой активности (в секундах); отмечали количество покрытий самцом самку с интрамиссиями и без них.

Для оценки сперматогенеза часть самцов (по 5 особей из каждой группы) подвергали эвтаназии методом декапитации с помощью гильотины (ООО «НПК Открытая Наука», Москва, Россия). При некропии у самцов выделяли семенники и эпидидимисы, которые макроскопически осматривали, взвешивали, определяли коэффициенты масс (массу гонад выражали в граммах, коэффициенты масс – в процентах). Фиксация семенников производилась

в 10%-м растворе нейтрального формалина для дальнейшей гистологической обработки тканей и проведения последующих морфологических исследований. Из эпидидимисов извлекали семенную жидкость и подсчитывали следующие показатели спермограммы: общее количество сперматозоидов, содержание в них неподвижных и патологических форм (в %), время подвижности сперматозоидов (в минутах), кислотную (рН) и осмотическую резистентность. Вышеописанные манипуляции проводились в соответствии с методическими рекомендациями, описанными Саноцким И.В., Фоменко В.И. и др. в 1978 г.

Состояние сперматогенеза оценивали на срезах окрашенных гонад по следующим показателям:

1. Индекса сперматогенеза [подсчитывали в 100 канальцах по 4-балльной системе (Fogg L.C., Cowing R.F., 1951)], при этом фиксировали в каждом канальце наличие сперматогоний, сперматоцитов I и II порядков, сперматид и сперматозоидов.
2. Среднего количества сперматогоний (их подсчитывали в 100 канальцах).
3. Числа канальцев со слущенным сперматогенным эпителием (в 100 канальцах).
4. Количества канальцев с XII стадией мейоза (в 100 канальцах).

Впоследствии в отдельной серии экспериментов (через два месяца после окончания введения АФС) у части оставшихся самцов крыс также исследовали отдаленные эффекты влияния испытуемой субстанции в дозе 500 мг/кг на состояние сперматогенеза, оценку которого проводили согласно вышеизложенным методическим подходам.

Опыты на самках

По окончании 15-дневного курса введения изучаемого соединения у самок крыс исследовали половое поведение с использованием вышеописанного методического подхода. У тестируемых эстрирующих самок в паре с интактными самцами оценивали: длительности латентного периода первого «эмоционального» подхода самки к самцу (в минутах), подсчитывали количество таких «эмоциональных» подходов к самцу, общую продолжительность половой активности (в минутах) и число лордозов, которые свидетельствовали о готовности самки к спариванию с самцом.

Изучение эстрального цикла у самок крыс, проводили с использованием методических подходов, описанных в руководстве по проведению доклинических исследований (Гуськова Т.А., Смольникова Н.М. и др., 2001; Дурнев А.Д., Смольникова Н.М., Гуськова Т.А., 2012). С этой целью в период с 4-го по 15-й дни введения изучаемого соединения у самок проводили ежедневное микроскопическое исследование вагинального мазка, соблюдая правила одного часа.

В другой серии экспериментов исследовали влияние субстанции на оплодотворяющую функцию самцов и способность к оплодотворяемости у самок (Саноцкий И.В., Фоменко В.И. и др., 1978).

др., 1978). Спаривание тестируемых животных проводили в течение 10 дней. Для этой цели были сформированы варианты спариваний, представленные в таблице 2.2.

Измерения массы тела у исследуемых самок крыс проводили до начала спаривания с самцами и через 10 и 20 дней после него. Через 10 дней самцов отсаживали от самок. За самками вели наблюдения ещё 10 дней. На 20-й день эксперимента самок крыс подвергали эвтаназии (методом дислокации шейных позвонков) и некропсии (Дурнев А.Д., Смольникова Н.М., Гуськова Т.А., 2012). Затем у самок выделяли яичники и рога матки, которые подвергались тщательному визуальному осмотру. В рогах матки определяли наличие беременности и по соотношению количества спариваемых и беременных самок вычисляли индекс беременности (ИБ) по формуле $ИБ = (n/2) \times 100$, где n – это число беременных самок на каждого самца.

Таблица 2.2 – Распределение животных по экспериментальным группам при изучении оплодотворяющей способности самцов и оплодотворяемости у самок

№п/п	Исследуемая группа	Вводимое вещество	Доза	Интактная группа	Соотношение особей (групп исследуемых к интактным)
1	Самцы	АФС РУ-1205	5 мг/кг	Самки	1 : 2
2	Самцы	АФС РУ-1205	500 мг/кг	Самки	1 : 2
3	Самки	АФС РУ-1205	5 мг/кг	Самцы	2 : 1
4	Самки	АФС РУ-1205	500 мг/кг	Самцы	2 : 1
5	Самцы	Вода очищенная	20 мл/кг	Самки	1 : 2
6	Самки	Вода очищенная	20 мл/кг	Самцы	2 : 1

В яичниках беременных крыс проводили подсчет количества желтых тел беременности (Боровая Т.Г., Волкова О.В., 1994). В рогах матки у беременных самок подсчитывали общее количество имплантированных плодов, а также число живых плодов, наличие резорбций, определяли срок беременности. В дальнейшем, на основании полученных результатов рассчитывали эмбриональную гибель до- и постимплантационную. При этом использовали следующие формулы:

$$\text{Доимплантационная гибель ДИ} = \frac{\text{ЖП} - \text{ИП}}{\text{ЖТ}} * 100\%$$

$$\text{Постимплантационная гибель ПИ} = \frac{\text{ИП} - \text{ЖП}}{\text{ИП}} * 100\%$$

где ЖТ – желтые тела (их количество); ИП – число имплантированных плодов; ЖП – количество живых плодов.

Для определения массы яичников самок в исследовании использовались торсионные весы. Для оценки отношения массы яичников к массе тела животного рассчитывали коэффициент массы органа.

Эмбрио- и фетотоксическое действие изучаемого соединения

Эксперимент был проведен с использованием виргинных самок, в фазе эструса, спариваемых с самцами в соотношении 2 : 1 (Кирющенков Л.П., Тараховский М.Л., 1990) согласно методическим указаниям по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и влияния их на репродуктивную функцию (1986 г.). Утром на следующий день анализировали вагинальные мазки у самок на наличие сперматозоидов, и первый день их обнаружения был установлен как начало беременности. Забеременевших крыс-самок размещали в индивидуальные клетки на весь период наблюдений.

Исследование проводили в два этапа. На первом этапе оценивали эмбрио-фетотоксическое действие АФС РУ-1205, регистрируемое в антенатальном периоде развития плодов. С этой целью исследуемое соединение вводили крысам-самкам в период органогенеза с 6-го по 16-й день беременности в дозах 5, 50, 500 мг/кг. На втором этапе оценивали эмбрио-фетотоксическое действие АФС РУ-1205 на процессы постнатального развития потомства. С этой целью исследуемую субстанцию вводили беременным самкам с 6-го дня по 20-й день в дозе 500 мг/кг.

При проведении *первого этапа* исследований беременные самки были распределены на группы (Таблица 2.3).

Таблица 2.3 – Распределение беременных самок по экспериментальным группам при изучении эмбрио- и фетотоксического действия соединения (с 6-й по 16-й дни беременности, перорально)

№п/п	Группа	Количество особей	Вводимое вещество	Доза
1	Контроль	20	Вода очищенная	20 мл/кг
2	Опыт-1	20	АФС РУ-1205	5 мг/кг
3	Опыт-2	20	АФС РУ-1205	50 мг/кг
4	Опыт-3	20	АФС РУ-1205	500 мг/кг

В наблюдениях у беременных самок исследовали общее состояние, динамику массы тела. Измерение массы тела у беременных самок проводили на электронных весах МК-6.2-А20 на первый, шестой, шестнадцатый и двадцатый дни беременности. Вес тела выражали в г, а прирост относительно первого дня – в %.

В ходе исследования оценивали влияния АФС РУ-1205 на процессы органогенеза потомства крыс. Для этого согласно вышеописанной методике на двадцатый день беременности определяли до- и постимплантационную гибель плодов. Затем эмбрионы, выделенные из рогов матки, были очищены от слизистых оболочек и подвергнуты макроскопическому обследованию для выявления внешне видимых аномалий развития. После этого плоды были взвешены (на электронных весах MW-120). Кроме того, были измерены их кранио-каудальные размеры в сантиметрах и определен их пол. Затем плоды от каждого помета были разделены на две группы. У первой группы, составляющей $\frac{1}{3}$ от общего количества, изучали состояние внутренних органов по методу Вильсона (для этого плоды фиксировали в жидкости Буэна). У плодов второй группы, составляющую $\frac{2}{3}$ от общего количества, изучали состояния скелета по методу Доусона (фиксировали в 96%-м этаноле и окрашивали ализарином).

На втором этапе изучения эмбрио- и фетотоксического действия АФС РУ-1205, регистрируемого в постнатальном периоде развития, формировали следующие группы:

1. Контрольная группа. Фиксированные пометы крысят (по 6 особей), рожденные от 10 беременных самок, которым с 6-го по 20-й дни беременности внутрижелудочно вводили очищенную воду в дозе 20 мл/кг;

2. Опытная группа. Фиксированные пометы крысят (по 6 особей), рожденные от 10 беременных самок, которым с 6-го по 20-й дни беременности внутрижелудочно вводили АФС РУ-1205 в дозе 500 мг/кг.

Оценивали состояние матерей и состояние потомства (с 1-го дня жизни в течение 2 месяцев). В период наблюдений у беременных самок отмечали прирост массы тела, общее состояние. Во время родов регистрировали состояние помета и от каждого помета у крыс матерей оставляли по 6 крысят. Наблюдения за этими самками вели до окончания периода лактации (≈ 1 месяц). В наблюдениях за потомством у крысят отмечали физическое развитие и формирование сенсорно-двигательных рефлексов. Изучали двигательное поведение у 20-дневных крыс, поведенческую активность (у 45-дневных крыс) и мнестические реакции (у 60-дневных крыс).

В физическом развитии у потомства следили за динамикой прироста массы тела, которую начинали измерять с 4-го дня жизни, еженедельно до 2-месячного возраста. В данном исследовании также рассматривались различные аспекты их физического развития (в днях), такие как: отлипание ушной раковины, появление волосяного покрова, прорезывание резцов, открытие глаз, поднятие головы, опускание семенников и открытие влагалища. Оценка этих параметров производилась визуально в течение всего периода наблюдений. Кроме того, также отмечали формирование сенсорно-двигательных рефлексов (в днях), таких как «переворачивание на плоскости», «отрицательный геотаксис» и «мышечная сила». Оценка

развития этих рефлексов также регулярно проводилась в течение всего периода наблюдений. Изучение двигательного поведения проводили классическим методом «открытое поле», у крысят в 20- и 45-дневном возрасте (Буреш Я., Бурешова О., 1991; Воронина Т.А., 2012). В ходе эксперимента осуществляли мониторинг различных видов активности животных. Была зафиксирована горизонтальная двигательная активность (ГДА), измеряемая количеством пересеченных квадратов. Вертикальная (ВДА) была определена по числу случаев вставания на задние лапки. Также учитывали эмоциональную активность, измеряемую количеством актов дефекации. Во время эксперимента, перед началом тестирования животное помещали в центральный квадрат установки. Наблюдения проводили в течение трёх минут.

При изучении *мнестических реакций* у 60-дневных крысят оценивали обучаемость и память с использованием теста УРПИ. Тестируемого крысенка помещали в светлый отсек, хвостом к темному отсеку. Во время эксперимента регистрировали: латентный период [время первого захода в темную (опасную) камеру (с)] и количество заходов в данную камеру (отсек). В темном отсеке крысенок подвергался (через электродный пол) трехкратному электроболевому воздействию (напряжение воздействия соответствовало порогу вокализации равному 35 V), с интервалом между импульсами 0,5 с. Тест на спонтанную амнезию проводился через три дня после эксперимента для определения обучения животного. Признаком успешного обучения являлось отсутствие возвращения животного в темный отсек камеры в течение 30 секунд после начала сессии. При этом тестируемого крысенка вновь помещали в светлый отсек камеры, а в последующем в течение 3 мин у него регистрировали латентный период захода в темную камеру и количество заходов в нее.

Генотоксические свойства (тест ДНК-комет)

В соответствии с рекомендациями, изложенными А.Д. Дурневым и В.А. Меркуловым (Дурнев А.Д., Меркулов В.А., 2012) по проведению щелочного гель-электрофореза отдельных клеток, оценивали повреждение ДНК – генотоксические свойства изучаемого соединения *. Кроме того, исследование проводилось согласно руководству ICH M3(R2) и S2(R1), а также руководству OECD/OCDETG 489.

Животные были разделены на группы (Таблица 2.4). Все манипуляции с животными в контрольных и всех опытных группах были идентичными, в целях соблюдения необходимых условий ввиду высокой чувствительности метода. Исследование проводилось с использованием

* Выражаем благодарность заведующему кафедрой фундаментальной и клинической биохимии д. м. н., профессору Олегу Владимировичу Островскому за консультацию и помощь при проведении исследований.

прямого мутагена – метилметансульфоната внутривнутрибрюшинно в дозе 40 мг/кг. Мутаген вводили однократно за 4 часа до момента эвтаназии. Активную фармацевтическую субстанцию РУ-1205 вводили однократно внутривнутрибрюшинно или подкожно в различных дозах (Таблица 2.4) за 22 часа до умерщвления животного. В помещении, где отсутствуют другие животные, осуществлялась своевременная эвтаназия животных методом дислокации шейных позвонков крыс.

Таблица 2.4 – Распределение животных по экспериментальным группам при изучении генотоксического действия соединения

№п/п	Группа	Пол	Кол-во особей	Путь введения	Вводимое вещество	Количество
1	Контроль-1	♂	5	п/о	Вода очищенная	20 мл/кг
2	Контроль-2	♀	5	п/о	Вода очищенная	20 мл/кг
3	Опыт-1	♀	5	п/о	АФС РУ-1205	5 мг/кг
4	Опыт-2	♀	5	п/о	АФС РУ-1205	50 мг/кг
5	Опыт-3	♀	5	п/о	АФС РУ-1205	500 мг/кг
6	Опыт-4	♂	5	п/о	АФС РУ-1205	5 мг/кг
7	Опыт-5	♂	5	п/о	АФС РУ-1205	50 мг/кг
8	Опыт-6	♂	5	п/о	АФС РУ-1205	500 мг/кг
9	Контроль-3	♂	5	п/к	Натрия хлорид	0,9%, 0,5 мл
10	Контроль-4	♀	5	п/к	Натрия хлорид	0,9%, 0,5 мл
11	Опыт-7	♀	5	п/к	АФС РУ-1205	1 мг/кг
12	Опыт-8	♀	5	п/к	АФС РУ-1205	10 мг/кг
13	Опыт-9	♀	5	п/к	АФС РУ-1205	100 мг/кг
14	Опыт-10	♂	5	п/к	АФС РУ-1205	1 мг/кг
15	Опыт-11	♂	5	п/к	АФС РУ-1205	10 мг/кг
16	Опыт-12	♂	5	п/к	АФС РУ-1205	100 мг/кг
17	Позитивный контроль-1	♂	5	в/б	Метилметансульфонат	40 мг/кг
18	Позитивный контроль-2	♀	5	в/б	Метилметансульфонат	40 мг/кг

Примечание: ♂ – самцы; ♀ – самки; п/о – перорально; п/к – подкожно; в/б – внутривнутрибрюшинно.

Согласно ранее полученным данным по изучению фармакокинетики соединения РУ-1205, был осуществлен выбор органов для исследования (Spasov A.A., Eliseeva N.V., 2021; Spasov A.A., Smirnova L.A., Grechko O.I., 2021). Анализировали кровь, печень, почки, костный мозг, головной мозг, желудок.

Методика проведения ДНК-кометного анализа включала несколько этапов:

- а) подготовка предметных стекол;
- б) получение микропрепаратов;
- в) лизис клеток;
- г) инкубация в щелочном растворе;
- д) электрофорез (20 мин, $E=1$ В/см и $I \sim 300$ мА);
- е) фиксация микропрепаратов (10 мин, 70%-й этиловый спирт с последующим высушиванием на воздухе);
- ж) окрашивание микропрепаратов и микроскопический анализ. Полученные препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе при длине волны 530 нм. Изображения нуклеоидов фиксировали цифровым фотоаппаратом Samsung SMART Camera NX300;
- з) учёт результатов.

При оценке полученных микрофотографий с использованием программы CometScore2.0.0.38 выделяли две группы клеток. Те клетки, где не наблюдалось повреждения ДНК, отображались как ярко светящиеся точки (Рисунок 2.4А); клетки с дефрагментированной ДНК – как продолговатые образования, напоминающие кометы (отчетливо видны головка и хвост) (Рисунок 2.4Б). Апоптотические клетки, обнаруженные на микропрепаратах, не были включены в анализ из-за их слабой флуоресценции.

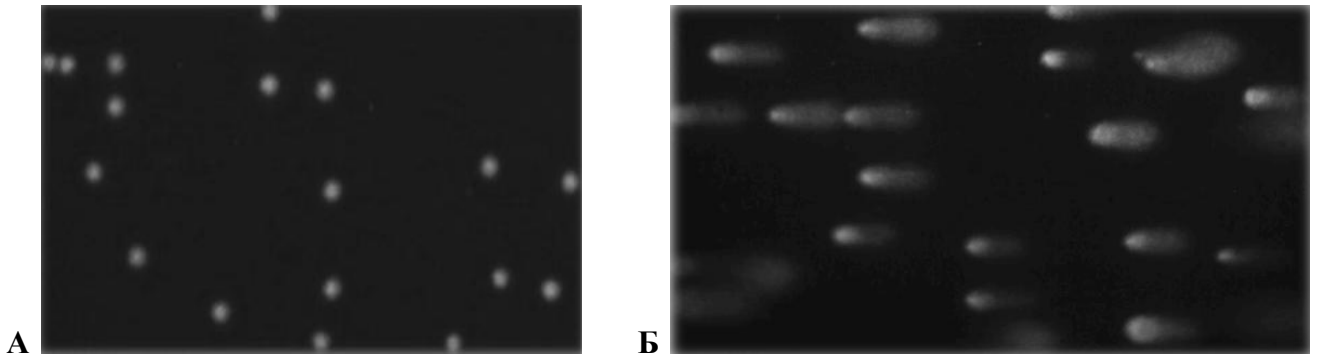


Рисунок 2.4. Результаты кометного анализа: А – интактные клетки, Б – клетки с повреждением ДНК

На каждом микропрепарате анализировали не менее 100 клеток. О наличии генотоксических свойств изучаемого соединения судили по процентному содержанию ДНК в «хвосте кометы» (%ДНК в хвосте комет), а также по индексу повреждения ДНК (ИП).

$$\text{ИП} = \frac{\text{«\% ДНК в хвосте кометы» в опытной группе}}{\text{«\% ДНК в хвосте кометы» в контрольной группе}}$$

Индекс повреждения ДНК больше 2 единиц расценивается как достоверный критерий наличия генотоксических свойств. Критерием корректности аналитических процедур служило сравнение результатов, полученных при исследовании клеток негативного контроля с эффектом мутагена прямого действия – метилметансульфоната; индекс повреждения выше 2.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов, полученных при исследовании фармакологических свойств соединения РУ-1205, проводилось пакетом программы GraphPad Prism7.0 с определением параметров $M \pm m$ и последующим использованием двухфакторного дисперсионного анализа (посттест Бонферрони).

При оценке параметров острой токсичности использовался подход, основанный на регрессионной статистике, с применением программных средств Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). Также для статистической обработки результатов исследований были использованы программы Statistica 6.0 (Dell, США) и GraphPad 6.0 (Dotmatics, США). Обработку экспериментальных данных ДНК-комет теста проводили с использованием пакета программ OriginPro 8 (OriginLab, США).

**ГЛАВА 3. АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1205
В ВИДЕ АКТИВНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ
И ГРАНУЛЯТА ТАБЛЕТОК В ТЕСТЕ *IN VIVO*
НА МОДЕЛИ СОМАТОГЕННОЙ БОЛИ**

Необходимо отметить, что исследование обезболивающей активности новых анальгетических лекарственных средств является неотъемлемой частью доклинических исследований. Так, для изучения анальгетических свойств АФС соединения РУ-1205 и ГТ, согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Воронина Т.А., Гувеватых Л.С., 2012), были выбраны два теста. Тест отдергивания хвоста от теплового излучения (tail flick) с детекцией латентного периода избавления от болевого раздражителя до, через 30, 60 и 90 минут после введения. Выбор временных точек обусловлен результатами ранее проведенных фармакокинетических тестов (Спасов А.А., Смирнова Л.А. и др. 2021), согласно полученным данным период полувыведения АФС РУ-1205 составил 1,44 часа.

При определении опиоидэргической специфичности изучаемого соединения использовали тест «горячая пластина» при предварительном введении неселективного антагониста налоксона и селективного каппа-опиоидного антагониста – норбиналторфимина.

В таблицах 3.1 и 3.2 представлены результаты, отражающие влияние АФС РУ-1205 на показатели латентного периода отдергивания хвоста у мышей-самцов.

Таблица 3.1 – Влияние морфина и АФС РУ-1205 на показатели латентного периода в тесте отдергивания хвоста у мышей-самцов

№ п/п	Вводимое соединение	Время экспозиции, мин	Латентный период, с
1	Контроль		3,95 ± 0,66
2	АФС РУ-1205, 5 мг/кг	30	5,22 ± 0,16*
		60	6,46 ± 0,36*
		90	6,96 ± 0,28*
3	Морфин 1 мг/кг	30	5,48 ± 0,77*
		60	6,04 ± 1,42*
		90	7,18 ± 2,65*

* – статистически значимые отличия от группы контроля 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$.

Таблица 3.2 – Влияние тримеперидина и ГТ РУ-1205 на показатели латентного периода в тесте отдергивания хвоста у мышей-самцов

№ п/п	Вводимое соединение	Время экспозиции, мин	Латентный период, с
1	Контроль		$3,76 \pm 0,69$
2	Гранулят таблеток РУ-1205, 5 мг/кг	30	$6,70 \pm 0,80^*$
		60	$6,86 \pm 0,76^*$
		90	$6,18 \pm 0,39^{* \#}$
3	Гранулят таблеток тримеперидина, 1 мг/кг	30	$6,31 \pm 0,66^*$
		60	$6,77 \pm 0,51^*$
		90	$4,93 \pm 0,91^*$

* – статистически значимые отличия от группы контроля 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$;

– статистически значимые отличия от группы препарата сравнения – тримеперидина, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$.

Показатели латентного периода отдергивания хвоста в контрольной группе внутрибрюшинного введения растворителя составили $3,95 \pm 0,66$. Во всех опытных группах зафиксированы статистически значимые различия с группой контроля в каждой из временных точек. Анальгетический эффект прогредиентно увеличивался с течением времени относительно группы контроля в группе, получавшей АФС РУ-1205 в 1,3; 1,6 и 1,8 раза через 30; 60 и 90 минут соответственно. В группе препарата сравнения морфина латентный период увеличивался относительно группы контроля в 1,3; 1,5 и 1,8 раза соответственно. При этом различий между опытными группами выявлено не было.

Показатели латентного периода отдергивания хвоста в контрольной группе внутривенного введения растворителя составили $3,76 \pm 0,69$. Статистически значимые различия с группой контроля в каждой из временных точек зафиксированы во всех опытных группах. Анальгетический эффект увеличивался с течением времени относительно группы контроля в группе, получавшей ГТ соединения РУ-1205 в 1,78; 1,82 и 1,64 раза через 30; 60 и 90 минут соответственно. В группе препарата сравнения тримеперидина латентный период увеличивался относительно группы контроля и достиг максимума через 60 минут, но уменьшался к 90 минуте. Вероятно, это связано с непродолжительным эффектом тримеперидина при пероральном введении. Статистически значимые различия между опытными группами зафиксированы лишь через 90 минут, где анальгетический эффект препарата сравнения уступал показателям латентного периода группы, получавшей ГТ РУ-1205. Полученные данные согласуются с результатами ранее проведенных исследований (Гречко О.Ю., Спасов А.А., Штарева Д.М., 2014).

Для подтверждения механизма действия ГТ РУ-1205 использовали высокоселективный каппа-агонист U-50.488 (5 мг/кг), антагонист опиоидных рецепторов налоксон (10 мг/кг) и селективный каппа-антагонист норбинаторфимин (10 мг/кг) в тесте «горячая пластина».

Диагностическим критерием термического раздражения является латентный период (ЛП) полизывания задней лапы. В контрольной группе животных он составил $(7,9 \pm 0,48)$ с.

В опытных группах животных, которым вводили АФС РУ-1205 (5 мг/кг), буторфанола тартрат (5 мг/кг), U-50.488 (5 мг/кг), величина латентного периода статистически значимо превосходила контрольные значения и составляла около 14 с ($p < 0,05$), что согласуется с результатами ранее проведенных исследований (Гречко О.Ю., Спасов А.А., Штарева Д.М., 2014). Предварительное введение налоксона уменьшало активность комбинации препаратов относительно группы АФС РУ-1205 в 6,3 раза ($p < 0,05$), а группы буторфанола – в 4,1 раза ($p < 0,05$) (Рисунок 3.1).

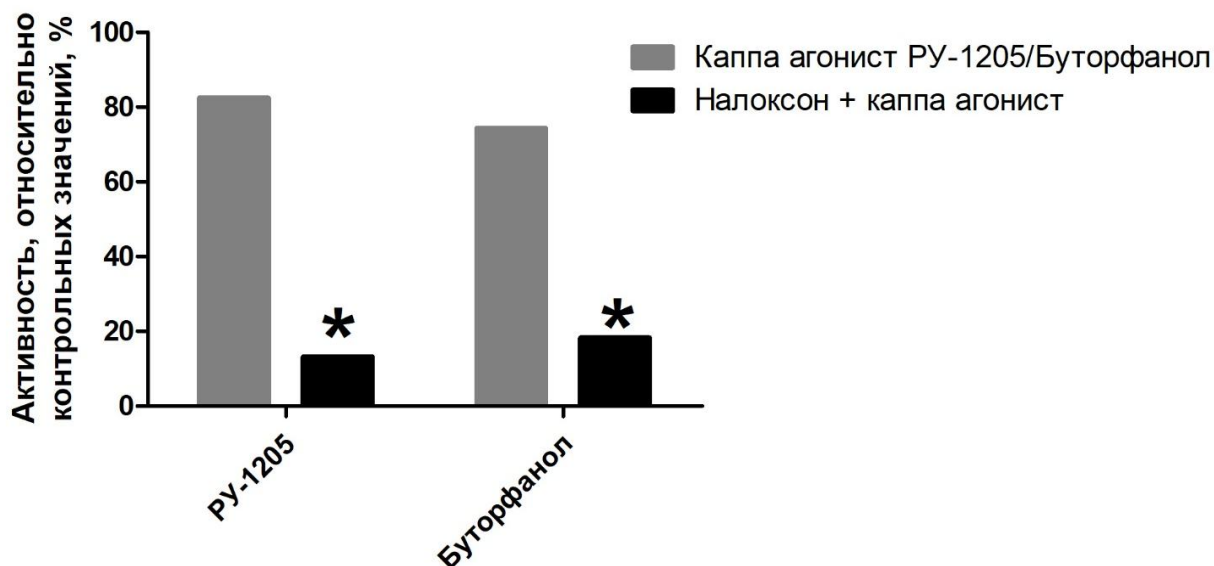


Рисунок 3.1. Анальгетическая активность АФС РУ-1205 и препарата сравнения буторфанола тартрата в тесте «Горячая пластина» при однократном внутривенном введении мышам-самцам и в комбинации с налоксоном. Условные обозначения: * – статистически значимые отличия с группой, получавшей только изучаемое соединение или препарат сравнения соответственно ($p < 0,05$)

Норбинаторфимин (высокоселективный антагонист КОА) предварительно вводили животным из опытных групп, получавшим АФС РУ-1205 и U-50.488. При комбинировании исследуемых веществ в тесте «горячая пластина» активность статистически значимо уменьшалась в 5,1 раза относительно группы АФС РУ-1205 ($p < 0,05$) и в 2,6 раза относительно U-50.488 ($p < 0,05$) (Рисунок 3.2).

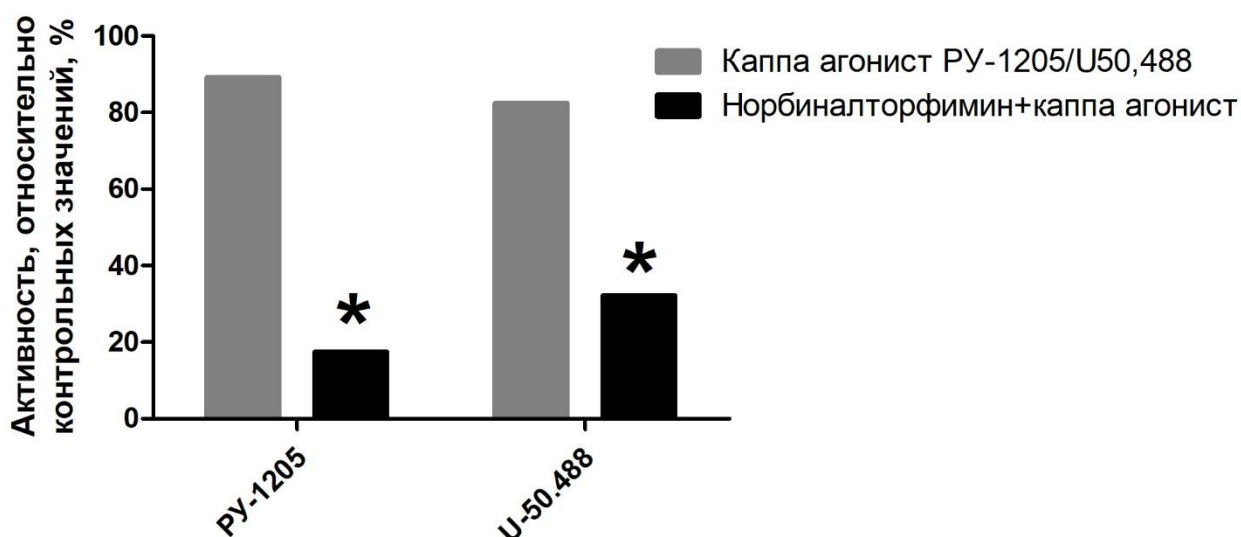


Рисунок 3.2. Анальгетическая активность АФС РУ-1205 и препарата сравнения U-50,488 в тесте «Горячая пластина» при однократном внутривнутрибрюшинном введении мышам-самцам и в комбинации с норбиалторфиминном. Условные обозначения: * – статистически значимые отличия с группой, получавшей только изучаемое соединение или препарат сравнения соответственно ($p < 0,05$)

Установлено, что соединение РУ-1205 обладает выраженными анальгетическими свойствами как в форме активной фармацевтической субстанции, так и в виде ГТ. Обезболивающая активность изучаемого вещества уступает морфина гидрохлориду, но превосходит тримеперидин. При сочетании соединения РУ-1205 с антагонистом КОА норбиалторфиминном обнаруживается нивелирование анальгетического эффекта изучаемого соединения. В результате установленные значения латентного периода в данной группе, практически совпадают с контрольной группы. Полученные данные позволяют сделать вывод о каппа-опосредованном механизме анальгезии соединения РУ-1205.

ГЛАВА 4. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1205 С АДЬЮВАНТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ НА МОДЕЛИ СОМАТОГЕННОЙ БОЛИ

Согласно трехступенчатой лестнице обезболивания на второй ступени опиоидные анальгетики комбинируют в том числе с адьювантными препаратами (Crush J., Levy N., 2022). К их числу относятся лекарственные препараты из групп: антидепрессантов, противосудорожных средств, бензодиазепинов, бисфосфонатов, агонистов гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), антагонистов N-метил-D-аспартата (NMDA), нестероидных противовоспалительных средств, а также клонидин (Khan M.I., Walsh D., Brito-Dellan N., 2011). Их совместное назначение позволяет уменьшить дозу опиоидов, а значит свести к минимуму возможность развития зависимости и толерантности. Помимо этого, некоторые группы адьювантных препаратов применяются в качестве длительной терапии сопутствующих состояний (бессонницы, тревожности, депрессии, онкологических заболеваний) и в таком случае агонисты ОР применяются в дополнение к уже имеющимся препаратам. Необходимо учитывать эффект таких комбинаций, так как возможно ослабление анальгетических свойств опиоидов (Akbari E., Mirzaei E., 2018).

При изучении влияния адьювантных препаратов на выраженность анальгетического эффекта АФС РУ-1205 установлена неоднородность эффектов (Таблица 4.1). Показатели контрольной группы в среднем не превосходили 4 секунд.

При совместном введении с агонистами опиоидных рецепторов клонидин значительно потенцировал анальгетический эффект морфина и АФС РУ-1205 (Рисунок 4.1). Максимально возможный эффект (МВЭ), по сравнению с группами одиночного введения опиоидных средств достоверно увеличивался (на 45, 27 и 44 % для морфина и на 59, 46 и 42 % для соединения РУ-1205) ($p < 0,05$).

Максимально возможный эффект значительно увеличивался при одновременном введении галоперидола и морфина, превышая показатели группы, получавшей только морфин, в 2,3, 1,8 и 2,8 раза в каждой из временных точек соответственно (Рисунок 4.2) ($p < 0,05$). В случае совместного введения галоперидола и АФС РУ-1205, МВЭ через 30 минут был на 9 ед. выше, чем в группе, получавшей только каппа-агонист. Различий в других точках в данной группе не было обнаружено.

Таблица 4.1 – Влияния адьювантных препаратов на анальгетическую активность морфина и АФС РУ-1205 в тесте отдергивания хвоста у мышей-самцов

№ п/п	Препарат или комбинация	Латентный период, М ± m, секунды		
		30 мин	60 мин	90 мин
1	Контроль (среднее)	3,59 ± 0,47	3,93 ± 0,47	3,59 ± 0,47
2	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг (среднее)	5,12 ± 0,12*	6,38 ± 0,44*	6,80 ± 0,36*
3	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг (среднее)	5,48 ± 0,35*	6,04 ± 0,42*	7,08 ± 0,65*
4	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + клонидин, 1 мг/кг	10,98 ± 1,55*#	9,50 ± 1,23*#	11,14 ± 1,56*#
5	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + клонидин, 1 мг/кг	11,9 ± 1,52*#§	11,7 ± 1,54*#§	11,66 ± 1,56*#§
6	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + галоперидол, 0,45 мг/кг	8,86 ± 0,6*#	8,63 ± 0,46*#	10,48 ± 0,69*#
7	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + галоперидол, 0,45 мг/кг	6,14 ± 0,43*#	6,20 ± 0,49*	7,12 ± 0,9*#
8	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + метоклопрамид, 5 мг/кг	6,53 ± 0,65*#	7,23 ± 0,82*#	6,93 ± 0,63*
9	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + метоклопрамид, 5 мг/кг	5,91 ± 0,31*	6,30 ± 0,53*	5,77 ± 0,48*#§
10	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + диазепам, 1 мг/кг	4,17 ± 0,38#	3,88 ± 0,61#	3,78 ± 0,37#
11	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + диазепам, 1 мг/кг	4,81 ± 0,64*	5,47 ± 0,60*	6,04 ± 0,41*#
12	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + мидазолам, 0,3 мг/кг	5,46 ± 0,99*	6,35 ± 0,75*	6,23 ± 0,55*
13	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + мидазолам, 0,3 мг/кг	6,36 ± 0,31*§	6,42 ± 0,83*	6,27 ± 0,43*
14	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + атропин, 2,7 мг/кг	5,50 ± 0,55*	5,46 ± 0,97*	5,80 ± 0,51*#
15	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + атропин, 2,7 мг/кг	4,60 ± 0,40*#	4,12 ± 0,77*#§	4,08 ± 0,71*#§
16	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + габапентин, 90 мг/кг	7,05 ± 0,57*#	7,92 ± 0,76*#	7,07 ± 0,81*
17	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + габапентин, 90 мг/кг	5,07 ± 0,97*	5,92 ± 0,26*	6,07 ± 1,19*#
18	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + амитриптилин, 3 мг/кг	3,09 ± 0,42#	5,08 ± 1,04*#	5,15 ± 0,27*#
19	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + амитриптилин, 3 мг/кг	4,36 ± 0,50#	4,60 ± 0,39*#§	4,96 ± 0,37*#§
20	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + карбамазепин, 15 мг/кг	7,53 ± 0,29*#	8,05 ± 0,67*#	6,70 ± 0,67*
21	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + карбамазепин, 15 мг/кг	3,93 ± 0,24*#§	3,94 ± 0,47*#§	4,50 ± 0,61*#§

* – статистически значимые отличия от группы контроля, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$; # – статистически значимые отличия от группы препарата сравнения – морфина, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$; § – статистически значимые отличия от группы АФС РУ-1205, 2way ANOVA, посттест Бонферрони, $p < 0,05$.

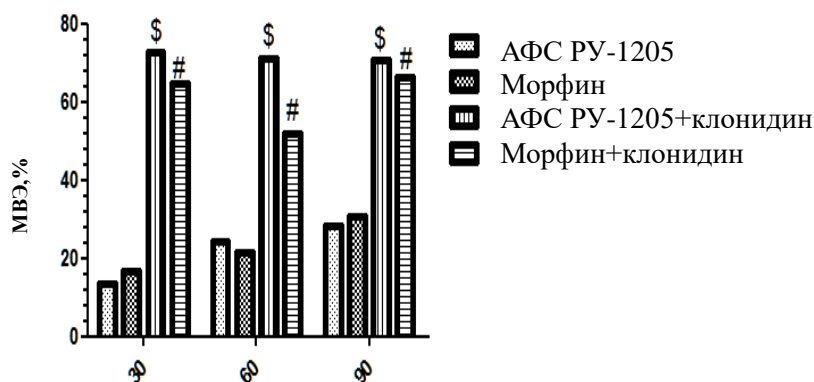


Рисунок 4.1. Изменение обезболивающей активности АФС РУ-1205 и препарата сравнения – морфина при совместном введении с клонидином в тесте отдергивания хвоста от теплового излучения у мышей-самцов. Условные обозначения: по оси абсцисс – максимально возможный эффект, МВЭ, %; по оси ординат – длительность экспозиции (минуты); # – статистически значимые отличия от группы морфина, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$; \$ – статистически значимые отличия от группы АФС РУ-1205, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$

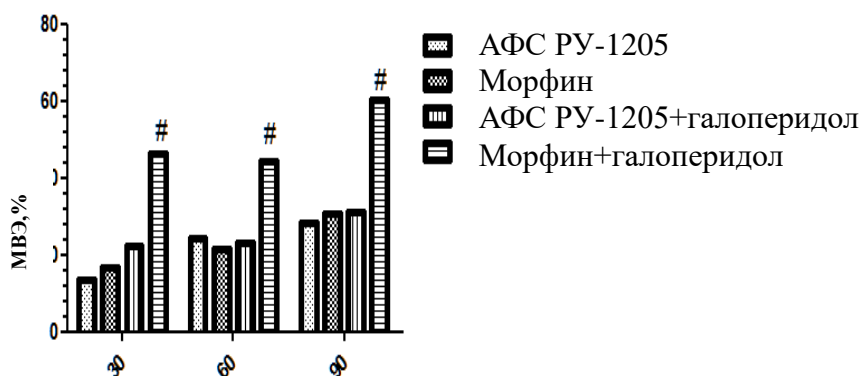


Рисунок 4.2. Изменение обезболивающей активности АФС РУ-1205 и препарата сравнения морфина при совместном введении с галоперидолом в тесте отдергивания хвоста от теплового излучения у мышей самцов. Условные обозначения: по оси абсцисс – максимально возможный эффект, МВЭ, %; по оси ординат – длительность экспозиции (минуты); # – статистически значимые отличия от группы морфина, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$; \$ – статистически значимые отличия от группы АФС РУ-1205, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$

По результатам проведенных экспериментов установлено, что метоклопрамид при одновременном введении его с морфином приводит к увеличению анальгетического эффекта опиоида через 30 и 60 минут после введения (Рисунок 4.3). Максимально возможный эффект при этом увеличивался в среднем на 10 единиц. Однако при совместном введении метоклопрамида и АФС РУ-1205 увеличение МВЭ зафиксировано через 30 минут и составляло 7 единиц, но через 90 минут показатель МВЭ снижался на 9 единиц.

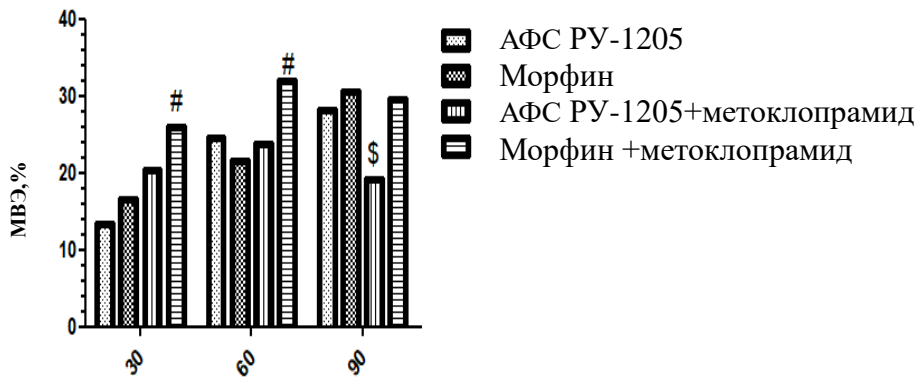


Рисунок 4.3. Изменение обезболивающей активности АФС РУ-1205 и препарата сравнения морфина при совместном введении с метоклопрамидом в тесте отдергивания хвоста от теплового излучения у мышейсамцов. Условные обозначения: по оси абсцисс – максимально возможный эффект, МВЭ, %; по оси ординат – длительность экспозиции (минуты); # – статистически значимые отличия от группы морфина, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$; \$ – статистически значимые отличия от группы АФС РУ-1205, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$

В группе животных, которым вводили диазепам совместно с морфином, отмечено подавление анальгетического эффекта опиоида во всех временных точках до уровня контрольных значений (Рисунок 4.4). Полученные результаты согласуются с литературными данными о ранее проведенных исследований Gear, Robert W. (1997) и Nemmani K.V. Mogil (2003). При этом наблюдается незначительное снижение анальгетической активности соединения РУ-1205 при совместном введении с диазепамом.

Мидазолам практически не влиял на выраженность морфиновой анальгезии при их совместном введении ($p < 0,05$) (Рисунок 4.5). При изучении взаимодействия АФС РУ-1205 с мидазоламом установлено, что агонист бензодиазепиновых рецепторов в 1,8 раза потенцирует анальгетический эффект каппа-агониста через 30 минут, но в точках 60 и 90 мин различий не наблюдалось.

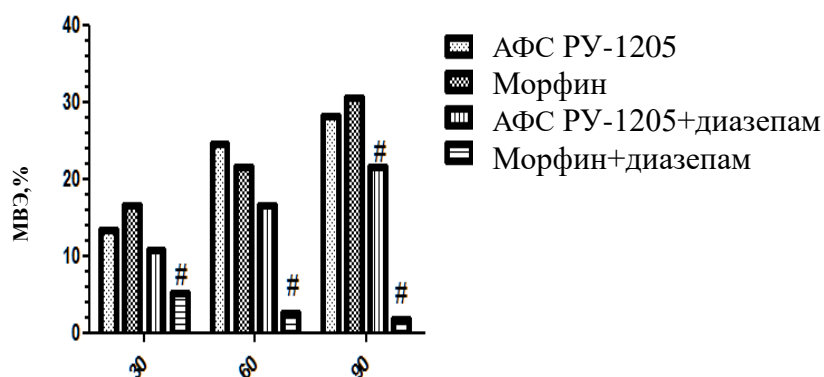


Рисунок 4.4. Изменение обезболивающей активности АФС РУ-1205 и препарата сравнения морфина при совместном введении с диазепамом в тесте отдергивания хвоста от теплового излучения у мышей самцов. Условные обозначения: по оси абсцисс – максимально возможный эффект, МВЭ, %; по оси ординат – длительность экспозиции (минуты); # – статистически значимые отличия от группы морфина, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$

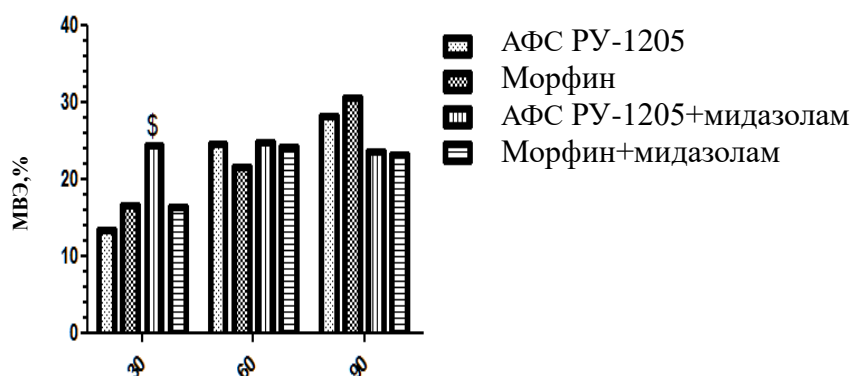


Рисунок 4.5. Изменение обезболивающей активности АФС РУ-1205 и препарата сравнения морфина при совместном введении с мидазоламом в тесте отдергивания хвоста от теплового излучения у мышей самцов. Условные обозначения: по оси абсцисс – максимально возможный эффект, МВЭ, %; по оси ординат – длительность экспозиции (минуты); \$ – статистически значимые отличия от группы АФС РУ-1205, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$

Карбамазепин при совместном введении с морфином статистически значимо увеличивал МВЭ на 14,92 и 14,43 % через 30 и 60 минут относительно группы опиоида, что согласуется с данными литературы. При одновременном применении с АФС РУ-1205 карбамазепин значительно уменьшал МВЭ относительно группы капта-агониста до 2,98; 3,07 и 7,98 % в каждой из временной точки соответственно (Рисунок 4.6).

Согласно результатам проведенных экспериментов, при совместном введении габапентина и морфина происходит усиление обезболивающего действия опиоида через 30 и 60 минут после инъекции (максимально возможный эффект увеличивался на 10,7 и 13,2 % соответственно) (Рисунок 4.7). Однако при одновременном применении габапентина и АФС РУ-1205 отмечалось незначительное снижение анальгетического эффекта каппа-агониста.

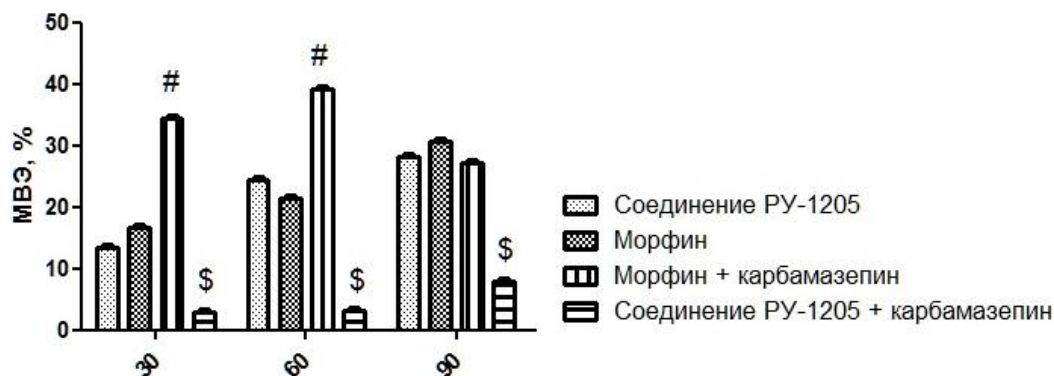


Рисунок 4.6. Изменение обезболивающей активности АФС РУ-1205 и препарата сравнения морфина при совместном введении с карбамазепином в тесте отдергивания хвоста от теплового излучения у мышей-самцов. Условные обозначения: по оси абсцисс – максимально возможный эффект, МВЭ, %; по оси ординат – длительность экспозиции (минуты); # – статистически значимые отличия от группы морфина, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$; \$ – статистически значимые отличия от группы АФС РУ-1205, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$

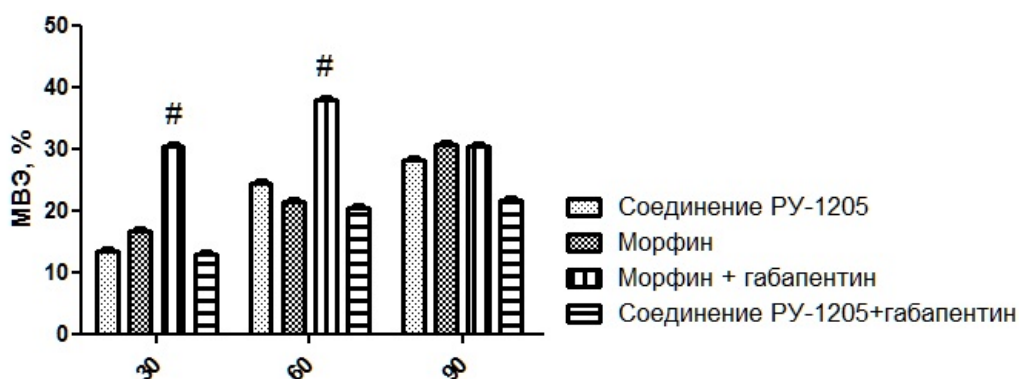


Рисунок 4.7. Изменение обезболивающей активности АФС РУ-1205 и препарата сравнения морфина при совместном введении с габапентином в тесте отдергивания хвоста от теплового излучения у мышей-самцов. Условные обозначения: по оси абсцисс – максимально возможный эффект, МВЭ, %; по оси ординат – длительность экспозиции (минуты); # – статистически значимые отличия от группы морфина, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$; \$ – статистически значимые отличия от группы АФС РУ-1205, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$

При одновременном введении атропина и морфина отмечалось снижение анальгетического эффекта морфина, начиная с 60-й минуты. Атропин достоверно снижал МВЭ через 90 минут на 11,2 %, относительно группы морфина ($p < 0,05$) (Рисунок 4.8). Установлено, что атропин значительно уменьшал выраженность анальгетического эффекта каппа-агониста через 60 и 90 минут при их совместном введении до контрольных значений.

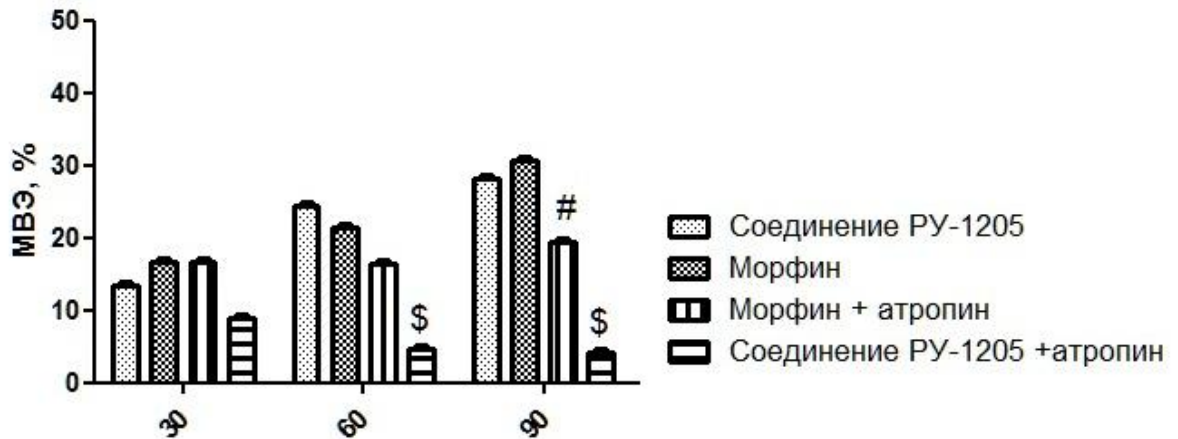


Рисунок 4.8. Изменение обезболивающей активности АФС РУ-1205 и препарата сравнения морфина при совместном введении с атропином в тесте отдергивания хвоста от теплового излучения у мышей-самцов. Условные обозначения: по оси абсцисс – максимально возможный эффект, МВЭ, %; по оси ординат – длительность экспозиции (минуты); # – статистически значимые отличия от группы морфина, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$; \$ – статистически значимые отличия от группы АФС РУ-1205, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$

При комбинировании с морфином амитриптилин значительно снижал анальгетический эффект опиоида через 30 минут (составим со значениями группы контроля, $p < 0,05$) (МВЭ = 2,72 %), затем наблюдалось незначительное увеличение ЛП, но ниже значений группы одновременного введения ($p < 0,05$) (Рисунок 4.9). Амитриптилин при совместном применении с АФС РУ-1205 достоверно снижал МВЭ относительно группы каппа-агониста через 30 минут в 2 раза, а через 60 и 90 минут в 2,7 и 2,3 раза соответственно.

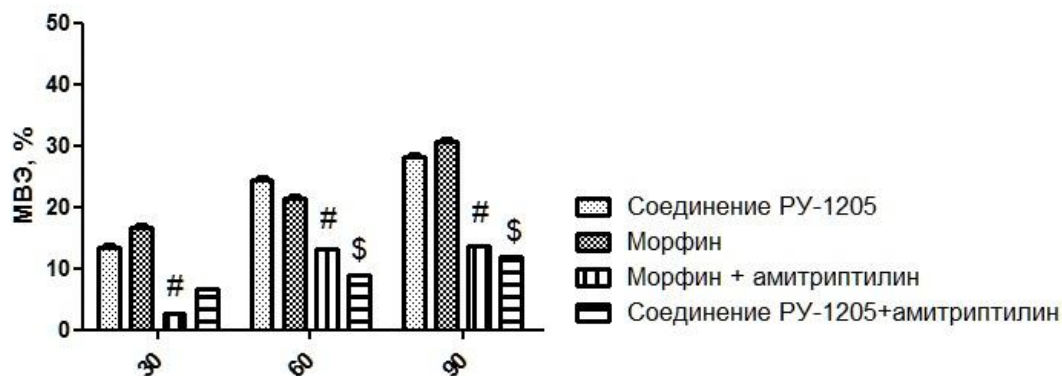


Рисунок 4.9. Изменение обезболивающей активности АФС РУ-1205 и препарата сравнения морфина при совместном введении с амитриптилином в тесте отдергивания хвоста от теплового излучения у мышей-самцов. Условные обозначения: по оси абсцисс – максимально возможный эффект, МВЭ, %; по оси ординат – длительность экспозиции (минуты); # – статистически значимые отличия от группы морфина, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$; \$ – статистически значимые отличия от группы АФС РУ-1205, 2way ANOVA, посттест Бонферрони $p < 0,05$

По результатам проведенных экспериментов выявлено усиление анальгетического эффекта морфина при комбинировании с карбамазепином и габапентином, но ослабление – при сочетании с атропином и амитриптилином. Для исследуемого соединения показано уменьшение выраженности анальгетического эффекта в группах, где АФС РУ-1205 вводили совместно с блокатором Na^+ каналов – карбамазепином; аналогом ГАМК – габапентином; М-холиноблокатором – атропином; ингибитором обратного захвата моноаминов – амитриптилином. С помощью выявленных закономерностей возможно более детальное планирование схем назначения при совместной терапии болевого синдрома.

Исходя из результатов проведенных тестов, можно сделать заключение, что клонидин, галоперидол и метоклопрамид усиливают анальгетический эффект морфина, диазепам нивелирует его, а мидазолам не оказывает влияния. При сочетании АФС РУ-1205 с клонидином наблюдается значительное увеличение анальгетической активности каппа-агониста, а при комбинации изучаемого соединения с мидазоламом синергизм был менее выражен. В то же время комбинация АФС РУ-1205 с диазепамом приводит к уменьшению анальгетического эффекта опиоида. Галоперидол не влияет на эффект изучаемого вещества, а метоклопрамид не вызывает однонаправленного эффекта при комбинировании с АФС РУ-1205 в разные временные промежутки.

ГЛАВА 5. АВЕРСИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ АФС РУ-1205

Фармакологическая активация каппа-опиоидных рецепторов у людей вызывает дисфорию и тревожность, подобные тем, которые могут быть обнаружены на экспериментальных моделях (Faouzi A., Varga B.R., 2020). Майкл Бручарс с соавт. в 2006 г. сообщили, что в культивируемых клетках U50,488H (высокоселективный агонист КОР) увеличивает фосфорилирование митоген-активируемой протеинкиназы p38 (МАРК) посредством КОР-опосредованных механизмов, что, как было показано, зависит от GRK3-опосредованного фосфорилирования КОР на уровне S369 и рекрутирования β -аррестина (Bruchas M.R., Macey T.A., 2006). Впоследствии тот же коллектив авторов (Bruchas M.R., Schindler A.G., 2011) продемонстрировал, что повторяющийся стресс при плавании вызывает активацию как КОР, так и p38 МАРК, коэкспрессируемых в ГАМКергических нейронах прилежащего ядра, коры и гиппокампа, и что активация p38 МАРК зависит от КОР. Ингибитор p38 SB203580 блокировал U50,488H-индуцированное отвращение места и КОР-зависимую неподвижность, вызванную стрессом при плавании, но не влиял на анальгезию КОР или неселективное влияние на ассоциативное обучение.

Принимая во внимание тот факт, что ингибиторы p38 МАРК относятся к производным имидазольных систем (Abraham A.D., Fontaine H.M., 2018), добавление фторфенильного радикала в молекулу способствовало появлению новых агонистов КОР. При этом у них сохранялся антагонизм в отношении p38 МАРК.

Предварительный анализ *in silico* позволяет предположить, что соединение РУ-1205 обладает как агонистической активностью по отношению к КОР, так и свойствами ингибитора p38 МАРК. В результате докинг-анализа получены данные, позволяющие предполагать, что энергия взаимодействия между РУ-1205 и каталитическим доменом p38-МАРК достаточно высока и сходна с энергией взаимодействия референтного препарата SB203580 (Spasov A.A., Zvartau E.E. et al., 2020).

Методика УРИМ до обуславливания продолжительности пребывания мышей всех групп в отсеках экспериментальной камеры не различалась (Рисунок 5.1).

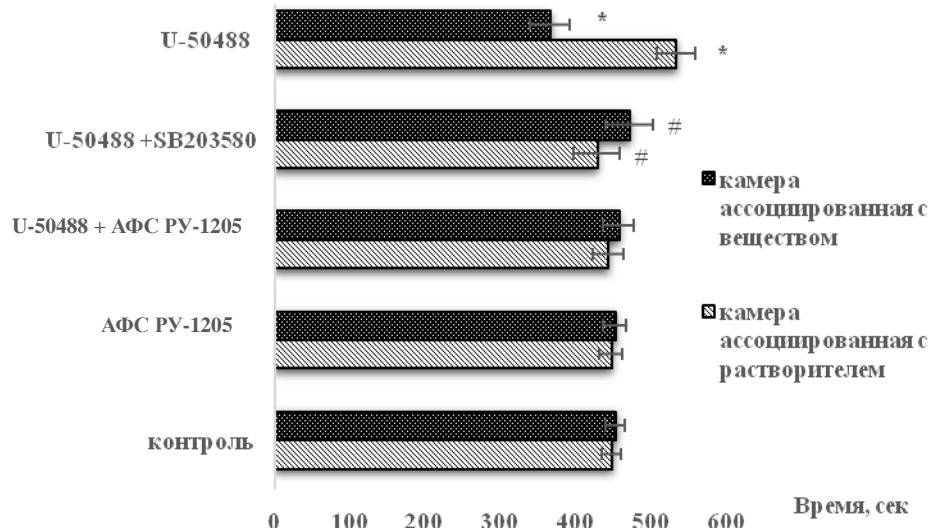


Рисунок 5.1. Влияние АФС РУ-1205, соединений U-50488 и SB203580 на время нахождения животных в отсеках установки для исследования реакции избегания места. Условные обозначения: * – статистически значимые различия с группой контроля ($p < 0,05$); # – статистически значимые различия с группой животных, получавших соединение U-50488 ($p < 0,05$)

Животные, получавшие препарат сравнения соединение U-50488, проводили на 22 % меньше времени в отсеке, связанном с введением этого вещества, относительно группы контроля ($p < 0,05$), что свидетельствует о наличии у данного каппа-агониста аверсивных свойств. Животные, получавшие АФС РУ-1205, проводили одинаковое количество времени в каждой из камер, также как и мыши из группы контроля. Ингибитор p38 MAPK соединение SB203580 (при предварительном введении группе животных, получавших U-50488) достоверно сокращал различия с группой, которой вводили только каппа-агонист ($p < 0,05$). При одновременном введении агонистов КОР АФС РУ-1205 и U-50488 достоверных различий в продолжительности проведенного времени в каждой из камер выявлено не было.

На основании экспериментальных данных можно предположить, что разработка лекарственных препаратов, влияющих на КОР и p38 MAPK, может быть перспективной с целью получения анальгетиков, лишенных наркогенного потенциала и не вызывающих каппа-опосредованных аверсивных расстройств. Для АФС РУ-1205 не зафиксировано специфических фармакологических свойств, позволяющих установить наличие аверсивного потенциала. Механизм фармакологического профиля АФС РУ-1205, который включает отсутствие аверсивного действия, возможно, ассоциирован с влиянием на p38-MAP-киназу.

ГЛАВА 6. ОБЩЕТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РУ-1205

Доклинические исследования, согласно Федеральному закону «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 № 61-ФЗ, включают в себя получение доказательств безопасности лекарственного средства. Классификация и общие требования, предъявляемые к вредным веществам, приведены в ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. В рамках изучения токсикологических свойств новых лекарственных средств необходимым является определение переносимых и фармакологических доз. Установление зависимости между дозой, длительностью и проявлением нежелательных эффектов во время хронического эксперимента, а также органов-мишеней становится ещё одной целью проводимых исследований.

6.1. Острая токсичность соединения РУ-1205

Острая токсичность соединения АФС РУ-1205 при внутрижелудочном введении мышам

В ходе проведенных экспериментов установлено, что АФС РУ-1205 при введении в дозах от 10 до 300 мг/кг не оказывало негативного влияния на состояние самок и самцов мышей. У животных не наблюдалось изменений в поведении, двигательной активности и координации движений. Однако при увеличении вводимой мышам дозы в интервале 500–1000 мг/кг у некоторых животных через 20 минут после введения вещества было отмечено угнетение общего состояния и отсутствие реакции на внешние раздражители. В группах самцов гибель животных после введения изучаемого вещества, вводимого в дозах 1000 и 2000 мг/кг, составила 40 %, а в группах самок – 20 и 40 % соответственно. При дальнейшем увеличении дозы АФС РУ-1205 до 3000 мг/кг наблюдалась гибель 40–60 % животных во всех опытных группах. Токсическое действие изучаемого соединения на животных проявлялось в резко угнетенном состоянии и отсутствии реакций на внешние раздражители. При этом фиксируемые значения частоты дыхания у мышей соответствовали норме. АФС РУ-1205 при введении мышам в дозе 5000 мг/кг способствовало 100%-й гибели животных во всех опытных группах в течение первых часов после введения. В таблице 6.1 представлены параметры острой токсичности для АФС РУ-1205 (ЛД₁₆, ЛД₅₀ и ЛД₈₄) после однократного внутрижелудочного введения мышам с указанием стандартной ошибки.

Наблюдения за поведением животных в последующие 14 дней после введения вещества не выявили никаких изменений в поведении животных. В клетке мыши активно передвигались, реагировали на внешние раздражители как звуковые, так и тактильные, видимые слизистые и

шерстный покров не были изменены. В опытных группах среди самок не наблюдалось гибели, но среди самцов, получивших вещество в дозе 300–500 мг/кг, 20 % животных погибли на 9–10-е сутки после введения. Анализ опытных групп показал отсутствие судорог, тремора, птоза, прыжков, встряхиваний, стука зубами и реакции Штрауба, которые обычно проявляются после введения агонистов мю-опиоидны рецепторов. Вероятно, влияние метаболитов АФС РУ-1205 на витальные функции организма мышей объясняет различия в величине ЛД₅₀ через одни сутки и на 14-й день эксперимента.

Таблица 6.1 – Показатели острой токсичности АФС РУ-1205 после однократного внутрижелудочного введения мышам (мг/кг)

Пол	ЛД ₁₆	ЛД ₅₀	ЛД ₈₄
Через 1 сутки после введения			
Самцы	821,40 1141,96÷591,08	1898,96 2638,89 ÷1366,50	4390,13 6100,75÷3159,16
Самки	572,34 852,98÷384,03	1565,05 2332,48÷1050,13	4279,62 6378,12÷2874,56
Через 14 суток после введения			
Самцы	351,24 636,07÷193,96	1315,66 2382,54÷726,52	4928,05 8924,26÷2721,31
Самки	312,01 856,90÷391,04	1175,99 1807,34÷730,90	4487,01 6351,11÷2879,46

Зависимость числа погибших животных (в %) от логарифма дозы введенного АФС РУ-1205 (мг/кг, однократно, перорально), представлена на рисунках 6.1–6.4. Линия тренда величины острой токсичности соединения РУ-1205 при интрагастральном введении имеет характер линейной аппроксимации.

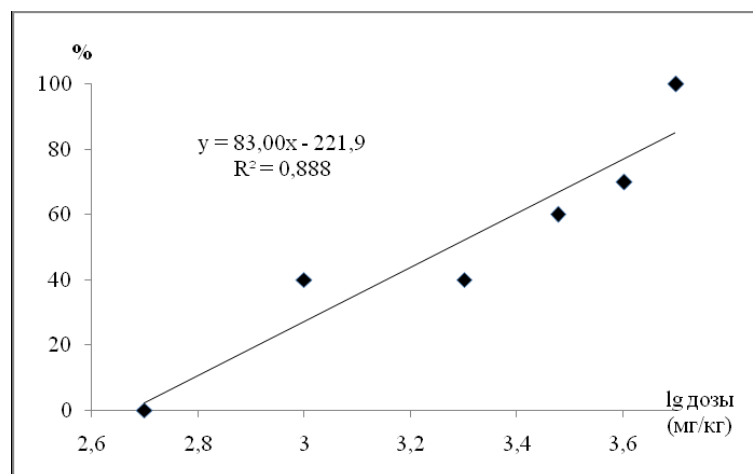


Рисунок 6.1. Гибель мышей самцов через 1 сутки после однократного введения АФС РУ-1205 в возрастающих дозах. $R^2 = 0,888$. Условные обозначения: по оси ординат – % погибших животных, по оси абсцисс – lg дозы в мг/кг

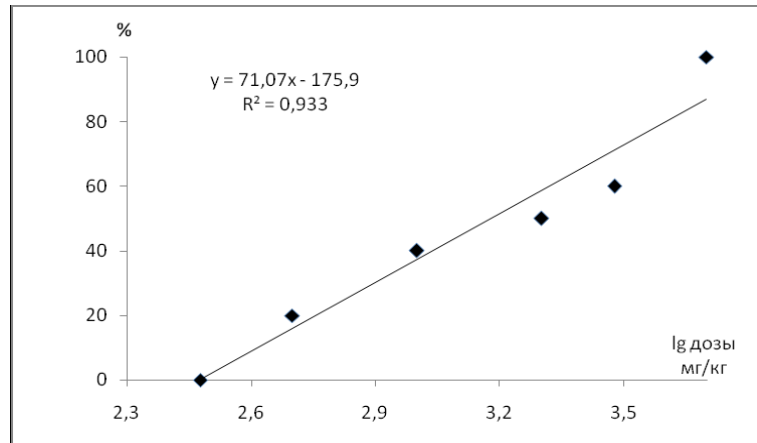


Рисунок 6.2. Гибель мышей-самок через 1 сутки после однократного введения АФС РУ-1205 в возрастающих дозах, $R^2 = 0,933$. Условные обозначения: по оси ординат – % погибших животных, по оси абсцисс – lg дозы в мг/кг

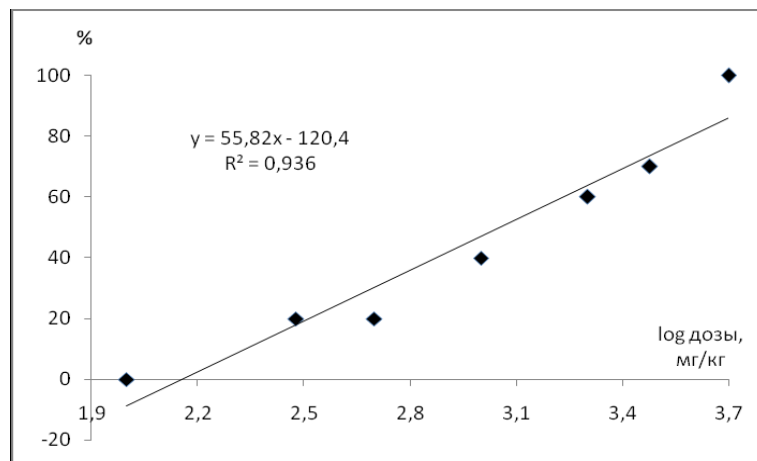


Рисунок 6.3. Гибель мышей-самцов через 14 суток после однократного введения АФС РУ-1205 в возрастающих дозах, $R^2 = 0,936$. Условные обозначения: по оси ординат – % погибших животных, по оси абсцисс – lg дозы в мг/кг

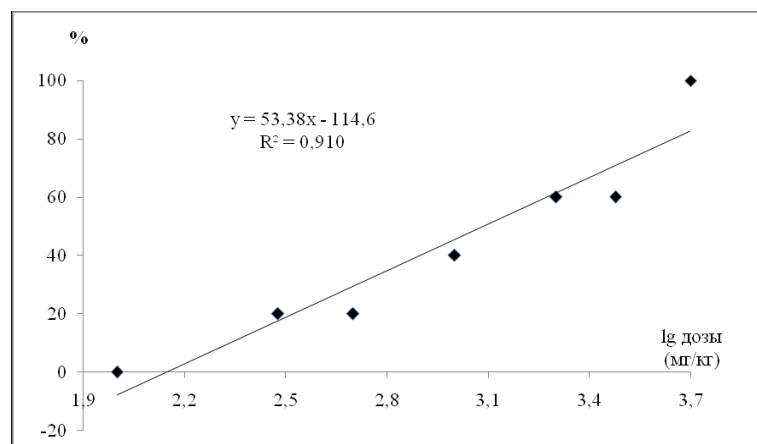


Рисунок 6.4. Гибель мышей-самок через 14 суток после однократного введения АФС РУ-1205 в возрастающих дозах, $R^2 = 0,910$. Условные обозначения: по оси ординат – % погибших животных, по оси абсцисс – lg дозы в мг/кг

Изучение острой токсичности АФС РУ-1205 при внутрижелудочном введении крысам.

В ходе следующей серии экспериментов была изучена острая токсичность АФС РУ-1205 при однократном внутрижелудочном введении крысам. В опытных группах (10–300 мг/кг) не было различий в двигательной активности и координации движений, а также изменений в поведении крыс по сравнению с контролем. Гибель животных была зафиксирована в группах животных, которые получали изучаемое вещество в дозах 500 мг/кг и выше. Через 20 минут после введения АФС РУ-1205 (500–2000 мг/кг) у 60 % животных было отмечено заторможенное состояние и отсутствие реакции на внешние раздражители. После введения АФС РУ-1205 гибель 40–60 % животных была зафиксирована в группах крыс среди самцов (2000–3000 мг/кг) и самок (1000–3000 мг/кг). Общетоксическое действие изучаемого соединения проявлялось в угнетении состояния и подвижности животных, отсутствии реакций на звуковые и тактильные раздражители. При введении агониста КОР в дозе 5000 мг/кг у крыс в 20 % случаев через 15 минут обнаруживалось боковое положение с возможностью самостоятельно переворачиваться при внешнем раздражении, но затем в течение первых часов после введения вещества наступала гибель всех животных группы. Реакция Штрауба, прыжковая активность, респираторная депрессия не были зафиксированы ни в одной из опытных групп.

В ходе последующего наблюдения за животными в течение четырнадцати дней установлена гибель одной самки из группы, получавшей АФС РУ-1205 в дозе 2000 мг/кг

В соответствии с вышеописанной методикой расчёта для соединения РУ-1205 в виде активной фармацевтической субстанции при однократном внутрижелудочном введении в экспериментах на крысах также установлены показатели острой токсичности (ЛД₁₆, ЛД₅₀ и ЛД₈₄) (Таблица 6.2).

Таблица 6.2 – Показатели острой токсичности АФС РУ-1205 после однократного внутрижелудочного введения крысам (мг/кг)

Пол	ЛД ₁₆	ЛД ₅₀	ЛД ₈₄
Через 1 сутки после введения			
Самцы	474,78 917,42÷245,70	1534,25 2964,63÷794,00	4957,91 9580,15÷2565,81
Самки	572,34 852,98÷384,03	1583,45 2332,48÷1050,13	4279,62 6378,12÷2871,56
Через 14 суток после введения			
Самцы	412,14 826,58÷205,50	1426,99 2861,93÷711,51	4940,78 9909,05÷2463,53
Самки	487,84 203,55÷169,17	1180,99 1857,34÷750,93	4605,36 1921,60÷11037,35

Показатели острой токсичности на 1-е и 14-е сутки после однократного внутрижелудочного введения существенно не отличались.

Изучение острой токсичности соединения РУ-1205 в виде гранулята таблеток при внутрижелудочном введении мышам и крысам

В результате проведенных исследований острой токсичности соединения РУ-1205 в форме ГТ не удалось определить значение ЛД₅₀. Гибель животных (мышей и крыс) после однократного перорального введения изучаемого вещества в дозе 20 000 мг/кг (содержание АФС РУ-1202 в виде фармацевтической субстанции 1000 мг/кг) не превышала 40 %. Однако увеличение дозы агониста КОР было невозможным из-за превышения максимально допустимого объема жидкости для введения растворенной лекарственной формы (Таблица 6.3) (соотношение АФС и ГТ 1 : 20).

Таблица 6.3 – Показатели острой токсичности соединения РУ-1205 в виде активной фармацевтической субстанции и в виде ГТ после однократного внутрижелудочного введения, мг/кг

Пол животных	LD ₅₀ АФС	LD ₅₀ гранулята таблеток (в пересчёте на АФС)
Опыты на мышах		
Самцы	1898,96	более 1000
Самки	1565,05	более 1000
Опыты на крысах		
Самцы	1534,25	более 1000
Самки	1583,45	более 1000

В ходе проведения оценки проявлений интоксикации у животных из опытных групп были отмечены признаки, свидетельствующие об угнетении ЦНС. Среди выявленных симптомов были: седация, заторможенность, снижение двигательной активности, а также замедление реакции в ответ на болевое, тактильное и звуковое раздражения. Гендерных различий в картине интоксикации и в динамике восстановительных процессов в постинтоксикационном периоде не выявлено.

Полученные данные указывают на низкую токсичность соединения РУ-1205 в виде активной фармацевтической субстанции при однократном пероральном введении, что позволяет отнести его к классу малотоксичных веществ (Sanotski I.V., 1996), а также по степени воздействия на организм причислить его к 3-му классу (умеренно опасному) (ГОСТ 12.1.007-76). Гранулят таблеток РУ-1205 также относится к классу малотоксичных веществ, по степени воздействия на организм – к 3-му классу (умеренно опасному).

Токсическое действие АФС РУ-1205 проявляется в угнетении ЦНС, что проявляется отсутствием реакции на звуковые и тактильные раздражители. После однократного внутривенного введения данного соединения животным (мышам и крысам) не наблюдалось симптомов интоксикации опиоидами (кататонической ригидности хвоста – реакции Штрауба, судорог, тремора, птоза, прыжков).

6.2. Хроническая токсичность соединения РУ-1205 в виде активной фармацевтической субстанции в экспериментах на крысах

Согласно некоторым исследованиям, хронической болью страдают более 30 % людей во всем мире, и это является важной персональной и социально-экономической проблемой. Показатели качества жизни и нейропластические изменения ЦНС могут быть обратимыми при адекватном обезболивании. Клинические исследования и руководства обычно рекомендуют персонализированный мультимодальный междисциплинарный подход к лечению, который может включать фармакотерапию, психотерапию, комбинированные методы лечения и инвазивные процедуры (Cohen S.P., Vase L., 2021).

Опиоиды являются эталоном при острой боли, хотя новые данные свидетельствуют, что около 6 % пациентов в США, которым их назначают после операции, продолжают их прием в качестве длительной (хронической) терапии. При этом возможные побочные эффекты от их длительного приема более выражены, чем от хирургического вмешательства (Brummett C.M., Waljee J.F. et al., 2017).

В рамках данного исследования изучена хроническая токсичность агониста КОР без наркотического потенциала – соединения РУ-1205 в виде АФС и форме ГТ на крысах и кроликах.

По результатам наблюдений за состоянием крыс, получавших 3-месячным курсом АФС РУ-1205, выраженных изменений в общем состоянии животных относительно контроля не выявлено. Шерстный покров всех опытных групп крыс в первые 2 месяца эксперимента соответствовал контрольным показателям (был гладкий и белый, слизистые оболочки – чистые и прозрачные, кожные покровы – бледно розовые). На 3-й месяц эксперимента в состоянии крыс 3-й опытной группы прослеживались элементы неопрятности, при этом шерстный покров приобретал желтоватый оттенок, слизистые оболочки и видимые кожные покровы были бледными. На данный период у опытных крыс 2-й и 1-й группы изменений в общем состоянии относительно контроля, получавшего дистиллированную воду, не обнаружено.

В первый месяц эксперимента поведение крыс из опытных групп не отличалось от контрольных животных. После трех месяцев исследования и через один месяц после окончания

у крыс, получавших АФС РУ-1205 (ежедневно, перорально) в дозах 5 и 50 мг/кг, также не отмечено различий в элементах поведения и реакциях на звуковые, световые и тактильные стимулы. Однако у животных, которым изучаемое соединение вводили в дозе 500 мг/кг, во время второго и, особенно выражено, к концу третьего месяца эксперимента отмечались элементы снижения эмоциональных реакций на внешние раздражители, при этом общая подвижность животных практически не менялась. По результатам исследований, проведенных через один месяц после прекращения введения АФС РУ-1205, отмечены эффекты нормализации общего состояния и поведенческих реакций у крыс в третьей опытной группе, сравнимые с контрольными показателями.

Результаты измерений *массы тела крыс*, представленные в таблицах 6.4 и 6.5, свидетельствуют о положительном приросте массы тела у всех испытуемых групп. Вместе с тем прирост массы тела у животных опытных групп (в опытных группах, в зависимости от дозы и длительности введения субстанции) различался с такового прироста в контрольной группе.

Так, по окончании трехмесячного введения АФС РУ-1205 общий прирост массы тела в 1-й и 2-й опытных группах был сопоставим с контролем. Тогда как в 3-й группе 15,67 %, а в контрольной – 23,67 % ($p < 0,001$). В наблюдениях за крысами-самцами после отмены введения АФС РУ-1205 фиксировалась тенденция выравнивания темпов прироста массы тела у животных опытных групп с данными контроля.

При проведении исследований на самцах и самках крыс выявленные изменения веса животных в течение четырёх месяцев наблюдений имели схожий характер (Таблицы 6.4 и 6.5).

Таблица 6.4 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца) на динамику массы тела крыс-самцов (г, $M \pm m$)

№ п/п	Периоды измерений	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	Исходные данные	297,4 ± 6,16	300,2 ± 5,52	282,7 ± 6,79	287,2 ± 5,67
2	30 дней	334,5 ± 8,14*** 12,5%	331,3 ± 6,33*** 10,4%	311,4 ± 6,68*** 10,2%	307,9 ± 5,74*** 7,2%
3	60 дней	358,1 ± 9,91*** 20,4%	350,0 ± 7,61*** 16,6%	351,9 ± 8,40*** 24,5%	322,6 ± 9,51*** 12,3%
4	90 дней	367,8 ± 9,40*** 23,7%	353,2 ± 8,62*** 17,7%	357,1 ± 8,97*** 26,3%	332,2 ± 10,14*** 15,7%
5	Отмена 30 дней	378,5 ± 11,26*** 27,3%	376,5 ± 12,22*** 25,4%	361,3 ± 13,97** 27,8%	353,1 ± 11,58*** 23,0%

Примечание: изменения статистически значимы относительно исходных данных при *** – $p < 0,001$. Под абсолютными значениями указан процент прироста массы тела относительно исходных значений.

Таблица 6.5 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца) на динамику массы тела крыс-самок (г, М ± m)

№ п/п	Периоды измерений	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	Исходные данные	234,1 ± 4,17	234,9 ± 4,30	235,6 ± 3,44	231,3 ± 3,97
2	30 дней	258,7 ± 4,16*** 10,5%	255,7 ± 5,12*** 8,85%	260,3 ± 4,37*** 10,5%	244,7 ± 5,01** 5,8%
3	60 дней	275,7 ± 4,31*** 17,8%	276,6 ± 6,13*** 17,8%	270,9 ± 4,12*** 15,0%	244,9 ± 6,85** 5,89%
4	90 дней	290,4 ± 5,83*** 24,1%	281,1 ± 6,24*** 19,7%	275,4 ± 4,60*** 16,9%	248,9 ± 8,95*** 7,6%
5	Отмена 30 дней	295,2 ± 5,45*** 26,1%	294,7 ± 7,03*** 25,5%	290,7 ± 7,47*** 23,4%	259,6 ± 11,60*** 12,3%

Примечание: изменения статистически значимы относительно исходных данных при ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$. Под абсолютными значениями указан процент прироста массы тела относительно исходных значений.

В опытных группах 1 и 2 отмечался положительный прирост массы тела относительно исходных показателей, который незначительно отставал от данных группы контроля. При этом через 30 дней отмены введения изучаемого соединения данные этих групп практически не уступали группе контроля. В 3-й опытной группе наблюдался наименьший прирост массы тела после трехмесячного введения АФС РУ-1205 (7,61 % относительно исходных данных, у животных контрольной группы – 24,05 %), однако через месяц отмены введения исследуемого соединения темпы роста интенсифицировались.

Результаты измерений *пищевой и питьевой активности* крыс представлены таблицами 6.6 и 6.7. Выявлено, что пищевая активность крыс-самцов, получавших АФС РУ-1205 в дозе 5 мг/кг по завершении 3-го месяца эксперимента, существенно не изменялась. Во 2-й и 3-й опытных группах прослеживалось снижение пищевой активности на 8,3 и 15,0 % соответственно. При этом незначительные изменения наблюдались в питьевой активности: увеличение на 18,5 % в 1-й опытной группе и снижение на 6,5 % во 2-й. Среди опытных групп крыс-самок прослеживалась лишь дозозависимая тенденция в незначительном снижении пищевой и питьевой активности, наиболее выраженные изменения зарегистрированы в 3-й опытной группе (снижение на 14,3 % пищевой и на 28,8 % питьевой активностей). В исследованиях, проведенных через 1 месяц после отмены введения АФС РУ-1205, прослеживались отчетливые тенденции выравнивания пищевой и питьевой активности у опытных групп животных с контролем.

Результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о незначительном влиянии изучаемого соединения на пищевое и питьевое поведение животных в дозах 5 и 50 мг/кг. Однако при введении АФС РУ-1205 дозе 500 мг/кг наблюдается обратимое подавление указанных форм активности.

Таблица 6.6 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца введения и через 1 месяц его отмены) на пищевую/питьевую активности крыс-самцов (на г/100 г веса) ($M \pm m$)

№ п/п	Параметры	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
Опыты через 3 месяца					
1	Потребление пищи (г)	6,0 ± 0,24	6,2 ± 0,30	5,5 ± 0,25 ^{###}	5,1 ± 0,38 ^{###}
2	Потребление воды (мл)	9,2 ± 0,36	10,9 ± 0,35 ^{###}	8,6 ± 0,44 ^{##}	9,1 ± 0,48
Опыты через 1 месяц отмены					
3	Потребление пищи (г)	4,5 ± 0,15	4,7 ± 0,14	4,6 ± 0,09	4,3 ± 0,12
4	Потребление воды (мл)	8,1 ± 0,10	8,2 ± 0,21	8,3 ± 0,19	8,4 ± 0,29

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при ^{##} – $p < 0,01$; ^{###} – $p < 0,001$.

Таблица 6.7 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца введения и через 1 месяц его отмены) на пищевую/питьевую активности крыс-самок (на г/100 г веса) ($M \pm m$)

№ п/п	Параметры	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
Опыты через 3 месяца					
1	Потребление пищи (г)	4,9 ± 0,37	4,7 ± 0,14	4,3 ± 0,18	4,2 ± 0,10
2	Потребление воды (мл)	9,0 ± 0,35	9,4 ± 0,50	8,1 ± 0,30	6,4 ± 0,31 ^{###}
Опыты через 1 месяц отмены					
3	Потребление пищи (г)	5,0 ± 0,19	5,1 ± 0,14	5,2 ± 0,26	5,8 ± 0,44
4	Потребление воды (мл)	8,4 ± 0,32	8,3 ± 0,70	8,7 ± 0,49	8,0 ± 0,47

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при ^{###} – $p < 0,001$.

При ежедневном интрагастральном введении в течение 3 месяцев АФС РУ-1205 в дозах 5 и 50 мг/кг не оказывало существенного влияния на внешнее состояние, поведенческую активность и прирост массы тела животных. Однако при введении исследуемого вещества в дозе 500 мг/кг наблюдались изменения, такие как: ухудшение внешнего состояния, неопрятность шерстных и кожных покровов, бледность видимых слизистых оболочек, сухость

кожных покровов, а также снижение прироста массы тела. Вместе с тем данные изменения были обратимы и практически восстанавливались в период отмены введения АФС РУ-1205.

Результаты изучения *поведенческой активности* крыс в тесте «открытое поле» отражены в таблицах 6.8 и 6.9. В исследованиях, проведенных после окончания 3-го месяца эксперимента, отмечены незначительные изменения в поведенческой активности в опытных группах животных, получавших АФС РУ-1205 в дозе 5 мг/кг. При этом в группе крыс-самцов, получавших АФС РУ-1205 в дозе 50 мг/кг, снизилось количество вертикальных стоек и заглядываний в напольные отверстия. Однако среди самок увеличилось количество актов груминга лишь в группе, получавшей каппа-агонист в дозе 500 мг/кг ($p < 0,05$).

Таблица 6.8 – Влияние АФС РУ-1205 при внутрижелудочном введении в течение 3 месяцев на поведенческую активность крыс (тест «открытое поле», $M \pm m$)

№ п/п	Формы поведенческой активности (количество актов)	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
Самцы					
1	Вертикальные стойки	5,0 ± 0,95	3,9 ± 0,75	2,4 ± 0,67 [#]	5,0 ± 0,08
2	Пересеченные напольные линии	15,5 ± 1,65	13,9 ± 2,48	11,0 ± 2,03	15,1 ± 2,21
3	Заглядывания в напольные отверстия	3,5 ± 1,00	1,3 ± 0,33	0,3 ± 0,21 [#]	1,7 ± 0,45
4	Груминг	2,1 ± 0,38	2,9 ± 0,67	1,9 ± 0,55	1,4 ± 0,43
5	Дефекация	2,1 ± 0,38	1,2 ± 0,42	2,0 ± 0,73	2,2 ± 0,49
Самки					
6	Вертикальные стойки	4,9 ± 0,91	3,2 ± 0,83	3,6 ± 0,86	6,60 ± 0,87
7	Пересеченные напольные линии	21,5 ± 3,72	17,6 ± 3,18	19,2 ± 3,50	21,0 ± 3,39
8	Заглядывания в напольные отверстия	2,2 ± 0,39	1,9 ± 0,62	2,8 ± 0,70	2,6 ± 0,75
9	Груминг	2,6 ± 0,43	2,6 ± 0,48	1,9 ± 0,74	4,5 ± 0,50 [#]
10	Дефекация	2,6 ± 0,99	1,8 ± 0,80	2,4 ± 0,91	1,5 ± 0,60

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при [#] – $p < 0,05$.

По результатам тестирования крыс в «открытом поле» после отмены введения АФС РУ-1205 следует, что изменения в поведенческой активности практически нивелировались до значений групп контроля, отмечена лишь тенденция уменьшения количества вертикальных стоек в группах крыс самцов, получавших АФС РУ-1205 в дозах 50 и 500 мг/кг.

В ходе анализа полученных результатов исследования можно сделать вывод, что соединение РУ-1205 в виде АФС при пероральном введении крысам в течение трех месяцев в

дозах 5 и 50 мг/кг не оказывает существенного влияния на поведенческую активность, но при введении в дозе 500 мг/кг исследуемая субстанция способствует обратимому депримирующему влиянию на исследуемые параметры поведения.

Таблица 6.9 – Поведенческая активность крыс через 1 месяц отмены хронического (3 месяца) внутрижелудочного введения АФС РУ-1205 (тест «открытое поле», $M \pm m$)

№ п/п	Формы поведенческой активности (количество актов)	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
Самцы					
1	Вертикальные стойки	3,5 ± 0,92	4,5 ± 0,90	2,6 ± 0,67	1,9 ± 0,55
2	Пересеченные напольные линии	12,4 ± 2,61	12,5 ± 2,19	12,0 ± 2,29	9,7 ± 1,45
3	Заглядывания в напольные отверстия	1,7 ± 0,50	1,4 ± 0,37	1,2 ± 0,33	1,1 ± 0,43
4	Грумминг	2,5 ± 0,40	2,2 ± 0,47	2,2 ± 0,36	2,0 ± 0,37
5	Дефекация	3,6 ± 0,52	2,5 ± 0,56	2,3 ± 0,65	2,0 ± 0,68
Самки					
6	Вертикальные стойки	3,6 ± 0,75	3,1 ± 0,82	3,50 ± 0,67	5,00 ± 1,10
7	Пересеченные напольные линии	18,9 ± 3,45	19,3 ± 3,51	14,0 ± 1,78	17,7 ± 2,65
8	Заглядывания в напольные отверстия	2,6 ± 0,67	2,2 ± 0,59	1,4 ± 0,43	3,1 ± 0,78
9	Грумминг	2,2 ± 0,42	2,1 ± 0,23	2,0 ± 0,37	2,5 ± 0,50
10	Дефекация	2,2 ± 0,99	2,0 ± 1,05	2,6 ± 1,00	2,0 ± 0,82

Результаты изучения параметров *периферической крови* крыс, получавших АФС РУ-1205 в течение 3 месяцев, представлены таблицами 6.10 и 6.11. Анализ экспериментальных данных свидетельствует, что наблюдаемые изменения в показателях красной и белой крови в опытных группах животных не превышали границ физиологической нормы.

У крыс-самцов отмечалось статистически значимое дозозависимое снижение уровня гемоглобина относительно контрольных значений на 12,8 % в 1-й, на 11,3 % во 2-й и на 13,9 % в 3-й опытных группах. Одновременно с этим регистрировалось снижение величины цветового показателя и гематокрита. В исследованиях, проведенных на крысах-самках, наблюдались схожие эффекты. Общее количество эритроцитов снижалось в опытных группах на 4 % относительно группы контроля. Также прослеживалась тенденция дозозависимого снижения уровня гемоглобина 9,4 % в 1-й, на 14,8 % во 2-й и на 19,4 % ($p < 0,05$) в 3-й опытных группах, гематокрита и цветового показателя.

Таблица 6.10 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца) на показатели периферической крови крыс-самцов (M ± m)

№ п/п	Показатели, единицы измерения	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	Эритроциты, $1 \times 10^{12}/л$	8,2 ± 0,27	8,2 ± 0,07	8,3 ± 0,13	7,9 ± 0,19
2	Гемоглобин, г/л	148,0 ± 5,34	129,0 ± 3,42 [#]	131,3 ± 3,75 [#]	127,5 ± 3,50 [#]
3	Цветовой показатель, у.е.	0,5 ± 0,03	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,02
4	Время свертывания, с	45,0 ± 4,56	46,3 ± 1,31	44,8 ± 0,48	44,0 ± 0,82
5	СОЭ, мм/час	2,3 ± 0,48	2,8 ± 0,25	2,5 ± 0,50	2,8 ± 0,25
6	Гематокрит, л/л	44,1 ± 0,32	43,1 ± 0,41	42,9 ± 1,26	38,3 ± 2,85
7	Тромбоциты, $1 \times 10^9/л$	502,9 ± 43,65	719,8 ± 35,02 [#]	566,5 ± 49,25	464,8 ± 46,74
8	Лейкоциты, $1 \times 10^9/л$	16,1 ± 0,89	14,7 ± 1,35	16,5 ± 0,88	14,6 ± 0,33
9	Палочкоядерные гранулоциты, %	2,3 ± 0,25	4,5 ± 0,87	2,3 ± 0,95	1,3 ± 0,25 [#]
10	Сегментоядерные гранулоциты, %	13,3 ± 0,85	18,0 ± 2,80	18,0 ± 2,35	15,5 ± 3,50
11	Эозинофилы, %	2,0 ± 0,58	2,0 ± 0,91	1,8 ± 0,48	1,3 ± 0,25
12	Базофилы, %	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
13	Моноциты, %	2,3 ± 0,75	4,0 ± 1,08	3,0 ± 0,41	4,8 ± 0,48 [#]
14	Лимфоциты, %	80,3 ± 0,48	71,5 ± 4,63	75,0 ± 1,35 [#]	77,3 ± 3,50

[#] – изменения статистически значимы относительно группы контроля при $p < 0,05$.

Таблица 6.11 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца) на показатели периферической крови крыс-самок (M ± m)

№ п/п	Показатели, единицы измерения	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	Эритроциты, $1 \times 10^{12}/л$	7,5 ± 0,12	7,2 ± 0,02 ^{##}	7,2 ± 0,06 [#]	6,9 ± 0,18 [#]
2	Гемоглобин, г/л	144,3 ± 9,20	130,8 ± 1,25	123,0 ± 4,26	116,3 ± 4,61 [#]
3	Цветовой показатель, у.е.	0,5 ± 0,03	0,4 ± 0,01 [#]	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,01
4	Время свертывания, с	42,8 ± 1,25	44,0 ± 1,83	44,5 ± 3,57	43,0 ± 0,71
5	СОЭ, мм/час	2,3 ± 0,26	2,4 ± 0,37	2,8 ± 0,52	2,5 ± 0,33
6	Гематокрит, л/л	40,6 ± 0,93	42,4 ± 0,49	39,6 ± 1,30	36,0 ± 1,29 [#]
7	Тромбоциты, $1 \times 10^9/л$	456,3 ± 16,50	617,0 ± 92,01 [#]	448,5 ± 20,33	410,3 ± 33,70
8	Лейкоциты, $1 \times 10^9/л$	19,0 ± 2,89	16,0 ± 1,25 [#]	14,1 ± 0,63	16,0 ± 0,46 [#]
9	Палочкоядерные гранулоциты, %	2,0 ± 0,41	1,5 ± 0,29	2,0 ± 0,71	1,3 ± 0,25
10	Сегментоядерные гранулоциты, %	15,5 ± 2,96	12,8 ± 1,44	14,5 ± 1,32	9,0 ± 0,71
11	Эозинофилы, %	2,0 ± 0,00	1,3 ± 0,25	2,0 ± 0,71	1,5 ± 0,65
12	Базофилы, %	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
13	Моноциты, %	2,3 ± 0,63	1,3 ± 0,25	3,0 ± 0,41	3,3 ± 0,95
14	Лимфоциты, %	78,3 ± 3,33	83,5 ± 1,76	78,5 ± 1,55	85,0 ± 0,91

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при [#] – $p < 0,05$; ^{##} – $p < 0,01$.

В исследованиях показателей белой крови отмечалось снижение общего количества лейкоцитов во всех опытных группах, а также количества палочкоядерных гранулоцитов как у самцов, так и у самок в дозе 500 мг/кг на 43,5 % ($p < 0,05$) и на 35,0 % соответственно. Одновременно с этим увеличивалось количество моноцитов в группе самцов в 2,08 раза ($p < 0,05$) и на 43,5 % в группе самок. В группах самок и самцов, получавших исследуемое соединение в дозе 5 мг/кг, отмечено увеличение числа тромбоцитов ($p < 0,05$), которое нивелировалось через 1 месяц отмены введения.

В исследованиях, проведенных после отмены введения АФС РУ-1205, изменений в белой крови у опытных крыс не обнаружено (таблицы 6.12 и 6.13). В показателях красной крови у самцов в 1-й, 2-й и 3-й опытных группах отмечено, что общее количество эритроцитов и содержание гемоглобина соответствовали группе контроля, гематокрит у этих животных также не изменялся. Отмечено, что у крыс-самок общее количество эритроцитов, относительно контроля, было достоверно снижено на 24 % во 2-й и 3-й опытных группах, с одновременным снижением уровня гемоглобина на 10,0 % и на 16,2 % ($p < 0,05$) соответственно. Вместе с тем цветовой показатель эритроцитов у этих животных соответствовал контрольным значениям, что может свидетельствовать об отсутствии негативного влияния АФС РУ-1205 на показатели красной крови.

Таблица 6.12 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, через 1 месяц отмены) на показатели периферической крови крыс-самцов ($M \pm m$)

№ п/п	Показатели, единицы измерения	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	Эритроциты, $1 \times 10^{12}/л$	$8,4 \pm 0,12$	$8,9 \pm 0,29$	$8,7 \pm 0,10$	$8,2 \pm 0,23$
2	Гемоглобин, г/л	$149,0 \pm 3,94$	$145,0 \pm 1,78$	$143,5 \pm 2,72$	$132,0 \pm 1,08^{\#}$
3	Цветовой показатель, у.е.	$0,5 \pm 0,01$	$0,4 \pm 0,01$	$0,5 \pm 0,01$	$0,4 \pm 0,01$
4	Время свертывания, с	$48,0 \pm 2,12$	$47,3 \pm 2,02$	$51,8 \pm 1,93$	$44,5 \pm 1,32^{\#}$
5	СОЭ, мм/час	$2,8 \pm 0,25$	$2,5 \pm 0,58$	$2,1 \pm 0,18$	$2,2 \pm 0,27$
6	Гематокрит, л/л	$44,1 \pm 1,26$	$44,5 \pm 0,60$	$42,7 \pm 0,94$	$40,0 \pm 0,73$
7	Тромбоциты, $1 \times 10^9/л$	$594,8 \pm 14,40$	$557,0 \pm 37,90$	$642,0 \pm 61,64$	$604,5 \pm 41,86$
8	Лейкоциты, $1 \times 10^9/л$	$13,0 \pm 0,74$	$15,8 \pm 2,45$	$14,1 \pm 2,79$	$13,9 \pm 1,01$
9	Палочкоядерные гранулоциты, %	$2,5 \pm 0,65$	$3,8 \pm 0,48$	$2,3 \pm 0,48$	$2,0 \pm 0,71$
10	Сегментоядерные гранулоциты, %	$20,0 \pm 2,12$	$20,5 \pm 3,80$	$18,0 \pm 2,74$	$24,5 \pm 1,55$
11	Эозинофилы, %	$3,3 \pm 0,48$	$3,8 \pm 0,63$	$3,3 \pm 0,75$	$1,3 \pm 0,48$
12	Базофилы, %	$0,0 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$
13	Моноциты, %	$2,8 \pm 0,48$	$4,5 \pm 0,87$	$4,0 \pm 0,71$	$1,8 \pm 0,25$
14	Лимфоциты, %	$71,5 \pm 1,85$	$67,5 \pm 3,75$	$71,0 \pm 1,47$	$70,8 \pm 1,80$

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при $^{\#} - p < 0,05$.

Таблица 6.13 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, через 1 месяц отмены) на показатели периферической крови крыс-самок (M ± m)

№ п/п	Показатели, единицы измерения	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	Эритроциты, $1 \times 10^{12}/л$	7,5 ± 0,16	7,0 ± 0,08	5,7 ± 0,26##	5,7 ± 0,43#
2	Гемоглобин, г/л	144,5 ± 3,86	134,8 ± 0,85	130,0 ± 5,21	121,0 ± 6,20#
3	Цветовой показатель, у.е.	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,01	0,6 ± 0,02	0,6 ± 0,02
4	Время свертывания, с	41,8 ± 3,28	44,0 ± 2,74	41,8 ± 2,95	43,8 ± 2,53
5	СОЭ, мм/час	2,5 ± 0,50	2,5 ± 0,50	2,3 ± 0,27	2,5 ± 0,33
6	Гематокрит, л/л	30,7 ± 10,18	38,0 ± 0,31	33,1 ± 1,24	33,7 ± 2,33
7	Тромбоциты, $1 \times 10^9/л$	576,8 ± 47,64	540,8 ± 29,24	463,0 ± 22,72	487,5 ± 40,93
8	Лейкоциты, $1 \times 10^9/л$	10,3 ± 1,11	12,8 ± 2,75	11,0 ± 1,76	9,1 ± 0,81
9	Палочкоядерные гранулоциты, %	1,5 ± 0,65	2,3 ± 0,63	1,8 ± 0,25	2,5 ± 0,29
10	Сегментоядерные гранулоциты, %	21,3 ± 1,89	15,8 ± 0,48	17,5 ± 3,80	20,5 ± 2,50
11	Эозинофилы, %	4,8 ± 0,85	3,8 ± 0,75	4,5 ± 0,50	3,0 ± 0,91
12	Базофилы, %	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
13	Моноциты, %	3,3 ± 1,11	5,3 ± 1,25	3,0 ± 0,71	2,8 ± 0,75
14	Лимфоциты, %	69,3 ± 1,11	72,8 ± 1,93	70,8 ± 2,46	71,3 ± 2,39

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$.

В показателях периферической крови не выявлено изменений, свидетельствующих о негативном влиянии АФС РУ-1205 в дозах 5 и 50 мг/кг. Количество эритроцитов и уровень гемоглобина находились в пределах физиологической нормы. Зафиксированные изменения данных параметров нивелировались до контрольных значений через месяц после прекращения введения соединения. При введении изучаемого соединения в дозе 500 мг/кг наблюдались обратимые изменения показателей красной и белой крови крыс.

Результаты *биохимических исследований* плазмы крови крыс представлены в таблицах 6.14–6.17. При проведении исследований по завершению 3-месячного курса введения АФС РУ-1205 исследуемые биохимические показатели плазмы крови крыс-самцов относительно группы контроля существенно не изменялись (Таблица 6.14) и не выходили за рамки физиологических норм (Абрашова Т.В., Гуцин Я.А. и др., 2013). При этом отмечено статистически значимое повышение уровня глюкозы у самок (Таблица 6.15) относительно показателей группы контроля на 26,1; 28,6 и 35,7 % в опытных группах 1, 2 и 3 соответственно. Одновременно с этим у самок в данных группах отмечено дозозависимое повышение уровня холестерина на 4,0; 8,0 и 36,0 % ($p < 0,05$) соответственно.

Таблица 6.14 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца) на биохимические показатели сыворотки крови крыс-самцов (М ± м)

№ п/п	Биохимические параметры	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	Глюкоза, ммоль/л	5,1 ± 0,32	5,0 ± 0,09	5,3 ± 0,47	5,2 ± 0,20
2	Общий белок, г/л	85,0 ± 4,30	76,6 ± 2,81	90,7 ± 3,88	91,7 ± 2,90
3	Креатинин, ммоль/л	120,5 ± 5,05	129,0 ± 3,85	129,6 ± 3,49	121,5 ± 2,73
4	ЩФ, мккат/л	5,8 ± 0,24	4,3 ± 0,31 [#]	6,2 ± 0,68	5,0 ± 1,12
5	Мочевина, ммоль/л	7,4 ± 0,57	8,1 ± 0,36	8,2 ± 0,31	6,8 ± 0,27
6	АлАТ, мккат/л	0,4 ± 0,04	0,4 ± 0,04	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,04
7	АсАТ, мккат/л	1,1 ± 0,05	1,1 ± 0,03	1,1 ± 0,02	1,0 ± 0,01
8	Холестерин, ммоль/л	2,5 ± 0,21	2,1 ± 0,07	2,5 ± 0,17	2,1 ± 0,09

Примечание: ЩФ – щелочная фосфатаза, АлАТ – аланинаминотрансфераза, АсАТ – аспаргатаминотрансфераза; изменения статистически значимы относительно группы контроля при [#] – $p < 0,05$.

Таблица 6.15 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца) на биохимические показатели сыворотки крови крыс-самок (М ± м)

№ п/п	Биохимические параметры	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	Глюкоза, ммоль/л	4,2 ± 0,33	5,3 ± 0,09 [#]	5,4 ± 0,26 [#]	5,7 ± 0,20 ^{##}
2	Общий белок, г/л	92,0 ± 3,03	93,7 ± 5,35	88,2 ± 3,05	93,6 ± 5,04
3	Креатинин, ммоль/л	149,1 ± 16,16	159,1 ± 23,61	158,8 ± 5,03	126,8 ± 1,78
4	ЩФ, мккат/л	3,0 ± 0,15	2,8 ± 0,08	3,9 ± 0,74	3,0 ± 0,20
5	Мочевина, ммоль/л	7,9 ± 0,37	7,9 ± 1,20	7,8 ± 0,18	6,2 ± 0,98
6	АлАТ, мккат/л	0,4 ± 0,07	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,04	0,3 ± 0,03
7	АсАТ, мккат/л	1,1 ± 0,08	1,0 ± 0,06	1,1 ± 0,06	0,9 ± 0,03
8	Холестерин, ммоль/л	2,5 ± 0,20	2,6 ± 0,28	2,7 ± 0,32	3,4 ± 0,16 [#]

Примечание: ЩФ – щелочная фосфатаза, АлАТ – аланинаминотрансфераза, АсАТ – аспаргатаминотрансфераза; изменения статистически значимы относительно группы контроля при [#] – $p < 0,05$; ^{##} – $p < 0,01$.

Исследования, проведенные через месяц после отмены введения крысам АФС РУ-1205, не выявили каких-либо различий в биохимических параметрах плазмы крови между животными опытных и контрольных групп. Это позволяет предположить, что изучаемое соединение не оказывает влияния на обмен веществ. Изменений не зафиксировано даже в группах животных, получавших АФС РУ-1205 в дозе, в 100 раз превышающей терапевтическую (500 мг/кг.)

Таблица 6.16 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, через 1 месяц отмены) на биохимические показатели сыворотки крови крыс-самцов (М ± м)

№ п/п	Биохимические параметры	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	Глюкоза, ммоль/л	3,2 ± 0,23	4,8 ± 0,44 [#]	4,6 ± 0,26 [#]	3,5 ± 0,28
2	Общий белок, г/л	65,7 ± 2,15	67,6 ± 1,82	60,9 ± 1,96	61,3 ± 0,84
3	Креатинин, ммоль/л	95,9 ± 14,66	96,2 ± 1,71	85,4 ± 1,73	98,34 ± 7,11
4	ЩФ, мккат/л	2,3 ± 0,07	2,9 ± 0,23	4,0 ± 0,82	3,9 ± 0,45 [#]
5	Мочевина, ммоль/л	5,6 ± 0,46	7,4 ± 0,45	6,4 ± 0,35	6,6 ± 0,61
6	АлАТ, мккат/л	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,04	0,4 ± 0,01	0,5 ± 0,06
7	АсАТ, мккат/л	1,0 ± 0,03	1,1 ± 0,05	1,1 ± 0,03	1,1 ± 0,04
8	Холестерин, ммоль/л	2,6 ± 0,29	2,1 ± 0,11	2,3 ± 0,13	2,3 ± 0,23

Примечание: ЩФ – щелочная фосфатаза, АлАТ – аланинаминотрансфераза, АсАТ – аспаргатаминотрансфераза; изменения статистически значимы относительно группы контроля при [#] – p < 0,05.

Таблица 6.17 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, через 1 месяц отмены) на биохимические показатели сыворотки крови крыс-самок (М ± м)

№ п/п	Биохимические параметры	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	Глюкоза, ммоль/л	5,5 ± 0,33	6,2 ± 0,10	6,1 ± 0,29	5,8 ± 0,09
2	Общий белок, г/л	65,4 ± 3,54	69,9 ± 3,41	65,3 ± 2,91	62,8 ± 1,98
3	Креатинин, ммоль/л	103,3 ± 9,40	100,0 ± 2,55	100,5 ± 5,86	98,1 ± 2,39
4	ЩФ, мккат/л	2,6 ± 0,85	2,1 ± 0,34	1,9 ± 0,30	3,4 ± 0,49
5	Мочевина, ммоль/л	6,3 ± 0,39	6,6 ± 0,26	5,4 ± 0,46	8,0 ± 0,64
6	АлАТ, мккат/л	0,3 ± 0,04	0,4 ± 0,06	0,3 ± 0,05	0,5 ± 0,05 [#]
7	АсАТ, мккат/л	1,0 ± 0,05	1,0 ± 0,03	0,9 ± 0,05	1,1 ± 0,06
8	Холестерин, ммоль/л	2,3 ± 0,23	2,7 ± 0,27	2,7 ± 0,18	3,1 ± 0,34

Примечание: ЩФ – щелочная фосфатаза, АлАТ – аланинаминотрансфераза, АсАТ – аспаргатаминотрансфераза; изменения статистически значимы относительно группы контроля при [#] – p < 0,05.

В последующих исследованиях оценку влияния соединения на функциональную активность печени изучали в тесте «гексеналовый сон» и в тесте на выделение бромсульфалеина (БСФ). Об изменениях фильтрационно-реабсорбционной функции почек судили в тесте с феноловым красным.

По результатам теста «гексеналовый сон» (Таблицы 6.18, 6.19) у крыс 1-й опытной группы, получавших в течение трех месяцев АФС РУ-1205, не наблюдалось статистически значимых изменений в продолжительности латентного периода засыпания и длительности гексеналового сна. Во 2-й опытной группе, получавшей АФС РУ-1205 в дозе 50 мг/кг, выявлялось наличие статистически значимого укорочения латентного времени засыпания (на 56,4 % у самцов и на 31,1 % у самок), а также увеличение длительности гексеналового сна (в 2,1 раза у самцов и в 1,4 раза у самок). Продолжительность латентного периода статистически значимо еще более укорачивалась в 3-й опытной группе (на 50,1 % у самцов и на 46,7 % у самок), при этом длительность наркотического сна достоверно увеличивалась относительно группы контрольных животных (в 2,0 раза у самцов и в 2,1 раза у самок). Полученные данные согласуются с патоморфологическими и микроскопическими исследованиями, в которых отмечено повреждение печени в группах животных, получавших АФС РУ-1205 в дозах 50 и 500 мг/кг.

В исследованиях на животных после месячной отмены введения АФС РУ-1205 в форме субстанции были зафиксированы реабилитационные эффекты.

Так, у животных из опытных групп продолжительность периода засыпания существенно не различалась с показателями контрольных животных. При этом было замечено, что продолжительность наркотического сна имела тенденцию к увеличению, у самок и самцов 3-й опытной группы (65,5% – у самцов и 24,5% – у самок). Выявленные различия не были статистически значимыми по сравнению с группой контроля.

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать вывод, что АФС РУ-1205 в форме фармацевтической субстанции при длительном (три месяца) внутрижелудочном введении (в дозах 5 и 50 мг/кг) не оказывает существенного влияния на детоксицирующую функцию печени. При введении изучаемого вещества в максимальной дозе 500 мг/кг у крыс наблюдается обратимое подавление обезвреживающей способности печени, но через один месяц после отмены введения АФС РУ-1205 детоксицирующая функция печени постепенно восстанавливалась.

Таблица 6.18 – Длительность гексеналового сна у крыс-самцов после внутрижелудочного введения АФС РУ 1205 ($M \pm m$), мин

№ п/п	Параметры	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
Через 3 месяца непрерывного введения					
1	Латентный период засыпания	5,5 ± 0,58	5,0 ± 1,00	2,4 ± 0,31 [#]	2,7 ± 0,33 [#]
2	Длительность сна	10,8 ± 2,04	14,2 ± 2,22	22,7 ± 3,02 [#]	21,7 ± 2,96 [#]
Через 1 месяц отмены					
3	Латентный период засыпания	3,9 ± 0,19	2,5 ± 0,56	3,5 ± 0,09	3,7 ± 0,32
4	Длительность сна	14,2 ± 2,69	20,9 ± 4,12	21,5 ± 4,01	23,5 ± 5,22

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при [#] – $p < 0,05$.

Таблица 6.19 – Длительность гексеналового сна у крыс-самок после внутрижелудочного введения АФС РУ 1205 ($M \pm m$), мин

№ п/п	Параметры	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
Через 3 месяца непрерывного введения					
1	Латентный период засыпания	4,5 ± 0,02	4,0 ± 0,20	3,1 ± 0,32 [#]	2,4 ± 0,12 ^{##}
2	Длительность сна	41,0 ± 0,33	57,2 ± 5,58	58,9 ± 0,36 ^{###}	86,7 ± 1,17 ^{###}
Через 1 месяц отмены					
3	Латентный период засыпания	3,4 ± 0,35	3,0 ± 0,24	3,6 ± 0,42	3,7 ± 0,42
4	Длительность сна	59,6 ± 8,14	53,5 ± 4,53	60,5 ± 7,08	74,2 ± 9,51

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при [#] – $p < 0,05$; ^{##} – $p < 0,01$; ^{###} – $p < 0,001$.

По результатам тестирования животных с красителем БСФ, выявлено, что по окончании 3-месячного курса хронического эксперимента (Таблица 6.20), изменений в уровне БСФ в плазме крови животных, получавших субстанцию АФС РУ-1205 в дозе 5 мг/кг, не отмечено, что свидетельствует об отсутствии влияния на выделительную функцию печени. У животных 2-й опытной группы уровень БСФ в плазме крови крыс повышался на 66,7 % ($p > 0,05$) у самцов и в 2,5 раза ($p > 0,05$) – у самок. Данные результаты были статистически незначимы. Более выраженные тенденции снижения поглотительно-выделительной функции печени относительно

контроля прослеживались у крыс в 3-й опытной группе, у которых количество БСФ было повышенным на 66,7 % ($p > 0,05$) у самцов и в 1,5 раза ($p > 0,05$) у самок.

В последующих исследованиях, проведенных на животных, после отмены введения АФС РУ-1205 выявлены эффекты выравнивания уровня БСФ в крови животных из опытных и контрольных групп.

Таким образом, на основе полученных экспериментальных данных в тесте с БСФ можно сделать вывод об отсутствии влияния соединения РУ-1205 в виде АФС (при ежедневном внутрижелудочном длительном трехмесячном курсе введения в дозах 5 и 50 мг/кг, а также через один месяц после отмены введения изучаемого вещества) на поглотительную и экскреторную функции печени крыс. В дозе 500 мг/кг данное соединение оказывает обратимое угнетающее влияние на функции печени.

Таблица 6.20 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно) на наличие БСФ

(внутрибрюшинно за 45 мин до тестирования, мг/%, M+m) в плазме крови крыс-самцов

№ п/п	Длительность введения изучаемых веществ	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
Самцы					
1	3 месяца	0,3 ± 0,19	0,3 ± 0,17	0,4 ± 0,16	0,5 ± 0,22
2	Через 1 месяц отмены	0,4 ± 0,05	0,4 ± 0,15	0,5 ± 0,19	0,5 ± 0,05
Самки					
1	3 месяца	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,08	0,4 ± 0,22	0,5 ± 0,15
2	Через 1 месяц отмены	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,03	0,4 ± 0,24	0,5 ± 0,21

О влиянии АФС РУ-1205 на функциональную активность почек судили в нагрузочном тесте «феноловый красный». По результатам исследований, представленных в таблице 6.21, отмечено, что количество выделяемой мочи и, соответственно, фенолового красителя у опытных животных, по окончании 3-месячного хронического эксперимента различалось в группах самок и самцов.

Количество выделяемой мочи в группе самцов, получавших АФС РУ-1205 в дозе 5 мг/кг, статистически значимо превосходило показатели группы контроля (на 35 %, $p < 0,01$), аналогичные результаты отмечены в группе, получавшей максимальную дозу вещества (на 28 %, $p < 0,05$). В группе, получавшей изучаемое соединение в дозе 50 мг/кг, данный показатель практически не различался с результатами контрольной группы. В то время как в группах самок количество выделяемой мочи было в обратной зависимости от дозы вводимого вещества (тем больше, чем меньше доза) и статистически значимо отличалось от показателей группы

контроля. Выявленные изменения были обратимы, через 1 месяц отмены проявлялись явления реабилитации.

Таблица 6.21 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца и через 1 месяц отмены) на выведение почками фенолового красного (за 2 часа, $M \pm m$)

№ п/п	Группы	Самцы		Самки	
		Количество мочи, мл	Количество краски, мг	Количество мочи, мл	Количество краски, мг
3 месяца введения соединения					
1	Контроль, вода очищенная	$3,9 \pm 0,25$	$2,2 \pm 0,01^{###}$	$5,2 \pm 0,27$	$3,1 \pm 0,01$
2	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	$5,3 \pm 0,24^{##}$	$2,0 \pm 0,01^{###}$	$4,0 \pm 0,23^{\#}$	$2,1 \pm 0,06^{###}$
3	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	$4,1 \pm 0,32$	$1,9 \pm 0,00^{###}$	$2,0 \pm 0,06^{###}$	$2,2 \pm 0,03^{###}$
4	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг	$5,0 \pm 0,52^{\#}$	$1,9 \pm 0,02^{###}$	$2,3 \pm 0,70^{\#}$	$1,1 \pm 0,05^{###}$
1 месяц отмены					
5	Контроль, вода очищенная	$4,0 \pm 0,24$	$3,2 \pm 0,03$	$3,9 \pm 0,23$	$2,1 \pm 0,07$
6	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	$4,7 \pm 0,18$	$2,8 \pm 0,41^{###}$	$4,3 \pm 0,14$	$2,3 \pm 0,06$
7	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	$3,5 \pm 0,17$	$2,6 \pm 0,03^{###}$	$4,6 \pm 0,31$	$2,7 \pm 0,09^{##}$
8	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг	$2,8 \pm 0,18$	$2,0 \pm 0,01^{###}$	$3,3 \pm 0,37$	$2,7 \pm 0,16^{##}$

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при $^{\#}$ – $p < 0,05$; $^{##}$ – $p < 0,01$; $^{###}$ – $p < 0,001$.

У самцов в опытных группах 1, 2 и 3 прослеживалось увеличение выведения мочи на 35,9; 5,1 и 28,2 % соответственно, при этом количество выведенного фенолового красителя статистически значимо снижалось на 9,1 % (в 1-й опытной группе) и 13,6 % (во 2-й и 3-й опытных группах). В исследованиях на крысах-самках отмечено, что в опытных группах 1, 2 и 3 статистически значимо снижалось количество мочи относительно группы контроля на 23,1; 61,5 и на 55,8 % соответственно. Одновременно у этих самок снижалось и количество выведенного фенолового красителя, соответственно, на 32,3, 29,0 и 64,5%.

В экспериментах, проведенных после отмены введения крысам АФС РУ-1205, наблюдалось соответствие количества отделяемой мочи в опытных группах самок и в группе контроля. Исходя из этого, можно предположить отсутствие влияния соединения на выводящую и реабсорбционную функцию почек. В экспериментах на крысах-самцах в опытной группе 1 и 2 количество отделяемой мочи и фенолового красителя практически не различалась с данными

контроля, тогда как в опытной группе 3 снижалось и количество выделенной мочи (на 30,0 %), и фенолового красителя (на 37,5 %).

Результаты исследований в серии с феноловым красным позволяют сделать вывод об отсутствии повреждающего действия соединения РУ-1205 в виде активной фармацевтической субстанции на функции почек. Установлено, что изучаемое соединение при ежедневном внутрижелудочном введении в течение 3 месяцев крысам в дозах 5 и 50 мг/кг несущественно изменяло (повышало у самок, снижало у самцов) количество выделяемой мочи. При введении же субстанции крысам в дозе 500 мг/кг экскреторная и реабсорбционная функции почек отчетливо, но обратимо, угнетались.

Результаты изучения *электрокардиограммы* крыс, получавших РУ-1205 в виде субстанции, представлены в таблицах 6.22 и 6.23.

Таблица 6.22 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца) на электрокардиограмму крыс ($M \pm m$)

№ п/п	Показатели, единицы измерения	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
Исследования на крысах-самцах					
1	ЧСС, уд./мин	356,0 ± 13,11	368,3 ± 11,41	387,3 ± 28,35	345,3 ± 8,25
2	R, мВ	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,02
3	R-R, с	0,17 ± 0,001	0,16 ± 0,004	0,16 ± 0,013	0,17 ± 0,004
4	QRS, с	0,03 ± 0,002	0,02 ± 0,007	0,02 ± 0,002	0,02 ± 0,003
Исследования на крысах-самках					
1	ЧСС, уд./мин	385,3 ± 3,71	371,7 ± 3,76	361,0 ± 22,28	380,3 ± 33,77
2	R, мВ	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,02	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,03
3	R-R, с	0,15 ± 0,002	0,16 ± 0,002	0,17 ± 0,010	0,16 ± 0,015
4	QRS, с	0,03 ± 0,008	0,02 ± 0,003	0,02 ± 0,002	0,04 ± 0,012

В ходе анализа полученных данных было установлено, что электрофизиологическая активность сердца самок и самцов крыс из опытных групп не подвергалась существенным изменениям. Обнаруженные тенденции не выходили за рамки физиологической нормы и восстанавливались до уровня контроля (Таблица 6.23), что свидетельствует об отсутствии влияния АФС РУ-1205 на электрофизиологическую активность миокарда.

Таблица 6.23 – Влияние АФС РУ 1205 (внутрижелудочно, через 1 месяц отмены) на электрокардиограмму крыс ($M \pm m$)

№ п/п	Показатели, единицы измерения	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
Исследования на крысах-самцах					
1	ЧСС, уд./мин	324,3 ± 0,67	404,7 ± 12,25 [#]	351,7 ± 5,81 [#]	340,0 ± 2,08 [#]
2	R, мВ	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,01
3	R-R, с	0,18 ± 0,002	0,15 ± 0,003 ^{##}	0,17 ± 0,003 [#]	0,17 ± 0,002 ^{##}
4	QRS, с	0,02 ± 0,003	0,02 ± 0,003	0,03 ± 0,002	0,03 ± 0,003
Исследования на крысах-самках					
1	ЧСС, уд./мин	369,0 ± 24,34	378,3 ± 9,77	376,0 ± 18,33	352,7 ± 20,27
2	R, мВ	0,3 ± 0,03	0,2 ± 0,03	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,04
3	R-R, с	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,004	0,16 ± 0,008	0,17 ± 0,009
4	QRS, с	0,02 ± 0,003	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,004	0,03 ± 0,013

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при [#] – $p < 0,05$; ^{##} – $p < 0,01$.

Морфологические исследования. Макроскопическая оценка

При аутопсии крыс контрольной, а также 1-й (доза АФС РУ-1205 5 мг/кг) и 2-й (доза АФС РУ-1205 50 мг/кг) опытных групп изменений в состоянии органов и структуре их расположения не зафиксировано. Также не обнаружено существенных различий с контролем в коэффициентах масс внутренних органов у данных опытных групп животных (Таблицы 6.24 и 6.25). Отмечена лишь незначимая тенденция увеличения массы печени у животных во 2-й группе у которых коэффициент массы печени повышался: у самцов крыс на 9,6 % ($p > 0,05$), а у самок – на 16,1 % ($p < 0,01$). Вместе с тем выявленные изменения у самок и самцов не выходили за пределы физиологической нормы, были обратимы, так как не обнаруживались через 1 месяц после отмены введения АФС РУ-1205.

По результатам аутопсии животных, получавших АФС-1205 в дозе 500 мг/кг (3-я опытная группа), существенных изменений в структуре и состоянии внутренних органов не отмечено. Обращало на себя внимание наличие бледно коричневого окраса печени и сглаженность краев органа, масса печени была увеличена в сравнении с контролем на 35,5 % ($p < 0,01$) у самцов и на 67,7 % ($p < 0,01$) у самок. Также прослеживалось и повышение коэффициентов масс (КМ) тестикул (на 14 %, $p > 0,05$), но без видимых внешних структурных изменений. При этом в исследованиях, проведенных через один месяц, после отмены введения

АФС РУ-1205 различий относительно контроля во внешнем виде, окраске печени, и коэффициентах массы не зафиксировано.

Таблица 6.24 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца) на коэффициенты масс внутренних органов крыс ($M \pm m$)

№ п/п	Органы	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
Исследования на крысах-самцах					
1	Головной мозг	0,6 ± 0,02	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,02	0,6 ± 0,03
2	Сердце	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01
3	Тимус	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,004	0,05 ± 0,003 [#]
4	Легкие	0,6 ± 0,02	0,6 ± 0,03	0,5 ± 0,01	0,6 ± 0,03
5	Селезенка	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,02
6	Печень	3,1 ± 0,06	3,2 ± 0,05	3,4 ± 0,09	4,2 ± 0,18 ^{##}
7	Почки	0,6 ± 0,03	0,6 ± 0,02	0,6 ± 0,01	0,6 ± 0,03
8	Надпочечники	0,02 ± 0,002	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,004	0,02 ± 0,002
9	Эпидидимис	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,004	0,3 ± 0,01
10	Тестикулы	0,7 ± 0,03	0,7 ± 0,04	0,7 ± 0,02	0,8 ± 0,05
Исследования на крысах-самках					
1	Головной мозг	0,6 ± 0,01	0,6 ± 0,02	0,6 ± 0,02	0,7 ± 0,02
2	Сердце	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01
3	Тимус	0,09 ± 0,010	0,10 ± 0,010	0,11 ± 0,010	0,09 ± 0,005
4	Легкие	0,7 ± 0,02	0,7 ± 0,02	0,6 ± 0,02	0,7 ± 0,04
5	Селезенка	0,4 ± 0,03	0,5 ± 0,02	0,5 ± 0,02	0,5 ± 0,03
6	Печень	3,1 ± 0,04	3,3 ± 0,07	3,6 ± 0,08 ^{##}	5,2 ± 0,25 ^{##}
7	Почки	0,5 ± 0,01	0,6 ± 0,01	0,6 ± 0,02	0,6 ± 0,02
8	Надпочечники	0,03 ± 0,003	0,03 ± 0,004	0,03 ± 0,002	0,03 ± 0,002
9	Яичники	0,05 ± 0,004	0,06 ± 0,005	0,05 ± 0,002	0,06 ± 0,004

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при [#] – $p < 0,05$; ^{##} – $p < 0,01$.

Таблица 6.25 – Влияние АФС РУ-1205 (через 1 месяц отмены) на коэффициенты масс внутренних органов крыс (M ± m)

№ п/п	Органы	Контроль, вода очищенная	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
Исследования на крысах-самцах					
1	Головной мозг	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,005	0,5 ± 0,01
2	Сердце	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01
3	Тимус	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,007	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,005
4	Легкие	0,6±0,05	0,6 ± 0,02	0,6 ± 0,04	0,5 ± 0,02
5	Селезенка	0,3 ± 0,004	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,01
6	Печень	2,2 ± 0,07	2,4 ± 0,04	2,4 ± 0,03	2,2 ± 0,13
7	Почки	0,5 ± 0,02	0,5 ± 0,01	0,6 ± 0,02	0,5 ± 0,02
8	Надпочечники	0,02 ± 0,002	0,02 ± 0,002	0,02 ± 0,0004	0,02 ± 0,001
9	Эпидидимис	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,03	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,02
10	Тестикулы	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,04	0,5 ± 0,09	0,8 ± 0,05 ^{###}
Исследования на крысах-самках					
1	Головной мозг	0,6 ± 0,02	0,7 ± 0,02	0,7 ± 0,03	0,7 ± 0,02
2	Сердце	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,01	0,4 ± 0,01
3	Тимус	0,11 ± ,002	0,13 ± 0,006	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,01
4	Легкие	0,6 ± 0,01	0,6 ± 0,02	0,6 ± 0,06	0,8 ± 0,06
5	Селезенка	0,5 ± 0,02	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,03	0,5 ± 0,03
6	Печень	3,0 ± 0,06	3,0 ± 0,12	3,0 ± 0,08	3,6 ± 0,22
7	Почки	0,6 ± 0,02	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,02	0,6 ± 0,02
8	Надпочечники	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,003	0,03 ± 0,002	0,04 ± 0,005 [#]
9	Яичники	0,05 ± 0,003	0,04 ± 0,002 [#]	0,05 ± 0,004	0,05 ± 0,002

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при [#] – p < 0,05; ^{###} – p < 0,01.

Микроскопические исследования

По результатам патоморфологических исследований препаратов тканей органов животных контрольной и 1-й опытной группы не отмечено структурных изменений в головном мозге, легких, тимусе, сердце, почках, надпочечниках, органах ЖКТ (желудке, отделах тонкого и толстого кишечника), селезенке, поджелудочной железе, печени, почках, органах репродуктивной системы (тестикулах и яичниках).

При обследовании препаратов тканей животных 2-й опытной группы также не было отмечено существенных различий с контролем в таких органах, как легкие, тимус, надпочечники, отделы ЖКТ, селезенка, поджелудочная железа, тестикулы у самцов и яичники у самок. Наряду с этим фиксировалось повышение кровенаполнения в головном мозге, сердце и почек без каких-либо структурных изменений в них. При этом на препаратах печени просматривалось наличие дистрофических изменений гепатоцитов, однако данные изменения

не обнаруживались у этой группы животных через 1 месяц после отмены введения субстанции, что может свидетельствовать об отсутствии патологического влияния АФС на данный орган при 3-месячном введении в дозе 50 мг/кг.

В подобных исследованиях, проведенных на животных 3-й опытной группы, выявлялись эффекты, свидетельствующие и о наличии некоторого более выраженного воздействия АФС РУ-1205 в дозе 500 мг/кг на структуры: *головного мозга* (зафиксировано наличие выраженного кровенаполнения сосудов микроциркуляторного русла, отечность ткани и дистрофические изменения отдельных участков ткани органа), а также сердца, *печени и почек*. При этом на *препаратах миокарда* структура органа была сохранена, но прослеживалось выраженное кровенаполнение вен и межмышечных капилляров. Кардиомиоциты были удлиненной формы и обычных размеров. Выявлялось лишь незначительное истончение мышечных волокон, более выраженное у группы крыс-самок. В исследованиях, проведенных через один месяц после отмены введения субстанции, указанные изменения не фиксировались, в слабой степени сохранялось лишь полнокровие сосудов.

На препаратах *почек* у животных в 3-й группе отмечались набухание и дистрофические изменения эпителия в канальцах, в сочетании с лизисом отдельных ядер клеток канальцев и сужением просвета канальцев. После отмены вещества у животных выявлялось полнокровие сосудов микроциркуляторного русла, а также единичные дистрофические изменения в эпителии проксимальных и дистальных канальцев.

На гистологических препаратах *печени* данной группы животных фиксировалось сохранение морфоструктуры органа. Наряду с этим выявлялись эффекты мелкокапельной дистрофии гепатоцитов с наличием лизиса клеток и ядер отдельных клеток. На препаратах печени исследуемой группы самок крыс у двух особей было отмечено наличие инфильтрации портальных трактов без нарушений пограничной пластинки и холестаза, при этом подобных изменений в группе у самцов крыс не зафиксировано.

Через один месяц после отмены введения АФС РУ-1205 на гистологических препаратах печени животных не выявлялось эффектов холестаза и инфильтрации портальных трактов. В меньшей степени фиксировались эффекты дистрофии гепатоцитов, что может свидетельствовать о наличии обратимых процессов в печени данной опытной группы животных.

Таким образом, из результатов проведенных патоморфологических исследований можно сделать заключение, что 3-месячное внутрижелудочное введение АФС РУ-1205 крысам обоего пола в дозах 5 и 50 мг/кг не оказывает патологически-повреждающего действия на структуру органов: легких, сердца, тимуса, надпочечников, отделов ЖКТ, селезенки, поджелудочной железы, тестикул у самцов и яичников у самок. Выявляемые изменения в головном мозге, печени, почках у животных, получавших АФС в дозе 50 мг/кг, были полностью восстановлены

до состояния контрольных животных через 1 месяц после отмены введения, что свидетельствует об транзиторном обратимом действии исследуемой субстанции. У животных 3-й опытной группы, также не зафиксировано структурных изменений в легких, тимусе, надпочечниках, органах ЖКТ, селезенки, поджелудочной железе, органах репродуктивной системы. При этом изменения в головном мозге и сердце были полностью обратимыми, в отличие от печени и почек, где через 1 месяц после отмены введения АФС РУ-1205 в дозе 500 мг/кг зафиксированы единичные дистрофические изменения, но менее выраженные по сравнению с 3-месячным введением.

6.3 Хроническая токсичность соединения РУ-1205 в виде гранулята таблеток в экспериментах на кроликах

Общее состояние

При изучении параметров хронической токсичности кроликам длительно (три месяца) ежедневно перорально вводили соединение РУ-1205 в виде ГТ в различных дозах, затем наблюдения продолжались в течение одного месяца после отмены введения изучаемого соединения. Животным первой опытной группы исследуемое вещество вводили в дозе 5 мг/кг, второй опытной группе – 50 мг/кг, третьей – 500 мг/кг (в пересчете на фармацевтическую субстанцию). Было установлено, что в течение всего периода наблюдений общее состояние кроликов в первой и второй опытных группах не отличалось от состояния животных контрольной группы. У животных из третьей опытной группы, начиная со второго месяца введения ГТ изучаемого соединения, наблюдалось постепенное ухудшение общего состояния. Симптомы включали снижение опрятности, тусклость шерстного покрова и бледность видимых слизистых и кожных покровов. После отмены введения ГТ общее состояние улучшалось и через 1 месяц не различалось от группы контрольных животных.

В ходе всего периода наблюдений за пищевой и питьевой активностью животных из первой опытной группы не обнаружено значительных изменений по сравнению с группой контроля. В ходе анализа питьевой активности кроликов из второй и третьей опытных групп также не выявили значительных изменений по сравнению с группой контроля. Тенденция снижения пищевой активности прослеживались у кроликов-самцов 2-й и 3-й опытных групп, при этом у самок указанных изменений не фиксировалось. В исследованиях, проведенных после одного месяца отмены введения ГТ РУ-1205, пищевая и питьевая активности не различались с контрольной группой.

В поведении животных 1-й опытной группы не отмечено изменений на протяжении трехмесячного введения ГТ РУ-1205 и 1 месяца отмены его введения. Начиная со второго месяца введения ГТ РУ-1205, преимущественно у кроликов-самцов 2-й опытной группы отмечены элементы угнетения подвижности, снижения реакций на внешние раздражители, которые исчезли после отмены введения изучаемого соединения. В поведении кроликов 3-й опытной группы в течение первых 2 недель введения ГТ РУ-1205, также прослеживались элементы снижения подвижности и реакций на внешние раздражители. К середине второго месяца эксперимента реакции и подвижность постепенно восстановились до уровня группы контроля и, начиная с 3-го месяца хронического эксперимента, активизировались. При этом наблюдалось повышение реакции на тактильные и слуховые раздражители с наличием элементов агрессии и беспокойства. В исследованиях, проведенных после 1 месяца отмены введения ГТ РУ-1205, поведенческая активность не отличалась от группы контроля.

Результаты измерений *массы тела* кроликов представлены в таблице 6.26. Из приведенных данных видно, что прирост массы тела во всех исследуемых группах кроликов был положительным.

Таблица 6.26 – Влияние ГТ РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца) на динамику массы тела кроликов (кг, $M \pm m$)

№ п/п	Периоды измерений	Контроль, крахмальная взвесь, 1%	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
Опыты на самцах					
1	Исходные данные	$2,7 \pm 0,12$	$2,5 \pm 0,10$	$2,6 \pm 0,16$	$2,7 \pm 0,18$
2	3 месяца	$3,6 \pm 0,10$	$3,2 \pm 0,17$	$3,1 \pm 0,12^*$	$3,2 \pm 0,06^*$
3	1 месяц отмены	$3,7 \pm 0,13$	$3,3 \pm 0,38$	$3,3 \pm 0,20$	$3,4 \pm 0,18$
Опыты на самках					
1	Исходные данные	$2,4 \pm 0,09$	$2,7 \pm 0,05$	$2,7 \pm 0,13$	$2,4 \pm 0,13$
2	3 месяца	$3,2 \pm 0,09$	$3,2 \pm 0,09$	$3,1 \pm 0,08$	$2,7 \pm 0,02^*$
3	1 месяц отмены	$3,4 \pm 0,06$	$3,7 \pm 0,24$	$3,3 \pm 0,09$	$2,9 \pm 0,01$

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при * – $p < 0,05$.

В контрольной группе кроликов через 3 месяца введения ГТ РУ-1205 прирост массы тела составил 33,3 % относительно исходных данных. При этом прирост массы тела у кроликов в 1-й опытной группе (28,0 % у самцов и 18,5 % у самок) статистически значимо не различался с контрольными значениями. Во 2-й опытной группе прослеживалась лишь тенденция снижения прироста массы тела (19,2 % у самцов и 14,8 % у самок). У кроликов в 3-й опытной группе

прирост массы тела был статистически значимо ниже контрольных значений (18,5 % у самцов и 12,5 % у самок).

В исследованиях, проведенных после отмены введения твердой лекарственной формы РУ-1205, разница в приросте массы тела относительно исходных значений у кроликов-самцов составила 3,7 %, у самок – 8,3 %. Во всех опытных группах интенсивность набора массы тела не отличалась от группы контроля.

Таким образом, из проведенных, наблюдений можно заключить, что при 3-месячном внутрижелудочном введении ГТ РУ-1205 в дозах 5 и 50 мг/кг динамика прироста массы тела кроликов снижается обратимо и незначительно. Под действием ГТ РУ-1205 в дозе 500 мг/кг прирост массы тела кроликов угнетается, но восстанавливается через 1 месяц после отмены введения, что свидетельствует об обратимости данного эффекта.

Результаты изучения *электрокардиограммы* кроликов, получавших 3-месячным курсом ГТ РУ-1205, приведены, в таблицах 6.27 и 6.28. По результатам исследования электрофизиологической активности миокарда кроликов 1-й и 2-й опытных групп по таким параметрам, как амплитуда зубца R, длительность интервала R-R и комплекса QRS, а также ЧСС, статистически значимых различий с группой контроля не выявлено.

Таблица 6.27 – Влияние ГТ РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца) на показатели электрокардиограммы кроликов ($M \pm m$)

№ п/п	Параметры, единицы измерения	Контроль, крахмальная взвесь, 1%	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
Опыты на самцах					
1	R, мВ	0,24 ± 0,01	0,30 ± 0,05	0,16 ± 0,03	0,11 ± 0,01***
2	R–R, мс	0,30 ± 0,05	0,35 ± 0,04	0,38 ± 0,05	0,24 ± 0,03
3	QRS, мс	0,03 ± 0,002	0,03 ± 0,007	0,03 ± 0,003	0,04 ± 0,004
4	ЧСС, уд./мин	214,5 ± 27,90	176,3 ± 16,19	166,8 ± 25,94	256,3 ± 29,95
Опыты на самках					
1	R, мВ	0,29 ± 0,04	0,29 ± 0,05	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,01
2	R–R, мс	0,32 ± 0,07	0,32 ± 0,02	0,28 ± 0,012	0,23 ± 0,012
3	QRS, мс	0,05 ± 0,017	0,04 ± 0,007	0,04 ± 0,007	0,03 ± 0,001
4	ЧСС, уд./мин	208,8 ± 39,89	185,5 ± 11,21	215,0 ± 9,02	265,5 ± 15,41*

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$.

При анализе амплитуды зубца R у кроликов-самцов из группы, получавшей ГТ РУ-1205 в дозе 50 мг/кг (2-я опытная группа), отмечено снижение данного показателя на 33,33 % относительно данных группы контроля ($p > 0,05$), у самцов из 3-й опытной группы амплитуда

сократилась на 54,2 % ($p < 0,05$). При этом у самцов данной группы также прослеживались тенденции увеличения интервала QRS на 33,3 % ($p > 0,05$), укорочение интервала R–R (на 20 %, $p > 0,05$), и, соответственно, увеличение ЧСС на 19,5 % ($p > 0,05$), что, вероятно, может свидетельствовать о тенденции снижения физиологической активности миокарда. У самок в 3-й опытной группе, как и у самцов, прослеживалось статистически значимое увеличение ЧСС на 27,2 %. В исследованиях параметров ЭКГ кроликов опытных групп, проведенных после отмены введения ГТ РУ-1205, существенных различий с группой контроля не выявлено, что может свидетельствовать о положительной реабилитационной динамике.

Таблица 6.28 – Показатели электрокардиограммы кроликов после отмены (1 месяц) ГТ РУ-1205 (M ± m)

№ п/п	Параметры, единицы измерения	Контроль, крахмальная взвесь, 1%	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	R, мВ	0,26 ± 0,03	0,25 ± 0,08	0,24 ± 0,01	0,21 ± 0,05
2	R – R, мс	0,20 ± 0,004	0,20 ± 0,001	0,25 ± 0,053	0,27 ± 0,03
3	QRS, мс	0,03 ± 0,002	0,03 ± 0,003	0,03 ± 0,005	0,04 ± 0,004*
4	ЧСС, уд./мин	296,8 ± 5,44	302,8 ± 2,66	262,5 ± 38,95	229,8 ± 23,06

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при * – $p < 0,05$.

Принимая во внимание тот факт, что полученные результаты параметров ЭКГ кроликов, свидетельствующие о влиянии соединения РУ-1205 в форме ГТ при длительном (три месяца) ежедневном пероральном введении, находились в границе физиологической нормы, а также нивелировались через один месяц после отмены введения изучаемого соединения, можно сделать вывод об отсутствии негативного влияния на электрические потенциалы и сократительную активность сердца.

При изучении влияния ГТ соединения РУ-1205 на частоту дыхания кроликов существенных изменений относительно контрольных значений не обнаружено (Таблица 6.29).

В течение всего периода наблюдений не было обнаружено статистически значимых изменений в частоте дыхательных движений (ЧДД) у кроликов ни в одной из опытных групп. Тем не менее отмечено незначительное увеличение ЧДД у самцов на 15,1 % ($p > 0,05$) и у самок на 12,2 % ($p > 0,05$) в группе животных, которым ГТ РУ-1205 вводили в максимально исследуемой дозе – 500 мг/кг. В последующих экспериментах, проведенных через один месяц отмены введения исследуемого соединения, частота дыхания кроликов в данной опытной группе не различалась с контрольными данными.

Таблица 6.29 – Влияние ГТ РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца и через 1 месяц после отмены) на частоту дыхания кроликов (количество актов дыхания за 1 мин, $M \pm m$)

№ п/п	Пол животных	Контроль, крахмальная взвесь, 1%	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
Опыты через 3 месяца					
1	Самцы	64,0 ± 2,28	59,2 ± 2,67 (-7,50)	66,2 ± 0,86 (3,44)	76,2 ± 3,18 (15,1)
2	Самки	62,4 ± 2,79	53,6 ± 5,12 (-14,10)	56,2 ± 1,11 (-9,94)	68,0 ± 2,83 (12,2)
Опыты после 1 месяца отмены введения					
1	Самцы и самки	68,5 ± 0,50	69,0 ± 1,22 (0,73)	68,8 ± 1,80 (0,36)	72,5 ± 2,25 (5,84)

Примечание: в скобках указаны изменения в % относительно группы контроля.

Гематологические исследования, проведенные по окончании 3-го и 4-го месяцев хронического эксперимента, представлены в таблицах 6.30–6.32.

Таблица 6.30 – Влияние ГТ РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца) на показатели периферической крови кроликов-самцов ($M \pm m$)

№ п/п	Показатели, единицы измерения	Контроль, крахмальная взвесь, 1%	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	Эритроциты, $1 \times 10^{12}/л$	6,2 ± 0,16	6,4 ± 0,40	6,5 ± 0,15	5,7 ± 0,15
2	Гемоглобин, г/л	142,0 ± 6,08	139,8 ± 4,94	135,3 ± 3,48	123,3 ± 4,41
3	Цветовой показатель, у.е.	0,9 ± 0,03	0,8 ± 0,04	0,9 ± 0,03	0,9 ± 0,04
4	Время свертывания, с	39,0 ± 2,31	37,7 ± 0,33	39,0 ± 2,08	41,0 ± 1,53
5	СОЭ, мм/час	2,3 ± 0,33	3,0 ± 0,00	1,3 ± 0,33	2,0 ± 0,00
6	Гематокрит, л/л	38,7 ± 1,06	37,7 ± 1,28	37,6 ± 1,22	35,4 ± 1,03
7	Тромбоциты, $1 \times 10^9/л$	205,3 ± 18,12	222,3 ± 19,41	268,3 ± 10,68	273,0 ± 2,31
8	Лейкоциты, $1 \times 10^9/л$	13,4 ± 1,17	10,4 ± 1,19	11,3 ± 0,30	8,8 ± 0,75*
9	Палочкоядерные гранулоциты, %	1,7 ± 0,33	2,0 ± 0,58	1,3 ± 0,33	2,3 ± 0,33
10	Сегментоядерные гранулоциты, %	22,7 ± 2,19	27,0 ± 4,04	30,0 ± 4,62	36,3 ± 1,45**
11	Эозинофилы, %	4,7 ± 0,33	3,7 ± 0,67	3,0 ± 0,58	2,0 ± 0,00
12	Базофилы, %	1,0 ± 0,00	1,3 ± 0,33	1,3 ± 0,33	0,3 ± 0,33
13	Моноциты, %	2,7 ± 0,33	2,0 ± 0,00	2,7 ± 0,33	2,0 ± 0,00
14	Лимфоциты, %	67,3 ± 2,33	64,0 ± 3,51	61,7 ± 4,63	57,3 ± 1,45*

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Из представленных данных следует, что в параметрах красной и белой периферической крови кроликов 1-й и 2-й опытных групп по окончании 3-месячного курса введения вещества, а также и после 1 месяца отмены статистически значимых различий относительно группы контроля не выявлялось. В периферической крови кроликов 3-й опытной группы не обнаружено изменений в исследуемых параметрах красной крови. В показателях белой крови у кроликов-самцов 3-й опытной группы отмечено статистически значимое снижение уровня лейкоцитов на 34,3 % ($p < 0,05$) [при этом количество сегментоядерных гранулоцитов увеличилось на 59,9 % ($p < 0,01$), а лимфоцитов – снизилось на 14,9 % ($p < 0,05$) относительно контрольных значений]. У кроликов-самок этой опытной группы, напротив, повышалось количество лейкоцитов на 64,2 % ($p < 0,05$) относительно группы контроля, при этом уровень сегментоядерных нейтрофилов соответствовал контролю, а количество лимфоцитов повышалось в среднем на 18 %. В исследованиях, проведенных через 1 месяц после отмены введения ГТ РУ-1205, каких-либо изменений в показателях периферической крови кроликов не зарегистрировано.

Таблица 6.31 – Влияние ГТ РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца) на показатели периферической крови кроликов-самок ($M \pm m$)

№ п/п	Показатели, единицы измерения	Контроль, крахмальная взвесь, 1%	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	Эритроциты, $1 \times 10^{12}/л$	$6,5 \pm 0,16$	$6,5 \pm 0,03$	$6,1 \pm 0,17$	$5,7 \pm 0,19$
2	Гемоглобин, г/л	$122,3 \pm 2,60$	$124,3 \pm 3,93$	$122,7 \pm 3,48$	$121,0 \pm 1,53$
3	Цветовой показатель, у.е.	$0,8 \pm 0,00$	$0,8 \pm 0,02$	$0,8 \pm 0,01$	$0,8 \pm 0,02$
4	Время свертывания, с	$40,3 \pm 1,45$	$39,0 \pm 2,89$	$37,7 \pm 0,88$	$42,0 \pm 2,08$
5	СОЭ, мм/час	$2,7 \pm 0,33$	$2,3 \pm 0,33$	$2,3 \pm 0,33$	$2,3 \pm 0,33$
6	Гематокрит, л/л	$38,7 \pm 0,43$	$38,6 \pm 0,71$	$37,9 \pm 1,81$	$40,7 \pm 0,75$
7	Тромбоциты, $1 \times 10^9/л$	$269,3 \pm 3,76$	$252,3 \pm 20,76$	$250,0 \pm 14,22$	$303,7 \pm 7,22$
8	Лейкоциты, $1 \times 10^9/л$	$9,5 \pm 1,58$	$9,7 \pm 0,94$	$10,4 \pm 0,77$	$15,6 \pm 1,06^*$
9	Палочкоядерные гранулоциты, %	$2,0 \pm 0,58$	$2,7 \pm 0,88$	$2,0 \pm 0,58$	$2,0 \pm 0,58$
10	Сегментоядерные гранулоциты, %	$29,3 \pm 0,67$	$26,7 \pm 2,40$	$31,0 \pm 4,62$	$29,3 \pm 1,76$
11	Эозинофилы, %	$2,0 \pm 0,58$	$1,3 \pm 0,33$	$2,0 \pm 0,58$	$3,7 \pm 0,33$
12	Базофилы, %	$0,7 \pm 0,33$	$0,3 \pm 0,33$	$0,3 \pm 0,33$	$0,7 \pm 0,33$
13	Моноциты, %	$3,0 \pm 0,58$	$1,7 \pm 0,33$	$1,3 \pm 0,67$	$1,3 \pm 0,33$
14	Лимфоциты, %	$53,3 \pm 9,39$	$67,3 \pm 3,38$	$63,3 \pm 4,91$	$63,0 \pm 2,08$

* – изменения достоверны относительно контроля при $p < 0,05$.

Таблица 6.32 – Влияние ГТ РУ-1205 (через 1 месяц после отмены внутрижелудочного введения) на показатели периферической крови кроликов ($M \pm m$)

№ п/п	Показатели, единицы измерения	Контроль, крахмальная взвесь, 1%	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	Эритроциты, $1 \times 10^{12}/л$	$5,9 \pm 0,27$	$5,9 \pm 0,28$	$5,8 \pm 0,25$	$5,9 \pm 0,10$
2	Гемоглобин, г/л	$134,0 \pm 3,03$	$133,3 \pm 4,5$	$132,5 \pm 0,87$	$132,8 \pm 4,91$
3	Цветовой показатель, у.е.	$0,9 \pm 0,03$	$0,9 \pm 0,02$	$0,9 \pm 0,03$	$0,9 \pm 0,02$
4	Время свертывания, с	$74,0 \pm 18,71$	$78,5 \pm 2,22$	$77,3 \pm 5,84$	$86,8 \pm 11,61$
5	СОЭ, мм/час	$2,8 \pm 0,48$	$3,3 \pm 0,48$	$3,3 \pm 0,48$	$3,5 \pm 0,29$
6	Гематокрит, л/л	$37,9 \pm 0,57$	$37,9 \pm 2,01$	$38,7 \pm 2,88$	$38,0 \pm 1,69$
7	Тромбоциты, $1 \times 10^9/л$	$215,8 \pm 12,25$	$272,8 \pm 13,85$	$270,3 \pm 16,13$	$247,8 \pm 8,63$
8	Лейкоциты, $1 \times 10^9/л$	$13,9 \pm 0,76$	$14,3 \pm 1,92$	$14,2 \pm 1,15$	$12,5 \pm 1,24$
9	Палочкоядерные гранулоциты, %	$1,8 \pm 0,25$	$1,3 \pm 0,25$	$1,5 \pm 0,29$	$1,5 \pm 0,29$
10	Сегментоядерные гранулоциты, %	$28,3 \pm 3,12$	$29,3 \pm 4,23$	$28,8 \pm 2,93$	$26,8 \pm 1,25$
11	Эозинофилы, %	$3,5 \pm 0,29$	$2,3 \pm 0,63$	$3,5 \pm 0,65$	$3,3 \pm 0,63$
12	Базофилы, %	$1,0 \pm 0,41$	$0,0 \pm 0,00$	$0,8 \pm 0,48$	$1,0 \pm 0,41$
13	Моноциты, %	$2,0 \pm 0,41$	$1,8 \pm 0,25$	$1,8 \pm 0,25$	$1,5 \pm 0,29$
14	Лимфоциты, %	$63,5 \pm 3,30$	$69,5 \pm 5,63$	$69,3 \pm 4,19$	$66,3 \pm 1,11$

Таким образом, из проведенных исследований можно заключить об отсутствии повреждающего влияния ГТ РУ-1205 на периферическую кровь.

Результаты *биохимических исследований* плазмы крови кроликов представлены в таблицах 6.33–6.35, в которых также прослеживается отсутствие достоверных различий в исследуемых показателях у животных первой и второй опытных групп относительно группы контроля на протяжении трехмесячного введения вещества и 1 месяца отмены его введения. У кроликов-самцов 3-й опытной группы отмечено повышение мочевины на 76,1 %, холестерина на 35,7 % и глюкозы на 15,7 % ($p < 0,05$), при этом активности АЛАТ и АСАТ не изменялись. У самок 3-й опытной группы выявлялись тенденции повышения уровня мочевины на 60,4 % ($p < 0,05$), при этом у этих животных также зарегистрировано достоверное повышение активности АЛАТ на 50 % ($p < 0,05$) и холестерина на 91,7 % ($p < 0,05$).

В исследованиях, проведенных после отмены введения ГТ РУ-1205, биохимические показатели плазмы крови кроликов 1-й и 2-й опытных групп не различались с контролем. Эффекты выравнивания значений также отмечены и у кроликов в 3-й опытной группе, но при этом уровень глюкозы оставался незначительно выше контрольных значений на 10,3 %. Тем не менее все результаты, полученные на кроликах после отмены введения, свидетельствуют о

реабилитационной динамике изменений, что также свидетельствует об отсутствии патологического воздействия ГТ РУ-1205 на основные виды обмена животных.

Таблица 6.33 – Влияние ГТ РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца) на биохимические показатели сыворотки крови кроликов-самцов (М ± м)

№ п/п	Биохимические параметры	Контроль, крахмальная взвесь, 1%	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	Глюкоза, ммоль/л	7,0 ± 0,22	7,4 ± 1,26	7,0 ± 0,22	8,1 ± 0,05*
2	Общий белок, г/л	68,6 ± 7,10	57,0 ± 1,66	79,4 ± 4,03	65,7 ± 2,61
3	Креатинин, ммоль/л	102,3 ± 5,97	107,3 ± 6,97	103,4 ± 3,32	119,5 ± 2,65
4	ЩФ, мккат/л	1,7 ± 0,05	2,0 ± 0,12	2,0 ± 0,22	1,8 ± 0,06
5	Мочевина, ммоль/л	4,6 ± 0,37	4,2 ± 0,16	3,4 ± 0,41	8,1 ± 0,91*
6	АлАТ, мккат/л	0,4 ± 0,02	0,5 ± 0,03	0,5 ± 0,01	0,6 ± 0,02
7	АсАТ, мккат/л	0,8 ± 0,01	0,9 ± 0,04	0,9 ± 0,05	0,8 ± 0,02
8	Холестерин, ммоль/л	1,4 ± 0,14	1,2 ± 0,05	1,8 ± 0,12	1,9 ± 0,09

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при * – $p < 0,05$.

Таблица 6.34 – Влияние ГТ РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца) на биохимические показатели сыворотки крови кроликов-самок (М ± м)

№ п/п	Биохимические параметры	Контроль, крахмальная взвесь, 1%	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	Глюкоза, ммоль/л	6,1 ± 0,25	6,0 ± 0,38	6,1 ± 0,14	6,9 ± 0,14
2	Общий белок, г/л	65,4 ± 13,18	66,6 ± 3,90	68,4 ± 12,47	76,3 ± 12,00
3	Креатинин, ммоль/л	116,5 ± 7,63	100,8 ± 2,76	102,7 ± 7,63	119,5 ± 1,99
4	ЩФ, мккат/л	1,7 ± 0,17	1,6 ± 0,38	1,6 ± 0,08	2,4 ± 0,06
5	Мочевина, ммоль/л	4,8 ± 0,46	5,7 ± 0,44	5,8 ± 0,39	6,7 ± 0,17*
6	АлАТ, мккат/л	0,4 ± 0,02	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,06	0,6 ± 0,02*
7	АсАТ, мккат/л	0,9 ± 0,06	0,9 ± 0,07	0,9 ± 0,07	1,0 ± 0,09
8	Холестерин, ммоль/л	1,2 ± 0,19	1,4 ± 0,16	1,7 ± 0,40	2,3 ± 0,16*

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при * – $p < 0,05$.

Таблица 6.35 – Влияние ГТ РУ-1205 (через 1 месяц после отмены введения) на биохимические показатели плазмы крови кроликов (M ± m)

№ п/п	Биохимические параметры	Контроль, крахмальная взвесь, 1%	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	Глюкоза, ммоль/л	6,8 ± 0,11	6,5 ± 0,62	6,5 ± 0,52	7,2 ± 0,10*
2	Общий белок, г/л	89,9 ± 3,05	80,6 ± 7,92	102,0 ± 10,18	95,8 ± 5,87
3	Креатинин, ммоль/л	99,4 ± 2,42	106,6 ± 9,34	99,4 ± 13,75	93,4 ± 4,97
4	ЩФ, мккат/л	1,3 ± 0,12	1,3 ± 0,27	1,0 ± 0,06	1,2 ± 0,13
5	Мочевина, ммоль/л	4,4 ± 0,22	3,9 ± 0,29	3,9 ± 0,35	3,8 ± 0,48
6	АлАТ, мккат/л	0,5 ± 0,01	0,6 ± 0,06	0,6 ± 0,04	0,6 ± 0,04
7	АсАТ, мккат/л	0,8 ± 0,03	0,8 ± 0,06	0,8 ± 0,03	0,8 ± 0,08
8	Холестерин, ммоль/л	1,4 ± 0,03	1,6 ± 0,07	1,5 ± 0,16	1,4 ± 0,08

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при * – $p < 0,05$.

По результатам *исследования мочи* существенных и достоверных различий не обнаружено. Все измеряемые показатели у опытных групп животных достоверно не различались с таковыми у кроликов контрольной группы (Таблицы 6.36 и 6.37). При заборе мочи у кроликов из мочевого пузыря обнаружена относительная степень ее прозрачности с преобладанием соломенно-желтой окраски у особей в 1-й и 2-й опытных группах и желтовато-коричневатой – у кроликов в 3-й опытной группе.

Таблица 6.36 – Влияние ГТ РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца) на биохимические показатели мочи кроликов (M ± m)

№ п/п	Исследуемые параметры	Контроль, крахмальная взвесь, 1%	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
Кролики-самцы					
1	Глюкоза (ммоль/л)	0	0	0	0
2	Белок (мг/100 мл)	0,3 ± 0,00	0,3 ± 0,00	0,3 ± 0,00	0,4 ± 0,07
3	рН мочи	7,4 ± 0,09	7,6 ± 0,19	7,5 ± 0,29	7,8 ± 0,20
4	Кетоновые тела	0	0	0	0
Кролики-самки					
1	Глюкоза (ммоль/л)	0	0	0	0
2	Белок (мг/100 мл)	0,3 ± 0,00	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,01	0,4 ± 0,06
3	рН мочи	7,3 ± 0,06	7,4 ± 0,10	7,6 ± 0,35	7,8 ± 0,12
4	Кетоновые тела	0	0	0	0

Таблица 6.37 – Влияние ГТ РУ-1205 (через 1 месяц его отмены) на биохимические показатели мочи кроликов ($M \pm m$)

№ п/п	Исследуемые параметры	Контроль, крахмальная взвесь, 1%	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
Самцы и самки кроликов					
1	Глюкоза (ммоль/л)	0	0	0	0
2	Белок (мг/100 мл)	$0,3 \pm 0,00$	$0,3 \pm 0,00$	$0,3 \pm 0,03$	$0,3 \pm 0,00$
3	рН мочи	$7,5 \pm 0,04$	$7,5 \pm 0,02$	$7,5 \pm 0,05$	$7,6 \pm 0,15$
4	Кетоновые тела	0	0	0	0

Морфологические исследования. Макроскопическая оценка

При аутопсии кроликов контрольной, а также 1-й (доза ГТ РУ-1205 5 мг/кг) и 2-й (доза ГТ РУ-1205 50 мг/кг) опытных групп изменений в состоянии органов и структуре их расположения не зафиксировано. Также не обнаружено существенных различий с контролем в коэффициентах масс внутренних органов у данных опытных групп животных (Таблицы 6.38 и 6.39). Отмечена лишь незначимая тенденция увеличения массы печени у животных во 2-й группе, у которых коэффициент массы печени повышался: у самцов крыс на 18,5 % ($p > 0,05$), а у самок – на 25,9 % ($p > 0,05$). Вместе с тем выявленные изменения у самок и самцов не выходили за пределы физиологической нормы, были обратимы, так как не обнаруживались через 1 месяц после отмены введения ГТ РУ-1205.

По результатам аутопсии животных, получавших ГТ РУ-1205 в дозе 500 мг/кг (3-я опытная группа), существенных изменений в структуре и состоянии внутренних органов не отмечено. Обращало на себя внимание наличие бледно-коричневого окраса печени и сглаженность краев органа, масса печени была увеличена, в сравнении с контролем на 22,2 % ($p > 0,05$) у самцов и на 37,0 % ($p < 0,05$) у самок. При этом в исследованиях, проведенных через один месяц после отмены введения ГТ РУ-1205, различий относительно контроля во внешнем виде, окраске печени и коэффициентах массы не зафиксировано.

Таблица 6.38 – Влияние ГТ РУ-1205 (внутрижелудочно, 3 месяца) на коэффициенты масс внутренних органов (M+m)

№ п/п	Органы	Контроль, крахмальная взвесь, 1%	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
Крысы-самцы					
1	Головной мозг	0,3 ± 0,005	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01
2	Сердце	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,02
3	Тимус	0,08 ± 0,017	0,07 ± 0,010	0,07 ± 0,019	0,05 ± 0,02
4	Легкие	0,5 ± 0,05	0,5 ± 0,05	0,5 ± 0,005	0,4 ± 0,01
5	Селезенка	0,03 ± 0,004	0,04 ± 0,010	0,04 ± 0,009	0,03 ± 0,001
6	Печень	2,7 ± 0,12	2,9 ± 0,27	3,2 ± 0,14	3,3 ± 0,25
7	Почки	0,5 ± 0,04	0,6 ± 0,06	0,6 ± 0,06	0,5 ± 0,03
8	Надпочечники	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,002
9	Эпидидимис	0,05 ± 0,008	0,04 ± 0,003	0,05 ± 0,008	0,05 ± 0,019
10	Тестикулы	0,1 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,1 ± 0,06
Крысы-самки					
1	Головной мозг	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,003	0,3 ± 0,01
2	Сердце	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,01
3	Тимус	0,06 ± 0,005	0,07 ± 0,016	0,07 ± 0,018	0,07 ± 0,007
4	Легкие	0,4 ± 0,02	0,5 ± 0,04	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,03
5	Селезенка	0,05 ± 0,006	0,05 ± 0,004	0,04 ± 0,006	0,05 ± 0,003
6	Печень	2,7 ± 0,20	2,7 ± 0,27	3,4 ± 0,08	3,7 ± 0,05*
7	Почки	0,5 ± 0,02	0,4 ± 0,09	0,5 ± 0,04	0,5 ± 0,01
8	Надпочечники	0,02 ± 0,002	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,001	0,02 ± 0,004
9	Яичники	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,0003	0,01 ± 0,004

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при * – $p < 0,05$.

Таблица 6.39 – Коэффициенты масс внутренних органов кроликов через один месяц после отмены введения ГТ РУ-1205 (M+m)

№ п/п	Органы	Контроль, крахмальная взвесь, 1%	Опытная группа-1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа-2, РУ-1205, 50 мг/кг	Опытная группа-3, РУ-1205, 500 мг/кг
1	Головной мозг	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01
2	Сердце	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,01
3	Тимус	0,05 ± 0,012	0,08 ± 0,017	0,05 ± 0,012	0,07 ± 0,014
4	Легкие	0,4 ± 0,03	0,5 ± 0,07	0,4 ± 0,03	0,5 ± 0,07
5	Селезенка	0,04 ± 0,003	0,04 ± 0,003	0,05 ± 0,011	0,04 ± 0,002
6	Печень	2,7 ± 0,19	2,8 ± 0,11	2,9 ± 0,26	3,5 ± 0,27
7	Почки	0,5 ± 0,02	0,5 ± 0,02	0, ± 0,04	0,5 ± 0,05
8	Надпочечники	0,01 ± 0,003	0,01 ± 0,003	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,002
9	Эпидидимис	0,05 ± 0,006	0,03 ± 0,010	0,02 ± 0,002	0,03 ± 0,015
10	Тестикулы	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,03
11	Яичники	0,01 ± 0,004	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,005

Микроскопические исследования

По результатам патоморфологических исследований препаратов тканей органов кроликов контрольной и 1-й опытной групп не отмечено структурных изменений в головном мозге, легких, тимусе, сердце, почках, надпочечниках, органах ЖКТ (желудке, отделах тонкого и толстого кишечника), селезенке, поджелудочной железе, печени, почках, органах репродуктивной системы (тестикулах, эпидидимисах и яичниках).

При обследовании препаратов тканей животных 2-й опытной группы также не было отмечено существенных различий с контролем в таких органах, как легкие, сердце, тимус, надпочечники, отделы ЖКТ, селезенка, поджелудочная железа, тестикулы и эпидидимисы у самцов и яичники у самок. Наряду с этим, фиксировалось повышение кровенаполнения в головном мозге и почках без каких-либо структурных изменений в них. При этом на препаратах печени просматривалось наличие единичных дистрофических изменений гепатоцитов, однако данные изменения не обнаруживались у этой группы животных через 1 месяц после отмены введения гранулята, что может свидетельствовать об отсутствии патологического влияния ГТ на данный орган при 3-месячном введении в дозе 50 мг/кг.

В подобных исследованиях, проведенных на животных 3-й опытной группы, выявлялись эффекты, свидетельствующие о наличии некоторого более выраженного воздействия ГТ РУ-1205 в дозе 500 мг/кг на структуры *головного мозга* (зафиксировано наличие выраженного

кровенеполнения сосудов микроциркуляторного русла, отечность ткани и дистрофические изменения отдельных участков ткани органа, которые в незначительной степени сохранялись через 1 месяц после отмены), а также *сердца, печени и почек*. При этом на препаратах миокарда структура органа была сохранена, но прослеживалось выраженное кровенеполнение вен и межмышечных капилляров. Кардиомиоциты были удлиненной формы и обычных размеров. Выявлялось лишь незначительное истончение мышечных волокон. В исследованиях, проведенных через один месяц после отмены введения субстанции, указанные изменения не фиксировались, и в слабой степени сохранялось лишь полнокровие сосудов.

На препаратах *легких* у животных данной опытной группы прослеживалось полнокровие венул. Просветы воздухоносных путей и альвеол легких были свободны. При этом фиксировалось утолщение межальвеолярных перегородок и снижение кровоснабжения межальвеолярных капилляров. В исследованиях, проведенных через 1 месяц после отмены вещества, прослеживалось маловыраженное полнокровие сосудов микроциркуляторного русла легких у животных данной опытной группы.

На препаратах *печени* строение печеночных балок было сохранено. Состояние триад было без особенностей. На препаратах органа животных 3-й опытной группы прослеживались дистрофические изменения гепатоцитов, с наличием кариолизиса отдельных групп гепатоцитов. В исследованиях тканей органа, выделенных у животных через 1 месяц после отмены введения, явления дистрофии гепатоцитов были сглажены с незначительным кариолизисом.

На препаратах *почек* структура и соотношение коркового и мозгового вещества не отличались от контрольных животных. Клубочковый аппарат также соответствовал контролю. На срезах органа животных из 3-й опытной группы наблюдали набухание эпителия и сужение, а также фиксировался лизис ядер отдельных клеток канальцев и полнокровие венул. В исследованиях, проведенных после отмены введения ГТ РУ-1205, на препаратах органа прослеживались явления восстановительных процессов. При этом набухание эпителия проксимальных и дистальных канальцев было маловыраженным без признаков лизиса ядер клеток.

Таким образом, из проведенных патоморфологических исследований можно сделать заключение, что ГТ РУ-1205 в дозах 5 и 50 мг/кг при 3-месячном внутрижелудочном введении кроликам не оказывает патологически-повреждающего влияния на структуры головного мозга, сердце, на лимфоэпителиальный орган тимус и такие паренхиматозные органы, как печень, почки, надпочечники, поджелудочная железа, органы ЖКТ, половые органы. Выявляемые изменения у животных, получавших ГТ РУ-1205 в дозе 50 мг/кг, в головном мозге, почках и печени (в форме дистрофических изменений гепатоцитов), были полностью восстановлены до

состояния контрольных животных через 1 месяц после отмены введения, что свидетельствует об их обратимости. Выявляемые изменения в головном мозге, сердце и почках в форме увеличения кровоснабжения без структурных изменений у животных, получавших ГТ в дозе 50 мг/кг, а также в печени (наличие дистрофических изменений гепатоцитов), были полностью нивелированы до состояния контрольных животных через 1 месяц после отмены введения исследуемого препарата, что свидетельствует об их обратимости.

Под действием ГТ РУ-1205 в дозе 500 мг/кг (высшая испытываемая доза, превышает терапевтическую дозу 5 мг/кг в 100 раз) при 3-месячном внутрижелудочном введении кроликам не отмечено патологического влияния на структуру головного мозга, сердца, тимуса, почек, надпочечников, поджелудочной железы, органов ЖКТ и половых органов. Зарегистрированные изменения у животных в *головном мозге* (выраженное кровенаполнение сосудов микроциркуляторного русла, отечность ткани и дистрофические изменения отдельных участков ткани органа), *печени* (дистрофические изменения гепатоцитов, с наличием кариолизиса отдельных групп гепатоцитов), *почках* (набухание эпителия проксимальных и дистальных канальцев было маловыраженным без признаков лизиса ядер клеток) были менее выражены у животных, исследуемых через месяц после отмены введения испытываемого препарата, что также может свидетельствовать о наличии обратимости процессов повреждения ГТ РУ-1205 в дозе 500 мг/кг на данные органы. Вышеописанные процессы согласуются с результатами исследований, выполненных на крысах, где наиболее выраженные изменения в печени и почках также были зафиксированы в группе, получавшей АФС РУ-1205 в максимальной дозе – 500 мг/кг.

ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ АФС РУ-1205 НА ПРОЦЕССЫ РЕПРОДУКЦИИ

В свете имеющихся данных о воздействии агонистов КОР на различные поведенческие аспекты грызунов, такие как половая активность и мотивация, а также способность вызывать отвращение к определенному месту и подавлять высвобождение дофамина (Resendez S.L., Kuhnmuensch M., 2012; Robles C.F., McMackin M.Z., 2014; Conway S.M., Puttick D., 2019), была проведена серия тестов с целью изучения влияния АФС РУ-1205 в виде фармацевтической субстанции на репродуктивные процессы самцов и самок крыс.

7.1. Влияние на генеративную функцию

Опыты на самцах

Половое поведение

Результаты изучения полового поведения у самцов, получавших в течение 2 месяцев АФС РУ 1205 в дозах 5 мг/кг (1-я опытная группа) и 500 мг/кг (2-я опытная группа), представлены в таблице 7.1. Как следует из приведенных данных, у тестируемых опытных групп животных по сравнению с группой контроля повреждающего влияния на исследуемые параметры полового поведения не прослеживалось. У самцов в первой опытной группе несколько сокращался латентный период первого подхода к тестируемой интактной крысе самке (на 23,3 %, $p < 0,001$), увеличивалось количество эмоциональных подходов к этой самке (на 31 %, $p > 0,05$), при этом общее время половой активности практически не изменялось относительно контрольных величин.

Продолжительность латентного периода первого подхода к интактной самке относительно контроля у крыс-самцов во второй опытной группы не изменялась. Однако длительность половой активности статистически значимо сократилась на 44,2 % ($p < 0,001$), как и количество эмоциональных подходов к самке на 41,2 % ($p < 0,01$), а также число покрытий на 80 % ($p > 0,05$). В группе крыс-самцов, получавших АФС РУ-1205 в максимальной дозе (500 мг/кг), отмечено сокращение длительности половой активности на 45 % ($p < 0,001$), при одновременном уменьшении количества эмоциональных подходов к самке на 40 % ($p < 0,05$) и количества покрытий на 80 % ($p < 0,05$).

Таблица 7.1 – Влияние АФС РУ-1205 на половое поведение крыс-самцов в исследованиях с интактными самками ($M \pm m$)

№ п/п	Исследуемые группы самцов	Длительность		Количество	
		латентного периода половой активности, с	половой активности, с	эмоциональных подходов к самке	покрытий
1	Контроль, вода очищенная	17,8 ± 0,95	462,0 ± 8,4	15,3 ± 2,30	1,5 ± 0,56
2	АФС РУ-1205, 5 мг/кг	13,7 ± 0,92 ^{##}	414,0 ± 17,4	20,0 ± 1,39	1,7 ± 0,42
3	АФС РУ-1205, 500 мг/кг	16,2 ± 1,38	258,0 ± 14,4 ^{###}	9,0 ± 0,58 [#]	0,3 ± 0,21 [#]

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при ^{##} – $p < 0,01$; ^{###} – $p < 0,001$.

Таким образом, из результатов исследований можно заключить, что АФС РУ-1205 в виде субстанции при пероральном введении в течение двух месяцев существенно не влияет на мотивационную спаривательную функцию самцов крыс. Проведенные тесты позволяют судить о явной тенденции к активации полового поведения у самцов, которым АФС РУ-1205 вводили в дозе 5 мг/кг. В то же время наблюдалось некоторое снижение половой активности, исходя из параметров рецептивного поведения, у самцов, которым была введена АФС РУ-1205 в максимальной дозе 500 мг/кг.

Функциональное состояние сперматозоидов

Исследования влияния АФС РУ-1205 на функциональное состояние сперматозоидов и сперматогенез приведены в таблицах 7.2–7.5.

Из результатов проведенных исследований относительно группы контроля в спермограмме у самцов первой опытной группы выявлялось увеличение общего количества сперматозоидов на 75,7 % ($p < 0,001$), снижение количества патологических форм на 25 % ($p < 0,01$) и на 10 % увеличение времени подвижности ($p > 0,05$), что, вероятно, может свидетельствовать о некотором активирующем влиянии исследуемой субстанции на сперматогенез.

В сравнении с контролем у крыс-самцов во второй опытной группе общее число сперматозоидов снизилось на 23,3 % ($p > 0,05$), количество патологических форм – на 35 % ($p < 0,001$), при этом количество неподвижных форм увеличилось на 17,5 % ($p < 0,05$), а время их подвижности – на 10 % ($p < 0,05$).

Таблица 7.2 – Влияние АФС РУ-1205 на функциональное состояние сперматозоидов крыс-самцов (M ± m)

№ п/п	Показатели	Контроль, вода очищенная	АФС РУ-1205, 5 мг/кг	АФС РУ-1205, 500 мг/кг
1	Общее количество сперматозоидов, 1×10^6	30,9 ± 2,87	54,3 ± 1,09 ^{###}	23,7 ± 1,12
2	Патологические формы, %	16,9 ± 0,92	12,7 ± 0,51 ^{##}	11,0 ± 0,62 ^{###}
3	Неподвижные формы, %	21,7 ± 1,23	22,3 ± 1,11	25,5 ± 0,81 [#]
4	Время подвижности, мин	365,0 ± 5,16	400,0 ± 15,22	325,0 ± 13,60 [#]
5	Кислотная резистентность, рН	2,6 ± 0,03	3,6 ± 0,37 [#]	3,0 ± 0,24
6	Осмотическая резистентность, %	1,9 ± 0,06	1,9 ± 0,05	2,0 ± 0,04 [#]

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при [#] – $p < 0,05$; ^{##} – $p < 0,01$; ^{###} – $p < 0,001$.

Морфометрические исследования эпителиосперматогенного слоя

В дальнейших морфометрических исследованиях, представленных в таблице 7.3, не выявлялось патологических изменений в исследуемых параметрах сперматогенеза крыс-самцов опытных групп в сравнении с группой контроля. На препаратах эпителиосперматогенного слоя гонад крыс-самцов первой и второй опытных групп прослеживались колебания количества сперматогоний, статистически значимо не различавшиеся с группой контроля. В исследуемых группах отмечалась дозозависимая тенденция к снижению числа канальцев со слущенным эпителием (на 9,5 %, $p > 0,05$ в 1-й и на 15 % $p > 0,05$ – во 2-й опытных группах). При этом число канальцев с XII стадией мейоза увеличивалось на 30,4 % ($p > 0,05$) в первой опытной группе и на 22 % ($p > 0,05$) во второй. У крыс-самцов, получавших соединения РУ-1205 в дозе 5 мг/кг отмечалось увеличение индекса сперматогенеза на 2,7 % ($p < 0,01$) относительно группы контроля. Из полученных данных можно предположить наличие у исследуемой АФС РУ-1205 некоторого активизирующего влияния на функцию эпителиосперматогенного слоя крыс-самцов.

Учитывая отсутствие влияния на функциональное состояние сперматозоидов и сперматогенез крыс-самцов в первой опытной группе и тенденции отрицательных изменений, зафиксированных в спермограмме, в группе животных, получавших АФС РУ-1205 в дозе 500 мг/кг, сочли целесообразным провести исследования по оценке отдаленных эффектов изучаемого соединения на вышеперечисленные параметры после двухмесячной отмены введения. По результатам исследований, проведенных через 2 месяца после отмены субстанции АФС РУ-1205, выявлялось увеличение общего количества сперматозоидов на 28 % ($p > 0,05$) и незначительно числа патологических (на 18 %, $p < 0,05$) и неподвижных форм (на 12 %, $p < 0,05$).

$p > 0,05$) (Таблица 7.4). Из проведенных исследований можно сделать вывод о наличии нормализации функционального состояния сперматозоидов крыс-самцов в опытной группе через 2 месяца после курсового введения АФС РУ-1205 в дозе 500 мг/кг.

Таблица 7.3 – Влияние АФС РУ-1205 на сперматогенез крыс-самцов ($M \pm m$)

№ п/п	Показатели	Контроль, вода очищенная	АФС РУ-1205, 5 мг/кг	АФС РУ-1205, 500 мг/кг
1	Коэффициент массы гонад, %	$1,0 \pm 0,05$	$1,0 \pm 0,06$	$1,0 \pm 0,03$
2	Коэффициент массы эпидидимисов, %	$0,4 \pm 0,02$	$0,4 \pm 0,01$	$0,3 \pm 0,002$
3	Количество сперматогоний	$258,5 \pm 4,75$	$264,5 \pm 5,62$	$252,5 \pm 6,4$
4	Число канальцев со слущенным эпителием	$5,3 \pm 0,33$	$4,8 \pm 0,40$	$4,5 \pm 0,22$
5	Число канальцев с XII стадией мейоза	$2,3 \pm 0,21$	$3,0 \pm 0,37$	$2,8 \pm 0,31$
6	Индекс сперматогенеза (у.е.)	$3,32 \pm 0,01$	$3,41 \pm 0,02^{\#}$	$3,36 \pm 0,02$

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при $\# - p < 0,05$.

Таблица 7.4 – Функциональное состояние сперматозоидов крыс-самцов после 2 месяцев отмены введения АФС РУ-1205 ($M \pm m$)

№ п/п	Показатели	Контроль, вода очищенная	АФС РУ-1205, 500 мг/кг
1	Общее количество сперматозоидов, $1 \cdot 10^6$	$24,4 \pm 1,01$	$31,3 \pm 2,70$
2	Патологические формы, %	$11,8 \pm 0,46$	$14,0 \pm 0,82^{\#}$
3	Неподвижные формы, %	$18,8 \pm 1,01$	$21,0 \pm 0,97$
4	Время подвижности, мин	$301,7 \pm 4,77$	$295,0 \pm 8,06$
5	Кислотная резистентность, рН	$2,6 \pm 0,06$	$2,5 \pm 0,08$
6	Осмотическая резистентность, %	$1,8 \pm 0,08$	$1,8 \pm 0,08$

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при $\# - p < 0,05$.

В таблице 7.5 представлены результаты морфометрических исследований эпителиосперматогенного слоя гонад крыс ((показатели сперматогенеза), подтверждающие вышеизложенное предположение. В ходе анализа экспериментальных данных выявлено, что в группе крыс из опытной группы, получавших АФС РУ-1205 в дозе 500 мг/кг, наблюдалось статистически незначимое увеличение количества сперматогоний на 5 % ($p > 0,05$), в то время как количество канальцев со слущенным эпителием снижалось на 31,0 % ($p < 0,05$), в сравнении с контрольной группой. Также было замечено статистически не значимое, но выраженное

увеличение количества канальцев с XII стадией мейоза на 30,4 % ($p > 0,05$) и индекса сперматогенеза на 1,7 % ($p > 0,05$).

Таблица 7.5 – Показатели сперматогенеза крыс после 2 месяцев отмены введения

АФС РУ-1205 (M ± m)

№ п/п	Показатели	Контроль, вода очищенная	АФС РУ-1205, 500 мг/кг
1	Коэффициент массы гонад, %	0,9 ± 0,01	1,0 ± 0,01 ^{##}
2	Коэффициент массы эпидидимисов, %	0,4 ± 0,004	0,4 ± 0,01
3	Количество сперматогоний	247 ± 6,95	259 ± 6,0
4	Число канальцев со слущенным эпителием	5,5 ± 0,43	3,8 ± 0,31 [#]
5	Число канальцев с XII стадией мейоза	2,3 ± 0,21	3,0 ± 0,26
6	Индекс сперматогенеза (у.е.)	3,35 ± 0,02	3,41 ± 0,02

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при [#] – $p < 0,05$; ^{##} – $p < 0,01$.

Оплодотворяющая способность

В дальнейшем была проанализирована оплодотворяющая способность крыс самцов после двухмесячного курса введения АФС РУ-1205.

По результатам исследований, представленных в таблице 7.6, не отмечено негативного воздействия исследуемого соединения на фертильность животных. Так, у интактных самок, спаренных с самцами первой опытной группы, индекс беременности был выше (на 6 %, $p > 0,05$), чем в группе контроля. Плодовитость данных самок не изменилась относительно группы контроля, при этом общая эмбриональная гибель сократилась на 35 % (12,6% в опытной и 19,4 % в контрольной). Возраст эмбрионов у интактных самок, спаренных с самцами первой опытной группы, в среднем был на 2,6 дня больше ($p < 0,05$), чем в контрольной группе, что может свидетельствовать о более раннем спаривании и наступлении зачатия.

В отношении группы интактных самок, спаренных с самцами, которым вводили АФС РУ-1205 в дозе 500 мг/кг, также можно сделать вывод об отсутствии повреждающего действия изучаемой субстанции на процессы зачатия. Индекс беременности у данной группы самок не изменялся относительно группы контроля, плодовитость отчетливо, но статистически незначимо снижалась на 15,5 % ($p > 0,05$), общая эмбриональная гибель также не изменялась. Возраст плодов превышал контрольные величины на 1,8 дня ($p > 0,05$), что также может свидетельствовать о более раннем спаривании и оплодотворении.

Таблица 7.6 – Влияние АФС РУ-1205 на оплодотворяющую способность крыс-самцов в исследованиях с интактными самками ($M \pm m$)

№ п/п	Показатели		Контроль, вода очищенная	АФС РУ-1205, 5 мг/кг	АФС РУ-1205, 500 мг/кг
1	Количество (у.е. на 1 самку)	Желтых тел беременности	12,6 ± 0,45	11,5 ± 0,47	10,3 ± 0,63 ^{##}
2		Плодов	10,3 ± 0,67	10,0 ± 0,47	8,7 ± 1,01
3		Резорбций	0,7 ± 0,30	0,9 ± 0,31	0,4 ± 0,16
4	Гибель, % (на 1 самку)	Доимплантационная	12,6 ± 3,32	4,4 ± 1,66 [#]	12,9 ± 5,33
5		Постимплантационная	6,8 ± 3,01	8,2 ± 2,88	6,5 ± 2,92
6	Возраст эмбриона, дни		13,2 ± 0,80	15,8 ± 0,63 [#]	15,0 ± 1,09
7	Индекс беременности, %		90,0 ± 6,67	95,5 ± 4,55	90,0 ± 6,67

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при [#] – $p < 0,05$; ^{##} – $p < 0,01$.

На основании проведенных исследований можно заключить, что соединение РУ-1205 в виде АФС при длительном (два месяца) ежедневном пероральном введении в дозах 5 и 500 мг/кг не оказывает патологического влияния на половую мотивационную активность, функции сперматозоидов и процессы сперматогенеза у самцов крыс. При этом данное вещество мягко активизирует фертилизующую способность самцов, оказывает положительное влияние на функцию эпителиосперматогенного слоя без патологического воздействия на функциональное состояние канальцев.

Опыты на самках

Половое поведение

Результаты исследования полового поведения самок, получавших АФС РУ-1205 в дозах 5 (первая опытная группа) и 500 мг/кг (вторая опытная группа) внутривенно в течение 15 дней (3–4 цикла овогенеза), представлены таблице 7.7. В проведенных исследованиях не установлено негативного влияния изучаемого соединения на половое поведение крыс-самок. У самок в опытных группах отмечалась тенденция сокращения латентного периода половой активности (времени первого подхода к самцу) на 21 % ($p < 0,01$) в первой и на 33,3 % ($p < 0,001$) во второй опытных группах, при одновременном увеличении длительности половой активности на 6,5 % ($p > 0,05$) и на 11,4 % ($p < 0,01$) соответственно. Количество эмоциональных подходов к самцу не изменялось, но количество лордозов несколько снижалось в первой и увеличилось на 87,5 % ($p > 0,05$) во второй опытной группе.

Таблица 7.7 – Влияние АФС РУ-1205 на половое поведение крыс-самок в паре с интактными самцами ($M \pm m$)

№ п/п	Исследуемые группы самок	Длительность		Количество	
		латентного периода половой активности, с	половой активности, с	эмоциональных подходов к самцу	лордозов
1	Контроль, вода очищенная	22,8 ± 0,87	366,0 ± 4,2	8,2 ± 0,60	0,8 ± 0,31
2	АФС РУ-1205, 5 мг/кг	18,0 ± 0,93 ^{##}	390,0 ± 12,0	8,3 ± 0,49	0,3 ± 0,21
3	АФС РУ-1205, 500 мг/кг	15,2 ± 0,70 ^{###}	408,0 ± 8,4 ^{##}	9,0 ± 0,58	1,5 ± 0,56

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при ^{##} – $p < 0,01$; ^{###} – $p < 0,001$.

Исследование эстрального цикла

По результатам исследования эстрального цикла (Таблица 7.8) не выявлялось статистически значимых изменений относительно группы контроля у крыс-самок в первой опытной группе. А у самок во второй опытной группе прослеживалась лишь тенденция снижения частоты встречаемости фазы эструс (на 9,5 %, $p > 0,05$) при одновременном увеличении частоты встречаемости фазы диэструс на 36 % ($p < 0,05$).

Таблица 7.8 – Влияние АФС РУ-1205 на эстральный цикл самок ($M \pm m$)

№ п/п	Фазы цикла, дни	Контроль, вода очищенная	АФС РУ-1205, 5 мг/кг	АФС РУ-1205, 500 мг/кг
1	Диэструс	2,5 ± 0,22	2,8 ± 0,25	3,4 ± 0,03 [#]
2	Проэструс	2,5 ± 0,13	2,6 ± 0,20	2,3 ± 0,28
3	Эструс	5,3 ± 0,25	4,9 ± 0,30	4,8 ± 0,21
4	Метаэструс	1,7 ± 0,17	1,7 ± 0,21	1,5 ± 0,18

Примечание: продолжительность наблюдений составляла 15 дней, исследование мазков начинали с 3-го дня. Изменения статистически значимы относительно группы контроля при [#] – $p < 0,05$.

В последующих исследованиях было проанализировано влияние АФС РУ-1205 на фертильность крыс-самок (Таблица 7.9). Установлено, что у самок опытных групп, спаренных с интактными самцами индекс беременности не изменялся относительно контрольных значений. При этом в яичниках крыс опытных групп обнаруживалось большее

количество желтых тел беременности [на 14,2 % ($p > 0,05$) в 1-й и на 11 % ($p > 0,05$) во 2-й группе] и плодов в рогах матки [на 18,8 % ($p > 0,05$) в 1-й и на 16,7 % ($p > 0,05$) во 2-й группе]. Общая эмбриональная гибель также снижалась как в первой, так и во второй опытных группах [(на 21,6 % ($p > 0,05$) и на 27,9 % ($p > 0,05$)). Возраст эмбрионов на 1,6 дня был больше во второй опытной группе ($p > 0,05$).

Таблица 7.9 – Влияние АФС РУ-1205 на процессы зачатия у самок, спаренных с интактными самцами ($M \pm m$)

№ п/п	Показатели		Контроль, вода очищенная	АФС РУ-1205, 5 мг/кг	АФС РУ-1205, 500 мг/кг
1	Количество, у.е. на 1 самку	Желтых тел беременности	11,9 ± 0,55	13,6 ± 0,65	13,2 ± 0,51
2		Плодов	9,6 ± 0,91	11,4 ± 0,83	11,2 ± 0,66
3		Резорбции	0,8 ± 0,36	0,4 ± 0,22	1,1 ± 0,35
4	Гибель, % (на 1 самку)	Доимплантационная	13,5 ± 3,86	13,6 ± 2,96	6,7 ± 1,74
5		Постимплантационная	8,7 ± 3,59	3,8 ± 2,01	9,3 ± 3,01
6	Коэффициент массы яичников		0,045 ± 0,003	0,046 ± 0,002	0,047 ± 0,001
7	Возраст эмбриона, дни		14,8 ± 0,74	14,8 ± 0,90	16,4 ± 0,27
8	Индекс беременности, %		90,0 ± 6,67	90,0 ± 6,67	90,0 ± 6,67

На основании проведенных исследований можно заключить, что АФС РУ-1205 в дозах 5 и 500 мг/кг не оказывает повреждающего действия на половую мотивационную активность, фертильность и на овуляторную цикличность крыс-самок.

7.2. Эмбрио- и фетотоксическое действие изучаемого соединения

Исследование проводили в два этапа. На первом – оценивали эмбрио- и фетотоксическое действие АФС РУ-1205, регистрируемое в антенатальном периоде развития плодов. С этой целью исследуемое соединение вводили крысам-самкам в период органогенеза с 6-го по 16-й день беременности в дозах 5, 50, 500 мг/кг. На втором – оценивали эмбрио- и фетотоксическое действие АФС РУ-1205 на процессы постнатального развития потомства. С этой целью исследуемую субстанцию вводили беременным самкам с 6-го по 20-й день в дозе 500 мг/кг.

На первом этапе исследования оценивали эмбрио- и фетотоксическое действие АФС РУ-1205, регистрируемое в антенатальном периоде развития плодов, включавшее в себя регистрацию массы тела беременных крыс, показатели эмбрионального развития, макро- и микроскопическую оценку плодов.

Масса тела. В ходе исследования массы тела беременных самок крыс, которым в период с 6-го по 16-й дни беременности были вводимы различные дозы АФС РУ-1205: 5 мг/кг (первая группа), 50 мг/кг (вторая группа) и 500 мг/кг (третья группа), взвешивали на 1, 6, 16-й и 20-й день. Отмечено дозозависимое изменения прироста массы тела (Таблица 7.10). Так, на 16-й день эксперимента относительно значений группы контроля в группах крыс-самок, которым исследуемое соединение вводили в дозах 5 и 50 мг/кг (первая и вторая опытные) прирост массы тела был выше на 25,6 % ($p < 0,01$) и 13 % ($p > 0,05$) соответственно, в то время как в группе животных, получавших АФС РУ-1205 в дозе 500 мг/кг, – ниже на 30,3 % ($p < 0,001$). На 20-й день наблюдений различия в приросте массы тела в первой и второй опытных группах нивелировались и значения приблизились к контрольным. При этом в третьей опытной группе данный показатель оставался ниже контрольного на 26,5 % ($p < 0,001$).

Таблица 7.10 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, 6–16-й дни беременности) на прирост массы тела беременных крыс ($M \pm m$, г)

№ п/п	Периоды измерений, дни	Контроль, вода очищенная	АФС РУ-1205, 5 мг/кг	АФС РУ-1205, 50 мг/кг	АФС РУ-1205, 500 мг/кг
1	Исход	210,2 ± 2,03	209,4 ± 1,37	208,4 ± 1,53	205,8 ± 2,78
2	6	227,2 ± 2,69*** 8,1 %	230,7 ± 1,52*** 10,2 %	227,9 ± 2,51*** 9,4 %	220,0 ± 2,82*** 6,9 %
3	16	260,4 ± 3,01*** 23,8 %	272,0 ± 2,13***## 29,9 %	264,4 ± 2,35*** 26,9 %	239,9 ± 4,12***### 16,6 %
4	20	295,0 ± 4,03*** 40,3 %	293,8 ± 3,12*** 40,3 %	294,0 ± 3,79*** 41,1 %	266,8 ± 5,69***### 29,6 %

Примечание: изменения статистически значимы относительно исходных данных при *** – $p < 0,001$; относительно группы контроля при ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$.

Аntenатальное развитие плодов

По результатам эвтаназии и некропсии беременных самок (Таблица 7.11) не выявлялось повреждающего влияния субстанции АФС РУ-1205 на процессы органо- и фетогенеза. Имеющие место изменения по показателям (количеству желтых тел беременности, числу мест имплантаций плодов) и, в связи с этим, повышения доимплантационной гибели плодов на 26,3 %, зафиксированные у самок, получавших АФС РУ-1205 в токсической дозе, не выходили за рамки физиологической нормы (Трахтенберг И.М., Сова В.О. и др., 1991). Тогда как у самок, получавших данную субстанцию в дозах 5 и 50 мг/кг, доимплантационная гибель плодов была существенно ниже контрольных значений на 76,7 % ($p < 0,05$) и 35,7 % ($p > 0,05$) соответственно.

При визуальном осмотре плодов, выделенных от самок опытных групп, не зафиксировано достоверных различий по краниокаудальным размерам и их массе тела относительно группы контроля.

Таблица 7.11 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, 6–16-й дни беременности) на процессы эмбрионального развития плодов ($M \pm m$)

№ п/п	Показатели		Контроль, вода очищ.	АФС РУ-1205, 5 мг/кг	АФС РУ-1205, 50 мг/кг	АФС РУ-1205, 500 мг/кг	Физиологическая норма*
1	Количество (у.е. на 1 самку)	Желтых тел беременности	12,6 ± 0,22	12,2 ± 0,46	11,0 ± 0,54 [#]	10,1 ± 0,61 ^{##}	17,0 ± 0,79
2		Мест имплантаций	10,9 ± 0,53	11,9 ± 0,55	10,1 ± 0,54	8,6 ± 0,67 [#]	10,0 ± 0,5
3		Резорбций	0,3 ± 0,13	0,4 ± 0,15	0,5 ± 0,18	0,5 ± 0,21	0,58 ± 0,16
4	Гибель, % (на 1 самку)	ДИ	12,9 ± 4,19	3,0 ± 1,43 [#]	8,3 ± 2,26	16,3 ± 2,94	12,8 ± 6,6
5		ПИ	2,5 ± 1,04	3,5 ± 1,40	4,3 ± 1,55	5,3 ± 2,33	8,2 ± 1,2
6	Количество плодов		10,6 ± 0,52	11,5 ± 0,57	9,6 ± 0,47	8,1 ± 0,66 ^{##}	10,1 ± 1,7
7	Краниокаудальные размеры плода, см		3,1 ± 0,04	3,1 ± 0,02	3,1 ± 0,06	3,1 ± 0,06	3,07 ± 0,61
8	Масса плода, г		2,3 ± 0,05	2,3 ± 0,05	2,2 ± 0,04	2,2 ± 0,08	2,36 ± 0,04

Примечание: * по данным И. М. Трахтенберга, 1991; ДИ – доимплантационная гибель, ПИ – постимплантационная гибель; изменения статистически значимы относительно группы контроля при [#] – $p < 0,05$; ^{##} – $p < 0,01$.

По результатам исследований развития скелета плодов, приведенных в таблице 7.12, прослеживалось увеличение точек оссификации у плодов в области грудины во всех исследуемых группах на 8,3 % ($p < 0,001$), 5,5 % ($p < 0,01$) и 2,8 % ($p > 0,05$) соответственно

в 1-й, 2-й и 3-й опытных группах относительно группы контроля, не выходящее за границы физиологической нормы, установленной в границах от 2 до 5 точек (Дыбан А.П., Пучков В.Ф., 1986). При этом у этих же плодов количество оссифицированных точек в пястных и плюсневых участках не отличалось от таковых относительно группы контроля.

Таблица 7.12 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, 6–16-й дни беременности) на процессы оссификации плодов ($M \pm m$)

№ п/п	Точки оссификаций (на 1 самку)	Контроль, вода очищенная	АФС РУ-1205, 5 мг/кг	АФС РУ-1205, 50 мг/кг	АФС РУ-1205, 500 мг/кг
1	Грудина	$3,6 \pm 0,05$	$3,9 \pm 0,03^{###}$	$3,8 \pm 0,04^{##}$	$3,7 \pm 0,05$
2	Ребра	$12,0 \pm 0,01$	$12,0 \pm 0,02$	$12,0 \pm 0,02$	$12,0 \pm 0,00$
3	Позвонки	$21,2 \pm 0,04$	$21,0 \pm 0,02^{\#}$	$21,0 \pm 0,03^{\#}$	$21,2 \pm 0,05$
Верхняя конечность правая					
1	Лопатка	$1,0 \pm 0,00$	$1,0 \pm 0,00$	$1,0 \pm 0,00$	$1,0 \pm 0,00$
2	Ключица	$1,0 \pm 0,00$	$1,0 \pm 0,00$	$1,0 \pm 0,00$	$1,0 \pm 0,00$
3	Конечность	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$
4	Пястна	$3,0 \pm 0,01$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$
Верхняя конечность левая					
1	Лопатка	$1,0 \pm 0,00$	$1,0 \pm 0,00$	$1,0 \pm 0,00$	$1,0 \pm 0,00$
2	Ключица	$1,0 \pm 0,00$	$1,0 \pm 0,00$	$1,0 \pm 0,00$	$1,0 \pm 0,00$
3	Конечность	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$
4	Пястна	$3,0 \pm 0,01$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$
Нижняя конечность правая					
1	Тазовые	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$
2	Конечность	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$
3	Плюсна	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$
Нижняя конечность левая					
1	Тазовые	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$
2	Конечность	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$
3	Плюсна	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,00$

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при $^{\#}$ – $p < 0,05$; $^{##}$ – $p < 0,01$; $^{###}$ – $p < 0,001$.

При макро- и микроскопическом осмотре плодов, выделенных от опытных и контрольных самок, не обнаружено уродств и внешневидимых изменений в развитии и кровоизлияний как подкожных, так и во внутренних органах.

Таким образом, после анализа полученных экспериментальных данных, можно сделать вывод об отсутствии у соединения РУ-1205 в виде АФС эмбрио- и фетотоксических

свойств при длительном внутрижелудочном введении беременным крысам в дозах 5, 50 и 500 мг/кг. Под действием изучаемого соединения не выявлено уродств, внешневидимых патологических изменений в общем состоянии выделенных плодов, процессах качества зачатия и антенатального развития. Выявляемое у беременных самок крыс, зависимое от дозы соединения, повышение постимплантационной гибели плодов не выходило за рамки физиологической нормы, отражалось лишь на снижении общей плодовитости, но не сказывалось на массе, краниокаудальных размерах, качестве развития процессов оссификации скелета.

На втором этапе оценивали эмбрио- и фетотоксическое действие АФС РУ-1205 на процессы постнатального развития потомства. С учетом результатов первого этапа исследований, в котором было показано отсутствие эмбрио- и фетотоксического действия у АФС РУ-1205, вводимой внутрижелудочно беременным крысам самкам в дозах 5, 50 и 500 мг/кг, на втором этапе исследований сочли целесообразным изучить его эмбрио- и фетотоксическое действие, регистрируемое на постнатальном развитии потомства. В этой связи АФС РУ-1205 вводили интрагастрально крысам-самкам с 6-го по 20-й дни беременности в дозе 500 мг/кг.

Масса тела

Установлено, что к периоду родоразрешения масса беременных крыс, получавших АФС РУ-1205, существенно не различалась с контрольными данными (Таблица 7.13).

Таблица 7.13 – Влияние АФС РУ-1205 (внутрижелудочно, с 6-го дня беременности по день родов) на динамику массы тела крыс-самок ($M \pm m$, г)

№ п/п	Периоды измерений, дни	Контроль, вода очищенная	АФС РУ-1205, 500 мг/кг
Масса тела в период беременности			
1	Исход	209,4 ± 0,97	209,2 ± 1,72
2	20-й день	286,7 ± 4,55	301,8 ± 6,97
Масса тела в период лактации			
1	1-й день после родов	242,6 ± 4,14	248,7 ± 8,15
2	7-й день	242,7 ± 3,93	254,2 ± 7,01
3	14-й день	236,9 ± 4,32	250,2 ± 5,94
4	21-й день	229,4 ± 5,11	240,3 ± 6,05

В последующих послеродовых наблюдениях у лактирующих самок отмечено снижение массы тела относительно послеродовых значений. При этом у самок крыс в опытной группе к окончанию 3-недельного периода вскармливания потомства масса тела относительно 1-го дня после родов снизилась на 8,4 г ($p > 0,05$), против группы контроля – 13,2 г ($p > 0,05$) (Таблица 7.14). Среди самок из опытных групп не обнаружено различий в особенностях периода гнездования и отношения к появившемуся потомству. Не было зафиксировано случаев отказа от вскармливания крысами матерями своих новорожденных крысят.

По результатам 2-месячных наблюдений за потомством опытной группы крыс выявлялись незначительные различия с контролем по динамике прироста массы тела. Из представленных в таблице 7.14 данных видно, что в исходном состоянии (4-й день после рождения) масса тела крысят опытной группы была практически одинакова с группой контроля. Несущественные различия у этих крысят прослеживались в период молочного вскармливания. С началом дифференцированного питания и до окончания периода 2-месячных наблюдений масса тела крысят в опытной группе также существенно не различалась и соответствовала их физиологическому приросту.

Таблица 7.14 – Влияние АФС РУ-1205 на массу тела крысят в постнатальный период развития (крысам матерям препарат вводили внутривентрикулярно с 6-го дня беременности по день родов), $M \pm m$, г

№ п/п	Периоды измерений, дни	Контроль, вода очищенная	АФС РУ-1205, 500 мг/кг
Самцы			
1	4	10,8 ± 0,38	9,9 ± 0,30
2	7	16,6 ± 0,38	16,0 ± 0,46
3	14	28,7 ± 0,63	27,9 ± 0,78
4	21	41,5 ± 0,87	42,7 ± 0,91
5	30	70,1 ± 0,94	69,6 ± 0,69
6	60	126,0 ± 1,97	124,9 ± 1,77
Самки			
1	4	10,4 ± 0,20	9,7 ± 0,36
2	7	16,3 ± 0,29	15,7 ± 0,48
3	14	28,6 ± 0,53	27,0 ± 0,86
4	21	41,3 ± 0,83	40,6 ± 0,77
5	30	68,5 ± 0,69	66,6 ± 0,99
6	60	122,2 ± 1,88	117,7 ± 1,87

Физическое развитие

В особенностях скорости физического развития у крысят опытной группы относительно группы контроль обнаружено опережение сроков открытия глаз на 0,6 дня ($p < 0,001$), а также тенденция сокращения сроков отлипания ушной раковины на 0,2 дня ($p > 0,05$), появление волосяного покрова на 0,1 день ($p > 0,05$) и прорезывания резцов на 0,3 дня ($p > 0,05$) (Таблица 7.15). Половое физическое развитие крыс-самцов в опытной группе характеризовалось более ранним опущением семенников в мошонку на 0,3 дня ($p < 0,05$), при этом у крыс-самок отмечена тенденция запаздывания открытия вагины на 0,9 дня ($p > 0,05$), чем у крысят в контрольной группе.

Таблица 7.15 – Влияние АФС РУ-1205 на физическое развитие крысят в постнатальный период развития (крысам матерям препарат вводили внутривентрикулярно с 6-го дня беременности по день родов), $M \pm m$, дни

№ п/п	Исследуемые параметры	Контроль, вода очищенная	АФС РУ-1205, 500 мг/кг
1	Отлипание ушной раковины	$2,8 \pm 0,09$	$2,6 \pm 0,07$
2	Появление волосяного покрова	$4,4 \pm 0,06$	$4,3 \pm 0,06$
3	Прорезывание резцов	$8,0 \pm 0,11$	$7,7 \pm 0,11$
4	Открытие глаз	$15,8 \pm 0,05$	$15,2 \pm 0,08^{###}$
5	Опущение семенников	$26,0 \pm 0,10$	$25,7 \pm 0,09^{\#}$
6	Открытие вагины	$47,0 \pm 0,56$	$47,9 \pm 0,61$

[#] – результаты статистически значимы относительно группы контроля при $p < 0,05$; ^{###} – результаты статистически значимы относительно группы контроля при $p < 0,001$.

Сенсорно-двигательные рефлексy являются критерием развития ЦНС. В данной серии экспериментов оценивали скорость их формирования у крысят из опытной и контрольной групп (Таблица 7.16). В ходе анализа полученных результатов у крысят из опытной группы отмечено в большей степени ускорение формирования рефлекса «переворачивания на плоскости», чем у животных из контрольной группы. Это опережение составляло 0,3 дня и было статистически значимо ($p < 0,001$). Аналогично крысята из опытной группы опережали ровесников из группы контроля по скорости формирования рефлекса «отрицательного геотаксиса» на 0,4 дня ($p < 0,001$) и рефлекса «переворачивания в свободном падении» на 1,2 дня ($p < 0,001$).

Помимо этого, у животных в опытной группе наблюдали тенденцию более раннего формирования рефлекса «избегание обрыва» на 0,2 дня ($p > 0,05$) и «зрачковый рефлекс» на

0,1 дня ($p > 0,05$) по сравнению с контрольной группой. При изучении параметра мышечной силы не было найдено значимых различий между исследуемыми группами.

Таблица 7.16 – Влияние АФС РУ-1205 на скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов (дни) крысят в постнатальный период развития (матерям препарат вводили внутривентрикулярно, с 6-го дня беременности по день родов), $M \pm m$, дни

№ п/п	Исследуемые параметры	Контроль, вода очищенная	АФС РУ-1205, 500 мг/кг
1	Переворачивание на плоскости	$3,6 \pm 0,06$	$3,3 \pm 0,06^{###}$
2	Отрицательный геотаксис	$6,4 \pm 0,06$	$6,0 \pm 0,08^{###}$
3	Избегание обрыва	$6,9 \pm 0,04$	$6,7 \pm 0,06$
4	Зрачковый рефлекс	$16,1 \pm 0,08$	$16,0 \pm 0,06$
5	Избегание обрыва, вызванное визуальным стимулом	$16,3 \pm 0,09$	$16,4 \pm 0,10$
6	Мышечная сила	$18,4 \pm 0,13$	$18,4 \pm 0,06$
7	Переворачивание в свободном падении	$19,2 \pm 0,14$	$18,0 \pm 0,16^{###}$

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при $^{###} - p < 0,001$.

Таким образом, исходя из полученных результатов исследования, можно судить о более раннем формировании некоторых сенсорно-двигательных рефлексов у потомства крыс от матерей, получавших соединение РУ-1205 в виде АФС с 6-го дня беременности по день родов в дозе 500 мг/кг.

Поведение и мнестические функции

Результаты изучения поведенческой активности у 20-дневных крысят в тесте «открытое поле» представлены в таблице 7.17. В опытной группе крысят относительно группы контроля достоверных различий в параметрах локомоторной и эмоциональной активности не обнаружено. Отмечается лишь тенденция снижения горизонтальной на 8 % ($p > 0,05$) и вертикальной на 16,7 % ($p > 0,05$) двигательной активности относительно группы контроля.

Таблица 7.17 – Влияние АФС РУ-1205 на двигательную активность 20-дневных крысят в тесте «открытое поле» (крысам матерям препарат вводили внутрижелудочно, с 6-го дня беременности по день родов), $M \pm m$

№ п/п	Исследуемые параметры	Контроль, вода очищенная	АФС РУ-1205, 500 мг/кг
1	Горизонтальная двигательная активность	$24,6 \pm 0,76$	$22,6 \pm 0,85$
2	Вертикальная двигательная активность	$4,2 \pm 0,31$	$3,5 \pm 0,39$
3	Эмоциональная активность	$0,8 \pm 0,12$	$0,8 \pm 0,11$

Примечание: горизонтальная двигательная активность – количество пересеченных квадратов; вертикальная двигательная активность – количество вставаний на задние лапы; исследовательская активность – количество заглядываний в напольные отверстия; эмоциональная активность – количество актов дефекаций.

В исследованиях, проведённых на крысятах 45-дневного возраста, у животных опытной группы не отмечено негативного воздействия АФС РУ-1205 на эмоционально-двигательное поведение (Таблица 7.18). Наблюдается лишь тенденция сокращения у самцов опытной группы горизонтальной и вертикальной двигательной активности при одновременном увеличении исследовательской (21,3 %, $p > 0,05$) и эмоциональной (57 %, $p > 0,05$) активности. В опытной группе животных относительно группы контроля число актов груминга у самцов снижалось на 82,3% ($p < 0,05$) и на 66,6 % ($p > 0,05$) у самок. Отмечены небольшие половые различия в виде тенденции у самок к увеличению горизонтальной двигательной активности (8 %, $p > 0,05$) при одновременном снижении вертикальной двигательной активности (12 %, $p > 0,05$) и практически неизменных параметрах исследовательской и эмоциональной активности по сравнению с группой контроля.

При изучении способности 2-месячных крысят к обучению и памяти в тесте УРПИ у крысят опытной группы в сравнении с группой контроля при обучении и воспроизведении полученного навыка достоверных различий не обнаружено (Таблица 7.19). Отмечались лишь небольшие половые различия в обучении и воспроизведении полученного навыка. Так, у крыс-самцов опытной группы при обучении наблюдалась тенденция к уменьшению латентного периода по сравнению с группой контроля на 19,5 % ($p > 0,05$) и увеличению порога чувствительности и вокализации на 11 % ($p > 0,05$). При воспроизведении полученного навыка у этих самцов латентный период сокращался на 5 % ($p > 0,05$), продолжительность нахождения в камере увеличивалась на 65 % ($p > 0,05$), а количество заходов сокращалось на 20 % ($p > 0,05$). Тогда как у самок подобных изменений к обучению и памяти не обнаружено.

Таблица 7.18 – Влияние АФС РУ-1205 на эмоционально-двигательное поведение 45-дневных крысят в тесте «открытое поле» (матерям крысят препарат вводили внутрижелудочно, с 6-го дня беременности по день родов), $M \pm m$

№ п/п	Исследуемые параметры	Контроль, вода очищенная	АФС РУ-1205, 500 мг/кг
Самцы			
1	Горизонтальная двигательная активность	$35,1 \pm 0,70$	$34,1 \pm 0,79$
2	Вертикальная двигательная активность	$13,3 \pm 0,46$	$12,5 \pm 0,73$
3	Исследовательская активность	$4,7 \pm 0,32$	$5,7 \pm 0,52$
4	Груминг	$1,7 \pm 0,45$	$0,3 \pm 0,16^{\#}$
5	Эмоциональная активность	$0,7 \pm 0,45$	$1,1 \pm 0,49$
Самки			
1	Горизонтальная двигательная активность	$36,9 \pm 0,96$	$39,9 \pm 0,69$
2	Вертикальная двигательная активность	$13,4 \pm 0,92$	$11,8 \pm 0,86$
3	Исследовательская активность	$4,4 \pm 0,35$	$4,3 \pm 0,30$
4	Груминг	$1,2 \pm 0,47$	$0,4 \pm 0,27$
5	Эмоциональная активность	$0,7 \pm 0,46$	$0,7 \pm 0,34$

Примечание: изменения статистически значимы относительно группы контроля при $\# - p < 0,05$; горизонтальная двигательная активность – количество пересеченных квадратов; вертикальная двигательная активность – количество вставаний на задние лапы; исследовательская активность – количество заглядываний в напольные отверстия; эмоциональная активность – количество актов дефекаций.

Таблица 7.19 – Влияние АФС РУ-1205 на процессы обучаемости (тест УРПИ) крысят (матерям которых препарат вводили внутрижелудочно, с 6-го дня беременности по день родов), $M \pm m$

№ п/п	Исследуемые параметры	Контроль, вода очищенная	АФС РУ-1205, 500 мг/кг
Обучение – самцы			
1	Латентный период, с	$20,5 \pm 3,46$	$16,5 \pm 2,76$
2	Порог чувствительности, мА	$27,0 \pm 1,18$	$29,3 \pm 0,45$
3	Порог вокализации, мА	$30,3 \pm 2,10$	$33,7 \pm 1,42$
Воспроизведение – самцы			
1	Латентный период, с	$167,1 \pm 4,76$	$158,7 \pm 8,00$
2	Время нахождения в камере, с	$12,9 \pm 4,76$	$21,3 \pm 8,00$
3	Количество заходов	$0,5 \pm 0,13$	$0,4 \pm 0,13$

№ п/п	Исследуемые параметры	Контроль, вода очищенная	АФС РУ-1205, 500 мг/кг
Обучение – самки			
1	Латентный период, с	19,3 ± 2,59	20,0 ± 2,91
2	Порог чувствительности, мА	29,0 ± 1,21	28,7 ± 0,77
3	Порог вокализации, мА	32,7 ± 1,82	34,0 ± 1,56
Воспроизведение – самки			
1	Латентный период, с	165,2 ± 6,22	167,0 ± 5,85
2	Время нахождения в камере, с	14,8 ± 6,22	13,0 ± 5,85
3	Количество заходов	0,7 ± 0,21	0,5 ± 0,17

В ходе проведенных исследований было установлено, что соединение РУ-1205 в виде АФС при длительном пероральном введении беременным самкам крыс (с 6-го по 20-й день беременности) в дозе 500 мг/кг не проявляет эмбриотоксических свойств, фиксируемых в постнатальном периоде развития потомства. Об этом свидетельствуют данные прироста массы тела, сроки физического развития и формирования сенсорно-двигательных рефлексов, а также поведенческих и мнестических реакций крысят.

ГЛАВА 8. ВЛИЯНИЕ АФС РУ-1205 НА ГЕНОМ (ДНК-КОМЕТ ТЕСТ)

С 2010 года количество результатов исследований в высокорейтинговых журналах по запросу «генотоксичность» стремительно растет. Так, в 2010 г. было опубликовано 1 500 работ, а в 2022 – уже 2 300 (по результатам архива исследований PubMed).

За последние 30 лет кометный анализ стал широко использоваться для измерения повреждений и восстановления ДНК в клетках и тканях. Знаменательное достижение было достигнуто в 2016 г., когда Организация экономического сотрудничества и развития приняла руководство по кометному анализу для тестирования разрывов цепей ДНК *in vivo* у животных. С этого момента и на протяжении всех этих лет кометный анализ использовался в исследованиях генотоксичности, экологических и профессиональных воздействий, в исследованиях биомониторинга человека и на животных моделях (Møller P., 2018).

Для оценки повреждения генома крыс обоего пола использовали метод щелочного гель-электрофореза отдельных клеток. В группе животных, которым вводили метилметансульфонат (позитивный контроль, 40 мг/кг, внутривнутрибрюшинно), отмечено существенное увеличение количества поврежденной ДНК во всех исследуемых органах/тканях (как по средним значениям % ДНК в хвосте комет, так и по медиане) по сравнению с группой контрольных животных (негативный контроль, вода очищенная) (Таблица 8.1). За исключением почек, индекс повреждения (ИП) в группе позитивного контроля превышает 2,0 во всех микропрепаратах других типов органов и тканей. В почках также наблюдаются явные признаки повреждения под влиянием метилметансульфоната [среднее значение % ДНК в хвостах комет равно $(21,1 \pm 8,8) \%$].

Результаты проведенных исследований влияния мутагена прямого действия на геном крыс обоего пола при однократном внутривнутрибрюшинном введении в дозе 40 мг/кг подтверждают правильность выполнения аналитической части исследования, включая манипуляции, связанные с делением единичных клеток, приготовлением микропрепаратов, проведением электрофореза, а также демонстрируют возможность регистрации повреждений ДНК.

Таблица 8.1 – Параметры распределения % ДНК в хвосте комет в клетках органов/тканей крыс, получавших метилметансульфонат (40 мг/кг, внутривенно)

№ п/п	Орган	\bar{X}^{1*}	Ст. откл. 2*	ИП 3*
1	Печень	18,2	17,1	8,4
2	Почки	21,1	8,8	1,1
3	Костный мозг	14,4	13,5	5,2
4	Кровь	8,6	3,1	2,7
5	Головной мозг	16,5	14,3	8,7

Примечание: 1* – среднее значение, 2* – стандартное отклонение, 3* – индекс повреждения.

Проведенный на предварительном этапе двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) по всем значениям % ДНК в хвостах комет отдельных клеток в исследуемых органах/тканях не выявил различий между результатами, полученными в дубликатах (на двух разных стеклах для тканей одного и того же животного) (Таблицы 8.2, 8.3).

В ходе проведенных исследований было отмечено, что % ДНК в хвостах комет в клетках различных органов и тканей животных, которым вводили АФС РУ-1205 в различных дозах, колебался в пределах от 1,9 до 5,6 %. Аналогичные значения для контрольных групп крыс-самцов и крыс-самок составляли от 1,6 до 4,0 %. Замечено, что высокий % ДНК в хвостах комет был обнаружен только в почках и желудках животных контрольных групп.

Одним из критериев, указывающих на наличие генотоксических свойств соединения РУ-1205 в виде активной фармацевтической субстанции, могло являться статистически значимое, дозозависимое увеличение показателя поврежденности ДНК, а также статистически значимый и повторяемый эффект, по крайней мере, для одной дозы изучаемого соединения.

Таблица 8.2 – Параметры распределения % ДНК в хвостах комет в клетках органов/тканей крыс-самцов, получавших АФС РУ-1205

Экспериментальная группа	\bar{X}^{1*}	Ст. отклон. 2*	Процентили					ИП 3*
			5	25	Медиана	75	95	
Печень								
<i>НК</i>	1,94	0,17	1,76	1,77	2,03	2,06	2,10	
АФС РУ-1205, 5 мг/кг	1,84	0,38	1,52	1,63	1,74	1,90	2,39	0,95
АФС РУ-1205, 50 мг/кг	1,82	0,39	1,34	1,54	1,89	2,14	2,22	0,94
АФС РУ-1205, 500 мг/кг	1,92	0,30	1,61	1,78	1,89	1,96	2,34	0,99
Различия по стеклам(σ) [#] = 0,59								

Экспериментальная группа	\bar{X}^{1*}	Ст. отклон. ^{2*}	Процентили					ИП ^{3*}
			5	25	Медиана	75	95	
Почки								
НК	5,64	1,90	3,75	4,57	5,51	6,60	7,72	
АФС РУ-1205, 5 мг/кг	10,47	4,19	6,11	7,57	11,05	13,99	14,03	1,86
АФС РУ-1205, 50 мг/кг	5,50	1,68	3,64	3,89	6,22	6,52	7,17	0,97
АФС РУ-1205, 500 мг/кг	12,96	10,34	5,12	5,49	7,52	21,82	26,24	2,30
Различия по стеклам (σ) [#] = 0,78								
Головной мозг								
НК	1,93	0,21	1,73	1,77	1,87	2,06	2,21	
АФС РУ-1205, 5 мг/кг	2,02	0,22	1,71	2,05	2,13	2,13	2,15	1,05
АФС РУ-1205, 50 мг/кг	1,82	0,28	1,49	1,67	1,80	2,08	2,10	0,94
АФС РУ-1205, 500 мг/кг	1,88	0,30	1,58	1,73	1,78	2,08	2,28	0,98
Различия по стеклам (σ) [#] = 0,06								
Костный мозг								
НК	2,77	0,42	2,22	2,48	2,90	3,07	3,16	
АФС РУ-1205, 5 мг/кг	2,73	0,73	1,85	2,56	2,67	3,15	3,53	0,99
АФС РУ-1205, 50 мг/кг	2,51	0,66	1,90	2,07	2,46	2,62	3,37	0,91
АФС РУ-1205, 500 мг/кг	2,83	0,84	1,78	2,47	2,77	3,36	3,82	1,02
Различия по стеклам (σ) [#] = 0,79								
Кровь								
НК	2,24	0,22	1,94	2,21	2,31	2,38	2,40	
АФС РУ-1205, 5 мг/кг	1,88	0,37	1,48	1,56	1,88	2,15	2,33	0,84
АФС РУ-1205, 50 мг/кг	2,25	0,69	1,48	1,76	2,22	2,59	3,15	1,00
АФС РУ-1205, 500 мг/кг	1,85	0,54	1,14	1,45	2,11	2,22	2,30	0,83
Различия по стеклам (σ) [#] = 0,31								
Желудок								
НК	12,03	5,57	5,83	10,07	10,49	15,52	18,54	
АФС РУ-1205, 5 мг/кг	11,73	8,96	4,78	6,19	6,75	18,57	23,65	0,98
АФС РУ-1205, 50 мг/кг	9,47	3,09	6,35	7,42	9,04	10,53	13,78	0,79
АФС РУ-1205, 500 мг/кг	12,14	3,34	7,95	9,98	12,45	14,32	16,00	1,01
Различия по стеклам (σ) [#] = 4,75								

Примечание: НК – негативный контроль, вода очищенная; * – $p < 0,05$ по критерию Бонферрони – Данна [сравнение с негативным контролем (физ. р-р)]; 1* – среднее значение; 2* – стандартное отклонение; 3* – индекс повреждения; # – по результатам двухфакторного дисперсионного анализа.

Таблица 8.3 – Параметры распределения % ДНК в хвостах комет в клетках органов/тканей крыс-самок, получавших АФС РУ-1205

Экспериментальная группа	\bar{X}^{1*}	Ст. отклон. ^{2*}	Процентили					ИП ^{3*}
			5	25	Медиана	75	95	
Печень								
<i>НК</i>	1,57	0,53	1,06	1,29	1,44	1,75	2,31	
АФС РУ-1205, 5 мг/кг	3,05	2,51	1,89	1,92	2,03	2,23	6,69	1,94
АФС РУ-1205, 50 мг/кг	1,89	0,27	1,54	1,74	2,00	2,06	2,13	1,2
АФС РУ-1205, 500 мг/кг	2,20	0,50	1,64	1,79	2,23	2,64	2,72	1,4
Различия по стеклам(σ) [#] = 2,03								
Почки								
<i>НК</i>	14,09	4,06	9,83	10,97	13,46	17,83	18,71	
АФС РУ-1205, 5 мг/кг	15,51	9,00	4,45	12,00	15,29	22,40	24,76	1,10
АФС РУ-1205, 50 мг/кг	18,35	6,27	11,56	13,84	18,32	20,80	26,64	1,30
АФС РУ-1205, 500 мг/кг	24,06	8,33	15,45	16,77	25,69	27,46	33,81	1,71
Различия по стеклам (σ) [#] = 3,17								
Головной мозг								
<i>НК</i>	1,76	0,40	1,28	1,52	1,83	2,01	2,19	
АФС РУ-1205, 5 мг/кг	1,72	0,30	1,33	1,57	1,74	1,95	2,04	0,97
АФС РУ-1205, 50 мг/кг	1,85	0,23	1,59	1,74	1,87	1,90	2,12	1,05
АФС РУ-1205, 500 мг/кг	2,22	0,34	1,83	1,97	2,31	2,33	2,61	1,26
Различия по стеклам (σ) [#] = 0,37								
Костный мозг								
<i>НК</i>	3,01	1,00	2,07	2,42	2,94	3,09	4,32	
АФС РУ-1205, 5 мг/кг	2,87	2,87	2,87	2,87	2,87	2,87	2,87	0,95
АФС РУ-1205, 50 мг/кг	2,86	0,93	1,98	2,20	2,56	3,40	4,03	0,95
АФС РУ-1205, 500 мг/кг	3,43	1,45	2,46	2,72	2,90	3,13	5,41	1,14
Различия по стеклам (σ) [#] = 1,56								
Кровь								
<i>НК</i>	1,98	0,16	1,81	1,88	1,95	2,09	2,20	
АФС РУ-1205, 5 мг/кг	2,20	0,72	1,59	1,87	1,89	2,33	3,18	1,11
АФС РУ-1205, 50 мг/кг	2,12	0,23	1,88	1,95	2,13	2,17	2,42	1,07
АФС РУ-1205, 500 мг/кг	2,45	0,46	1,98	2,27	2,37	2,53	3,03	1,23
Различия по стеклам (σ) [#] = 0,48								

Экспериментальная группа	\bar{X}^{1*}	Ст. отклон. ^{2*}	Процентили					ИП ³
			5	25	Медиана	75	95	
Желудок								
НК	16,98	10,61	6,68	10,87	16,53	18,21	30,66	
АФС РУ-1205, 5 мг/кг	19,39	7,40	10,53	14,65	20,21	25,80	26,68	1,14
АФС РУ-1205, 50 мг/кг	14,48	11,95	5,93	8,18	9,28	14,57	30,92	0,85
АФС РУ-1205, 500 мг/кг	19,49	12,74	8,76	13,14	14,83	21,90	38,32	1,15
Различия по стеклам (σ) [#] = 1,51								

Примечание: НК – негативный контроль, вода очищенная; * – $p < 0,05$ по критерию Бонферрони – Данна [сравнение с негативным контролем (физ. p-p)]; 1* – среднее значение; 2* – стандартное отклонение; 3* – индекс повреждения; # – по результатам двухфакторного дисперсионного анализа.

При анализе данных, полученных в результате серии экспериментов, было установлено, что АФС соединения РУ-1205 при пероральном введении крысам (в дозах 5, 50 и 500 мг/кг) не увеличивала % ДНК в хвостах комет в тесте щелочного гель-электрофореза отдельных клеток. Достоверных различий с группой негативного контроля по данному показателю не выявлено ни в одной из опытных групп. Индекс повреждения генома не превышал 2 у. е., что также свидетельствует об отсутствии генотоксических свойств.

ГЛАВА 9. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хронический болевой синдром снижает качество жизни пациентов. Для его терапии используется подход, где при средней выраженности боли назначение сильнодействующих опиоидных препаратов рекомендуют начинать с их комбинации с адъювантными или противовоспалительными лекарственными средствами для снижения дозы и побочных эффектов наркотических анальгетиков. (Crush J., Levy N., 2022). Однако длительный прием опиоидов, являющихся агонистами одновременно μ -, δ -, и κ -рецепторов, (MOP, DOP, KOP) всё же сопровождается побочными эффектами, такими как: развитие пристрастия и тахифилаксии, угнетение дыхательного центра, снижение активности перистальтики кишечника (Crush J., Levy N., 2022). В США в среднем 115 человек умирают каждый день от передозировки опиоидов (Брюн Е.А., Агибалова Т.В., 2019; CDC Clinical Practice Guideline for Prescribing Opioids for Pain, 2022).

Агонисты каппа-опиоидных рецепторов (КОА) могут стать полноценной заменой для широко используемых неселективных агонистов ОР (морфина, тримеперидина); КОА проявляют выраженные анальгетические свойства и сниженный профиль побочных эффектов (Таблица 9.1).

Таблица 9.1 – Сравнение обезболивающей эффективности агонистов μ - и κ -опиоидных рецепторов (Kaski S.W., White A.N., 2021)

№ п/п	Тип/уровень боли	Эффект агонизма MOP	Эффект агонизма KOP	Относительная эффективность
1	Спинальный	Анальгезия	Анальгезия	MOP \approx KOP
2	Супраспинальный	Анальгезия; эйфория	Анальгезия; дисфория	MOP \gg KOP
3	Воспалительный	Анальгезия	Анальгезия	MOP \approx KOP
4	Висцеральный	Анальгезия	Анальгезия	MOP < KOP
5	Соматический	Анальгезия	Анальгезия	MOP > KOP
6	Нейропатический	Может ухудшиться	смешанный	–

Примечание: KOP – κ -опиоидный рецептор; MOP – μ -опиоидные рецепторы.

На территории РФ применяется единственный анальгетик – буторфанол тартрат (буторфанол) – агонист KOP. Тем временем, на данный момент ведется активное изучение фармакологических свойств порядка 30 новых агонистов KOP (Dalefield M.L., Scouller B., 2022).

Каппа-опиоидные агонисты так же эффективны, как и МОА, при лечении острой и хронической боли (Santino F., Gentilucci L., 2023). Как указывалось ранее, КОА были хорошо описаны как перспективные не вызывающие привыкания альтернативы для лечения боли. Кроме того, МОР и ДОР вызывают эйфорию, угнетение дыхания и физическую зависимость. Напротив, опиоиды, нацеленные на центральные КОР, практически не вызывают угнетения дыхания и вызывают дисфорические эффекты, а не эйфорию, что снижает их потенциал зависимости, не ослабляют подвижность кишечника и не способствуют запорам, поэтому КОА обладают преимуществами по сравнению с МОА и изучаются в качестве альтернативного терапевтического средства для лечения боли. Ранее выявленная активность КОА включает антиноцицептивное, сердечно-сосудистое, противозудное, противоотечное, мочегонное, противовоспалительное и противокашлевое действие. Кроме того, КОА были эффективны при коррекции патологического состояния на моделях инсульта, спинальной анестезии, гипоксической легочной гипертензии, рассеянного склероза, зависимости и посттравматической регенерации хряща (Santino F., Gentilucci L., 2023).

Также на данный момент известно о шести клинических исследованиях азимадолина (асимадолина) – высокоселективного κ -агониста для лечения болезненного зуда, связанного с атопическим дерматитом (Vakharia P.P., Silverberg J.I., 2018; Graven-Nielsen C.S., Knoph C.S., 2023), а также послеоперационной кишечной непроходимости и синдрома раздраженного кишечника (Li X., Li B., Zhang J., 2021).

Конденсированные бензимидазолы, являющиеся производными циклических азотсодержащих гетеросистем, рассматриваются в качестве перспективных высокоселективных агонистов КОР (Alamgir M. et al., 2007, Di Trana A., 2023). В ходе научно-исследовательской работы в НИИ «Научно-исследовательский институт физической и органической химии Южного федерального университета» (г. Ростов-на-Дону) осуществлен направленный синтез различных классов соединений бензимидазола. На базе ВолгГМУ был проведен скрининг данных соединений на наличие у них агонизма в отношении КОР на модели активации тромбоцитов (детекция методом малоуглового светорассеяния) (Гречко О.Ю., Черников М.В., 2007). По результатам исследований определены соединения-лидеры (для них рассчитаны показатели EC_{50} , LD_{50}), а также с применением различных подходов *in silico* установлены соединения с ключевыми фармакоформными элементами, взаимодействующими с сайтом связывания КОР (Гречко О.Ю., Васильев П.М., Черников М.В. и др., 2007; Васильев П.М., Кругликов М.Е., Кочетков А.Н., 2011). Представленные соединения относятся к числу N9-замещенных имидазо[1,2-а]бензимидазола (Гречко О.Ю., Спасов А.А., Анисимова В.А. и др., 2016).

В ходе ранее проведенных исследований было определено несколько активных соединений, среди которых два соединения-лидера под лабораторными шифрами РУ-1203 и РУ-1205 представлялись перспективными для расширенных доклинических испытаний.

Так, соединение РУ-1203 представляет собой 2-(4-фторфенил)-9-пирролидиноэтил имидазо[1,2-а]бензимидазол. В экспериментах *in vitro* для данного соединения показано наличие высокоселективного агонизма в отношении КОР, при этом по силе обезболивающего действия оно превосходит препараты сравнения буторфанол тартрат и U50,488 (Гречко О.Ю., Елисеева Н.В., 2012). Соединение РУ-1203 в виде фармацевтической субстанции проявляет дозозависимые налоксонообратимые антиноцицептивные свойства в различных моделях альгезии (Спасов А.А., Гречко О.Ю., 2010). В экспериментах, проведенных на изолированных препаратах семявыносящего протока кролика (Гречко О.Ю., Спасов А.А., Штарева Д. М. и др. 2014), для изучаемого соединения была подтверждена селективность в отношении КОР.

Соединение РУ-1203, в отличие от буторфанол, не вызывает респираторную депрессию даже при 100-кратном увеличении экспериментально установленной анальгетической дозы. Кроме того, при остром и хроническом введении изучаемого соединения у экспериментальных животных не отмечалось признаков наркотической зависимости и абстинентного синдрома. В дозе 10-кратно превышающей максимально эффективную анальгетическую в тестах условной реакции избегания места, «вынужденного плавания», «открытого поля» (Grechko O., Eliseeva N., 2011), «удержания на вращающемся стержне», агонист КОР не проявляет значимого седативного действия, нарушений двигательной активности и аверсивных расстройств (Гречко О.Ю., Елисеева Н.В., 2012).

В рамках парадигмы «наказуемое взятие воды» Вогеля при введении фармацевтической субстанции соединения РУ-1203 (в диапазоне доз 0,01–1 мг/кг, внутривнутрибрюшинно), отмечено дозозависимое налоксонообратимое увеличение числа «наказуемых» взятий воды. Также было выявлено, что изучаемое соединение достоверно увеличивает количество выходов животных в центр «открытого поля» и длительность пребывания грызунов в открытых рукавах «крестообразного лабиринта». Анксиолитическая эффективность РУ-1203 сравнима с эффектом диазепам, в то время как при введении буторфанол не отмечалось влияния на уровень тревожности животных (Гречко О.Ю., 2012).

Противосудорожное действие фармацевтической субстанции соединения РУ-1203 оценивалось в тестах МЭШ (максимальный электрошок) и судорог, индуцированных введением коразола (Спасов А.А., Калитин К.Ю., 2015). У изучаемого соединения отмечены выраженные противосудорожные эффекты, которые нивелировались предварительным введением антагониста ОР – налоксона.

Второе соединение – с каппа-агонистической активностью под лабораторным шифром РУ-1205 синтезировано в НИИ «Научно-исследовательский институт физической и органической химии Южного федерального университета» и представляет собой дигидрохлорид 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-а]-бензимидазол (патент РФ № 2 413 512 С1 от 29.07.2009 г.).

Учитывая сопоставимую обезболивающую активность соединений РУ-1203 и РУ-1205 и в связи с более благоприятным химико-технологическим синтезом соединения РУ-1205 (Анисимова В.А., Спасов А.А., Толпыгин И.Е. и др. 2010), данное вещество было выбрано для дальнейшего исследования.

При оценке влияния соединения РУ-1205 на выраженность соматогенной и нейрогенной боли полученные результаты сопоставимы с показателями препарата сравнения – буторфанол тартрата или превосходят его. В тесте «горячая пластина» соединение РУ-1205 по анальгетической активности и широте терапевтического действия превосходило препарат сравнения буторфанол в 3,3 и 5,3 раза соответственно (Spasov A.A., Grechko O.Yu., 2018).

На модели электрического раздражения корня хвоста изучаемое соединение в тестах «вокализация», «продолжительная вокализация» в среднем превосходило эффекты препарата сравнения в 5 раз. На модели «отдергивание хвоста» ED_{50} изучаемого соединения практически не отличалась от ED_{50} буторфанол тартрата (Spasov A.A., Grechko O.Yu., 2018).

Выраженность формалиновой гипералгезии под влиянием соединения РУ-1205 дозозависимо снижалась в двух фазах аналогично препарату сравнения (Гречко О.Ю., Елисеева Н.В., Спасов А.А. и др., 2016). Схожие результаты получены на модели механического раздражения воспаленной конечности (на фоне формалиновой гипералгезии, Randall-Selitto test) (Гречко О.Ю., Елисеева Н.В., Спасов А.А. и др., 2016).

Соединение РУ-1205 дозозависимо снижало количество специфических ноцицептивных ответов на химическое раздражение брюшины в тесте «уксусных корчей» относительно контрольной группы так же, как и препарат сравнения (Spasov A.A., Grechko O.Yu., 2018).

Изучаемое соединение статистически значимо увеличивало значение 50%-го порога болевой реакции тактильной аллодинии относительно группы контроля (Randall-Selitto test), при этом уступая препарату сравнения буторфанолу (Spasov A.A., Grechko O.Yu., 2018).

При анализе структуры соединения РУ-1205 *in silico* (2D, 3D) отмечена его выраженная гомологичность с селективным каппа-агонистом U-50,488, а также подтверждена высокая аффинность с сайтом связывания КОР (Васильев П.М., Калитин К.Ю., Спасов А.А. и др., 2016).

В тестах на семьявносящем протоке кролика соединение РУ-1205 ингибировало электростимуляцию в наномолярных концентрациях и превосходило препарат сравнения – буторфанол (Гречко О.Ю., Спасов А.А., Штарева Д. М. и др. 2014). Так, полуингибирующая

концентрация (IC_{50}) для соединения РУ-1205 составила $2,2 \times 10^{-9}$ М, для высокоселективного каппа-опиоидного агониста U-50,488 – $7,0 \times 10^{-9}$ М, для препарата сравнения буторфанола тартрата – $9,8 \times 10^{-5}$ М. При этом эффекты соединения РУ-1205 блокировались предварительным внесением в кювету антагониста КОР – норбиналторфимина. В то же время в тестах на подвздошной кишке крысы изучаемое соединение не проявило активности.

Исходя из результатов теста «горячая пластина», можно судить о влиянии соединения РУ-1205 в виде фармацевтической субстанции на КОР в условиях целостного организма. Так, после предварительного внутрибрюшинного введения норбиналторфимина отмечено снижение анальгетической активности изучаемого соединения в шесть раз в экспериментах на мышах (Spasov A.A., Grechko O.Yu., 2018).

Для соединения РУ-1205 составляли расширенный нейромедиаторный профиль. Не установлено влияние изучаемого соединения на звенья холинергической, адренергической и серотонинергической систем (Spasov A.A., Grechko O.Yu., 2017; Litvinov R.A., Eliseeva N.V., 2017; Литвинов Р.А., Елисеева Н.В., 2018). Под действием соединения РУ-1205 отмечалось снижение дофаминергической передачи (снижение фенаминовой гиперактивности). При этом наблюдалось взаимодействие с компонентами ГАМК- A -рецепторного комплекса (снижение тремора в тестах с пикротоксином и бикикуллином). Помимо анальгетической активности для соединения РУ-1205 показаны противосудорожные свойства в тестах максимального электрошока и коразоловых судорог (Спасов А.А., Калитин К.Ю., 2015), а также антиэпилептиформная активность, подтвержденная электрофизиологическими тестами (снижение фоновой фокальной активности отдельных кортикальных нейронных колонок) (Калитин К.Ю., Спасов А.А., Гречко О.Ю., 2017).

При оценке толерантности к антиноцицептивному действию в группе животных, получавших курсом в течение 5 дней соединение РУ-1205, проявлений синдрома отмены после провокации налоксоном не наблюдалось (характерные для классических опиатов признаки – птоз, прыжки, тремор, потеря веса) (Гречко О.Ю., Штарева Д.М., 2016; Гречко О.Ю., Спасов А.А., 2017).

В ходе исследования фармакокинетики и метаболизма соединения установлено, что в органах элиминации – печени и почках отмечается значительное содержание изучаемого вещества. В головном мозге при подкожном введении содержание соединения РУ-1205 определяется до 4-го часа в невысоких концентрациях. В биотрансформации изучаемого вещества, вероятно, участвует изоформа СYP3A1 цитохрома, во второй фазе метаболизма образование конъюгатов не происходит (Spasov A.A., Smirnova L.A., 2021, Спасов А.А., Смирнова Л.А. и др. 2021).

Вышеописанные эксперименты по углубленному изучению фармакологических свойств соединения РУ-1205 выполнены по госконтракту с Минпромторгом РФ 11411.1008700.13.090 (ФЦП «Доклинические исследования лекарственного средства с каппа-опиоидной агонистической активностью на основе производного имидазобензимидазола», шифр «2.1 Имидазобензимидазол»).

Для изучаемого соединения в НИИ фармакологии РАМН им В.В. Закусова (г. Москва) была создана твердая лекарственная форма (таблетки для внутрижелудочного введения, гранулят таблеток) (патент РФ № 2 413 512 С1 от 29.07.2009 г.). В составе 1 таблетки, покрытой оболочкой, соединение РУ-1205 – дигидрохлорид 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-а]-бензимидазол (НИИ ФОХ ЮФУ, Россия) – 10 мг, а также вспомогательные вещества: лактоза (USP), лудипресс (Eur. Ph), магния стеарат (ТУ 6-09-16-1553-90), оболочка опадрай (Opadry 200 f280000) (USP) до 0,210 г. Гранулят таблеток получен методом сухого гранулирования.

В данном исследовании были изучены фармакологические свойства соединения РУ-1205 в форме активной фармацевтической субстанции (АФС) и гранулята таблеток (ГТ). Определена анальгетическая активность на различных моделях соматогенной боли. Установлено взаимодействие АФС РУ-1205 с адьювантными препаратами, такими как: клонидин, галоперидол, метоклопрамид, диазепам, мидазолам, атропин, габапентин, amitриптилин и карбамазепин. Оценен аверсивный потенциал АФС РУ-1205 (в частности, влияние на сигнальный каскад p38 MAPK киназы). Изучение общетоксических свойств соединения включало в себя исследование параметров острой (на мышах и крысах) и хронической токсичности (на крысах и кроликах). В рамках изучения параметров специфической токсичности было оценено влияние изучаемого соединения на процессы репродукции (на генеративную функцию крыс, а также эмбрио- и фетотоксическое действие изучаемого соединения, регистрируемое в антенатальном и постнатальном периодах развития) и на геном крыс методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток (тест ДНК-комет).

Для соединения РУ-1205 в виде АФС и в форме ГТ показана выраженная **обезболивающая активность** в различных тестах.

На модели соматогенной боли «отдергивания хвоста от теплового излучения» (tail flick test) зафиксированные анальгетические эффекты изучаемого соединения по силе равны морфину (Рисунок 9.1). После однократного введения АФС РУ-1205 и морфина мышам-самцам латентный период (ЛП) отдергивания хвоста увеличился с течением времени и достигал максимума к 90-й минуте после инъекции. Относительно показателей контрольной группы отмечено увеличение ЛП на 43,8 % ($p < 0,05$) у животных из группы, получавших агонист КОР, и на 45,5 % в группе препарата сравнения ($p < 0,05$).

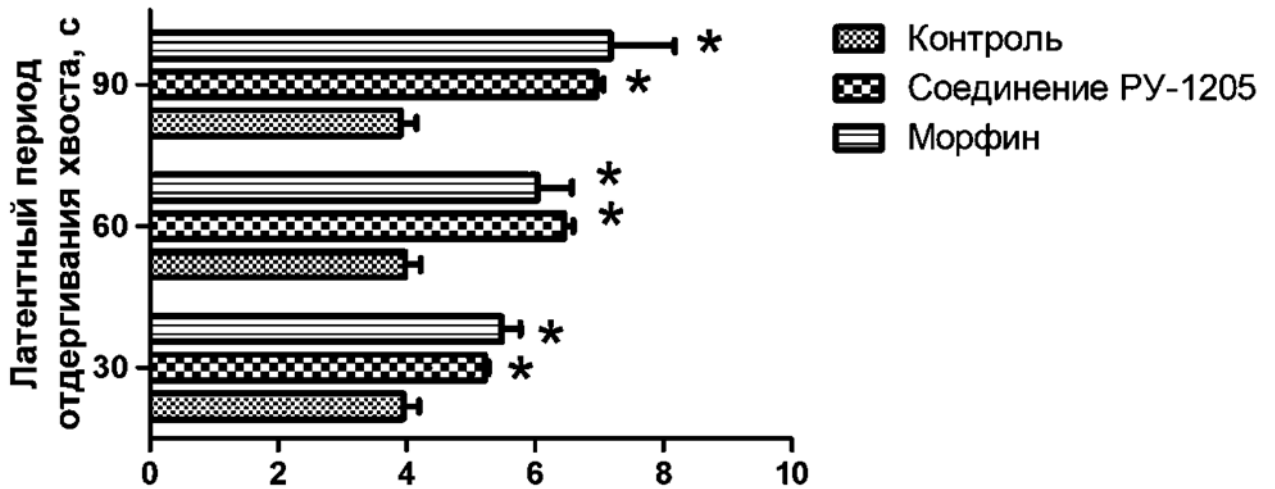


Рисунок 9.1. Влияния АФС РУ-1205 (5 мг/кг) и морфина гидрохлорида (1 мг/кг) при внутривенном введении мышам-самцам на величину латентного периода отдергивания хвоста от теплового излучения (tail flick test). Условные обозначения: * – статистически значимые отличия от группы контроля, 2way ANOVA, посттест Бонферрони, $p < 0,05$

При пероральном введении ГТ РУ-1205 мышам-самцам в тесте tail flick продолжительность латентного периода отдергивания хвоста увеличивалась (Рисунок 9.2) относительно как группы контроля (39,2 %, $p < 0,05$), так и группы препарата сравнения тримеперидина (20,2 %, $p < 0,05$). В остальных временных точках анальгетический эффект изучаемых препаратов не отличался.

При сравнительном анализе результатов исследования на модели соматогенной боли в тесте «горячая пластина» антиноцицептивной активности АФС РУ-1205 и буторфанола при введении мышам-самцам отмечены схожие обезболивающие эффекты. Однако эффект снижался в 6,3 раза в группе изучаемого соединения ($p < 0,05$) и 4,1 в группе препарата сравнения раза ($p < 0,05$) при введении налоксона.

Для более детального изучения механизма действия был использован норбиналтофимин (пог-BNI) в качестве селективного каппа-антагониста в дозе 10 мг/кг, а в качестве препарата сравнения – агонист КОР соединение U-50,488 в дозе 5 мг/кг. При предварительном введении пог-BNI у мышей-самцов из группы АФС РУ-1205 обезболивающий эффект блокировался 5,1 раза ($p < 0,05$), в то время как в группе животных, получавших соединение U-50,488, – в 2,6 раза ($p < 0,05$). Полученные данные подтверждают селективность соединения РУ-1205 в отношении КОР.

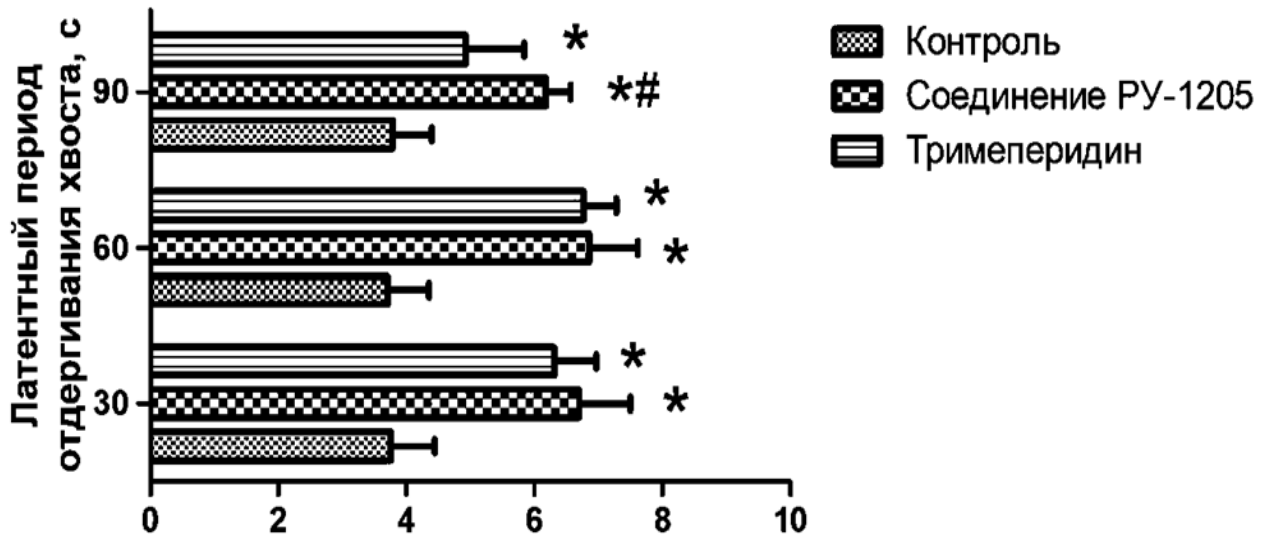


Рисунок 9.2. Влияние ГТ РУ-1205 (5 мг/кг) и тримеперидина (1 мг/кг) при внутрижелудочном введении мышам-самцам на величину латентного периода в тесте «отдергивание хвоста от теплового излучения» (tail flick test). Условные обозначения: * – статистически значимые отличия от группы контроля; # – статистически значимые отличия от группы препарата сравнения тримеперидина, 2way ANOVA, посттест Бонферрони, $p < 0,05$

Согласно трехступенчатой лестнице обезболивания, на второй ступени опиоидные анальгетики *комбинируют, в том числе, с адьювантными препаратами* (Crush J., Levy N., 2022).

По результатам исследований установлено значительное увеличение анальгетической активности соединения РУ-1205 в виде активной фармацевтической субстанции при его комбинировании с клонидином. Также было обнаружено незначительное увеличение обезболивающей активности изучаемого вещества при сочетании с мидазоламом, но при совместном введении АФС РУ-1205 с диазепамом наблюдалось снижение. Галоперидол не оказывал влияния на анальгетический эффект агониста КОР при совместном введении, а метоклопрамид не вызывал однонаправленного обезболивающего действия изучаемого соединения (Таблица 9.2).

Таблица 9.2. Влияния некоторых адьювантных препаратов на анальгетическую активность морфина и АФС РУ-1205 в тесте отдергивания хвоста у мышей-самцов при внутрибрюшинном введении

№п/п	Препарат и/или комбинация	МВЭ, %			Кол-во животных в группе, n
		30 мин	60 мин	90 мин	
1	АФС РУ-1205, 5 мг/кг	↑	↑↑	↑↑↑	6
2	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг	↑↑	↑↑	↑↑	6
3	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + клонидин, 1 мг/кг	V↑	V	V↑	6
4	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + клонидин, 1 мг/кг	V↑↑	V↑↑	V↑↑	6
5	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + галоперидол, 0,45 мг/кг	↑V	V	V↑	6
6	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + галоперидол, 0,45 мг/кг	↑↑	↑↑	↑↑↑	6
7	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + метоклопрамид, 5 мг/кг	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	6
8	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + метоклопрамид, 5 мг/кг	↑↑	↑↑	↑↑	6
9	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + диазепам, 1 мг/кг	0	0	0	6
10	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + диазепам, 1 мг/кг	↑	↑↑	↑↑	6
11	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + мидазолам, 0,3 мг/кг	↑↑	↑↑	↑↑	6
12	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + мидазолам, 0,3 мг/кг	↑↑	↑↑	↑↑	6

Примечание: МВЭ, % – максимально возможный эффект; 0 – МВЭ < 10 %; ↑ – МВЭ = 10 %; ↑↑ – МВЭ = 20 %; ↑↑↑ – МВЭ = 30 %; ↑V – МВЭ = 40 %; V – МВЭ = 50 %; V↑ – МВЭ = 60 %; V↑↑ – МВЭ = 70 %.

Комбинация клонидина с опиоидами может свести к минимуму побочные эффекты каждой из применяемых групп, однако молекулярные механизмы, лежащие в основе этих взаимодействий, не ясны. В зависимости от используемых агонистов анальгетический синергизм может быть опосредован подтипами $\alpha 2$ -адренергических рецепторов (АР) и μ - или δ -опиоидных рецепторов. Данные иммуногистохимических исследований показывают, что ОР коэкспрессируются в той же популяции сенсорных нейронов, что и $\alpha 2$ АР, и что для антиноцицептивной синергии требуется активация кальциевых каналов и протеинкиназы С. Физическая связь между ОР и АР объясняет наблюдаемые синергетические эффекты, так как при коэкспрессии GPCRs образуются гетеромерные комплексы, которые имеют измененные функциональные и лигандсвязывающие свойства. Такие взаимодействия могут происходить

на разных уровнях ЦНС, включая первичные афферентные нейроны, спинной мозг и другие участки, такие как голубое пятно, а также на периферических участках нервной системы.

Галоперидол может ингибировать Ca^{2+} /кальмодулин-зависимую протеинкиназу II (CaMKII α) (Brüggemann I. et al., 2000). Это приводит к снижению толерантности, вызванной неселективными агонистами ОР, и физической зависимости от их длительного приема. Считается, что CaMKII α вызывает десенсibilизацию МОР и КОР в клетках, нейронах ганглиев дорсальных корешков и поверхностных пластинках дорсального рога спинного мозга. Моделирование опиоид-опосредованной анальгезии, предположительно, возникает из-за антагонизма галоперидола в отношении ОР.

При совместном введении галоперидола и АФС РУ-1205 наблюдаемый эффект снижения анальгетической активности, вероятно, связан с особенностями фармакокинетики изучаемых веществ. Известно, что АФС РУ-1205 метаболизируется с помощью СYP3A семейства цитохромов (Ращенко А.И., Спасов А.А., 2014); согласно литературным данным (Ragia G. et al., 2016), галоперидол обезвреживается аналогичным образом. Образующийся в ходе окислительного N-деалкилирования метаболит галоперидола является неактивным, в отличие от предположительно анальгетически активных метаболитов АФС РУ-1205, которые образуются в результате гидроксилирования (Spasov A.A., Smirnova L.A., Grechko O.Yu. et al., 2021).

Хотя одновременный прием наркотических анальгетиков и противорвотных средств не противопоказан, но взаимозависимость опиоидной и дофаминовой систем в ЦНС может повлиять на эффективность проводимой терапии или спровоцировать проявление побочных эффектов. Существуют данные Peter R. Kamerman, Nicole Becker и соавт. (2007) о влиянии метоклопромида на анальгетическую активность морфина, опосредованную не серотонинергическими (возможные эффекты 5-HT₃ рецепторов были нивелированы ондансетроном), а дофаминергическими взаимодействиями.

В рамках настоящего исследования обезболивающей активности АФС РУ-1205 при одновременном введении с бензодиазепинами отмечена разнонаправленность эффектов. Так, при сочетании с мидазоламом установлено незначительное увеличение анальгетической активности изучаемого соединения, а при сочетании с диазепамом наблюдалось её снижение.

В клинической практике случаи снижения опиоидной анальгезии на фоне предварительного введения бензодиазепинов были описаны Робертом Гиром и Кристиной Миасковски в конце 90-х годов (Gear R.W., Miaskowski C., 1997). Исследователи Кумар Неммани и Джеффри Могил из Канады в своей работе отмечают снижение выраженности анальгезии после приема агонистов МОР и КОР на фоне введения диазепама. Предположительно, данный эффект опосредован через серотонинергический путь, в то время

как антагонисты серотониновых рецепторов уменьшают обезболивающий эффект опиоидов через (косвенные) ГАМКергические механизмы в ядре дорсального шва (Nemmani K.V., Mogil J.S., 2002).

Можно предположить, что различия между производными бензодиазепина во влиянии на выраженность опиоидной анальгезии могут быть связаны с особенностями их фармакокинетики (Olkola K.T. et al., 2008). Метаболизм мидазолама протекает с участием ферментов, относящихся к семейству глюкуронозил-трансфераз (UGT, T_{1/2} от 1,7 до 2,6 часа) (Ofoegbu A.B., Ettienne E., 2021). Диазепам обезвреживается в печени при участии системы цитохромов (CYP3A и CYP2C19, T_{1/2} от 20 до 50 часов) (Olkola K.T. et al., 2008; Dean L., 2018). Как упоминалось выше, соединение РУ-1205 метаболизируется с помощью цитохромов CYP3A (Ращенко А.И., Спасов А.А., 2014; Spasov A.A., Smirnova L.A., Grechko O.Yu. et al., 2021).

В ходе проведенных исследований на модели соматогенной боли для АФС РУ-1205 показано уменьшение выраженности анальгетического эффекта в группах, где изучаемое вещество вводили совместно с блокатором Na⁺-каналов – карбамазепином; аналогом ГАМК – габапентином; М-холиноблокатором – атропином; ингибитором обратного захвата моноаминов – амитриптилином (Таблица 9.3).

Карбамазепин при совместном введении с морфином статистически значимо увеличивал МВЭ на 14,9 и 14,4 % через 30 и 60 минут относительно группы опиоида, что согласуется с данными литературы (Naseri K., Sabetkasaei M., 2012). При одновременном применении с каптагонистом карбамазепин значительно уменьшал МВЭ относительно показателей группы, получавшей АФС РУ-1205, до 2,98; 3,07 и 7,98 % в каждой из временных точек.

По предположению Майи Томич и Уроша Печикоzy, обезболивающее действие карбамазепина опосредовано за счет потенциал-зависимых натриевых каналов на пути от восходящих периферических нейронов в ЦНС, но нельзя полностью исключать возможный вклад адренергических и ГАМКергических механизмов. По результатам экспериментов с морфином наблюдался синергизм обезболивающего действия при совместном приеме с карбамазепином (Tomić M., Pecikoza U., Micov A., 2018).

Таблица 9.3 – Влияние адъювантных препаратов на анальгетическую активность морфина и АФС РУ-1205 в тесте отдергивания хвоста у мышей-самцов при внутривенном введении (ослабляющие)

№ п/п	Препарат и/или комбинация	МВЭ, %			Кол-во животных в группе, n
		30 мин	60 мин	90 мин	
1	АФС РУ-1205, 5 мг/кг (среднее)	↑	↑↑	↑↑↑	6
2	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг (среднее)	↑↑	↑↑	↑↑	6
3	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + атропин, 2,7 мг/кг	↑↑	↑↑	↑↑	6
4	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + атропин, 2,7 мг/кг	↑	0	0	6
5	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + габапентин, 90 мг/кг	↑↑↑	↑V	↑↑↑	6
6	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + габапентин, 90 мг/кг	↑	↑↑	↑↑	6
7	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + амитриптилин, 3 мг/кг	0	↑	↑	6
8	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + амитриптилин, 3 мг/кг	↑	↑	↑	6
9	Морфина гидрохлорид, 1 мг/кг + карбамазепин, 15 мг/кг	↑↑↑	↑V	↑↑↑	6
10	Соединение РУ-1205, 5 мг/кг + карбамазепин, 15 мг/кг	0	0	↑	6

Примечание: МВЭ, % – максимально возможный эффект; 0 – МВЭ < 10%; ↑ – МВЭ = 10 %; ↑↑ – МВЭ = 20 %; ↑↑↑ – МВЭ = 30 %; ↑V – МВЭ = 40 %.

Карбамазепин является индуктором системы цитохрома P450 (CYP3A4, CYP2C8, CYP3A5, CYP2B6) (Spina E., Pisani F. 1996), что приводит к уменьшению периода полувыведения веществ, метаболизирующихся при участии данных ферментов. Исследования фармакокинетики подтверждают участие CYP3A4 и CYP2C в метаболизме АФС РУ-1205, в отличие от морфина, который в большей степени биотрансформируется при участии ферментов семейства глюкуронилтрансфераз (UGT2B7) (Ращенко А.И., Спасов А.А., 2014). Можно предположить, что уменьшение выраженности обезболивающего действия агониста КОР при совместном применении с карбамазепином связано со схожими путями биотрансформации.

Установлено, что габапентин при совместном введении с морфином усиливал обезболивающую активность морфина через 30 и 60 мин (МВЭ увеличивался на 10,7 и 13,2 % соответственно); вероятно, за счет сонаправленного одновременного уменьшения возбуждения и увеличения торможения (Kukkar A., Bali A., 2013, Papathanasiou T., Juul R.V., 2016). Однако при одновременном применении АФС РУ-1205 с габапентином не отмечено усиление анальгетического эффекта.

По результатам исследований E.A. Matthews и A.H. Dickenson (2002), в связанных с G-белком MOR и KOR при взаимодействии с морфином происходят конформационные изменения. При этом калиевые каналы открываются, возникает гиперполяризация мембраны клеток, происходит уменьшение открытия потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов. В результате чего наблюдается снижение возбудимости нейронов (Matthews E.A., Dickenson A.H., 2002). Габапентин взаимодействует с $\alpha 2$ - δ -субъединицей Ca^{2+} -каналов и снижает поток ионов кальция. Исходя из результатов настоящего исследования и принимая во внимание вышеописанную гипотезу, вероятно, гиперполяризации мембраны нейронов, опосредованной только через KOR, недостаточно для усиления обезболивающих свойств АФС РУ-1205 при совместном применении с габапентином.

При одновременном введении атропина и морфина отмечалось снижение анальгетического эффекта морфина, начиная с 60-й минуты. Атропин достоверно снижал МВЭ через 90 минут на 11,2 % относительно группы морфина ($p < 0,05$). Установлено, что атропин значительно снижал анальгетический эффект соединения РУ-1205 через 60 и 90 минут при их совместном введении до контрольных значений.

Из данных Duttaroy A. и Gomeza J. известно, что роль спинномозговых мускариновых рецепторов в обезболивании опиоидами подтверждается тем, что интратекальное введение атропина в значительной степени ослабляет действие опиоидов, вводимых внутривенно (Duttaroy A., Gomeza J., 2000). Предполагается, что после этого происходит быстрое образование оксида азота в дорсальном роге спинного мозга, который полностью блокируется атропином (Shao-Rui Chen, Hui-Lin Pan, 2001). Ингибиторы нейрональной синтазы оксида азота 1 при введении непосредственно в спинномозговой канал устраняют обезболивающее действие морфина, вводимого внутривенно, что указывает на то, что оксид азота в спинном мозге необходим для обезболивающего действия системного морфина (то есть морфин \rightarrow M2-, M4-холинергические рецепторы \rightarrow оксид азота \rightarrow анальгезия). При комбинировании атропина и АФС РУ-1205 зафиксировано снижение анальгетической активности агониста KOR.

При комбинировании с морфином, amitriptilin значительно снижал анальгетический эффект опиоида через 30 минут (сопоставимо со значениями группы контроля, $p < 0,05$) (МВЭ =

2,72 %), затем наблюдалось незначительное увеличение ЛП, но ниже значений группы, получавшей только морфин ($p < 0,05$). Амитриптилин при совместном применении с соединением РУ-1205 достоверно снижал МВЭ (%) относительно группы каппа-агониста через 30 минут в 2 раза, а через 60 и 90 минут в 2,7 и 2,3 раза соответственно.

Снижение анальгетических свойств опиоидов при одновременном применении с амитриптилином может быть связано с неоднородностью эффектов от совместного применения морфина и амитриптилина в зависимости от дозы антидепрессанта (Akbari E., Mirzaei E., 2018). А также, несмотря на данные об эффективности совместного введения амитриптилина и опиоидов при нейропатической боли (Jagla G., Mika J., 2014), применение ингибиторов обратного захвата серотонина на моделях соматической боли может быть недостаточно эффективным (Loram L.C., Mitchell D., 2007).

Таким образом, в ходе проведенных исследований установлено, что клонидин и мидазолам усиливали анальгетический эффект АФС РУ-1205 при совместном применении, в то время как диазепам, карбамазепин, атропин и амитриптилин в разной степени снижали показатели обезболивающего эффекта изучаемого соединения.

Полученные данные позволяют более четко сформулировать представления о локализации и механизме действия каппа-агониста опиоидных рецепторов АФС РУ-1205, а также, с помощью выявленных закономерностей, возможно более детально спланировать схемы назначения при совместной терапии болевого синдрома.

Хотя агонисты КОР считаются анальгетиками без наркотического потенциала, их применение может быть связано с развитием серьезных психотропных побочных эффектов, включая дисфорию, ангедонию и галлюцинации. В течение последних лет достижения иммуногистохимии и нейрофармакологии позволили определить предполагаемый молекулярно-биологический механизм *формирования дисфории и аверсии*, индуцируемой каппа-рецепторными агонистами, который состоит в активации митоген-активируемой протеинкиназы – p38MAPK в вентральной тегментальной области (Schattauer SS, Kuhar JR, 2017). По данным литературы, ингибция p38 MAPK-киназы, вызванная селективным ингибитором SB203580, выражено уменьшает проявления дисфории при совместном применении с высокоселективными каппа-агонистами, при этом не оказывает влияния на выраженность анальгезии (Margolis E.B., Karkhanis A.N., 2019). Предполагается, что снижение активности p38MAPK не влияет на формирование анальгезии (Zan G.Y., Wang Q., 2016). На сегодняшний день существуют агонисты КОР, оказывающие выраженное обезболивающее действие, не вызывая при этом дисфории (Ehrich J.M., Messinger D.I., 2015; Gross J.D., Kaski S.W., 2019), которые либо обладают мультитаргетным действием со свойствами селективных каппа-агонистов и ингибиторов p38 MAPK-киназы, либо относятся к функционально

селективным» каппа-рецепторным лигандам. Термин «функциональная селективность», или «предвзятый агонизм», описывает способность лиганда G-белок-связанного рецептора селективно активировать подмножество сигнальных каскадов в конкретном GPCR, в отличие от активации всех нижестоящих сигнальных каскадов (например, G-белков, аррестина и/или киназы) (Schattauer S.S., Kuhar J.R., 2017). Было выдвинуто предположение, что активация р38 МАРК обеспечивается передачей сигналов β -аррестина-2, что позволяет рассматривать терапевтический потенциал лигандов КОР, смещенных на G-белок, в качестве анальгетиков без дисфорических побочных эффектов (Gross J.D., Kaski S.W., 2019).

Принимая во внимание тот факт, что ингибиторы р38 МАРК относятся к производным имидазольных систем (Abraham A.D., Fontaine H.M., 2018), добавление фторфенильного радикала в молекулу способствовало появлению новых агонистов КОР. При этом у них сохранялся антагонизм в отношении р38 МАРК.

Предварительный анализ *in silico* позволяет предположить, что соединение РУ-1205 проявляет как агонистическую активность по отношению к КОР, так и свойства ингибитора р38 МАРК. В результате докинг-анализа получены данные, позволяющие предполагать, что энергия взаимодействия между РУ-1205 и каталитическим доменом р38-МАРК достаточно высока и сходна с энергией взаимодействия референтного препарата SB203580 (Spasov A.A., Zvartau E.E., Grechko O.Iu. et al., 2020).

Фармакологическая активация каппа-опиоидных рецепторов у людей вызывает дисфорию и тревожность, подобные тем, которые могут быть зафиксированы в экспериментах на животных (Faouzi A., Varga B.R., 2020).

Для оценки возможного формирования первичного подкрепления используются тесты «внутривенное самовведение» и «лекарственная дифференцировка». Методика УРИМ в различных модификациях применяется для анализа вторичного подкрепления (Ahsan H.M., de la Peña J.B., 2014). Эти тесты позволяют на доклиническом этапе исследований новых лекарственных средств сформировать представление о наличии у них аддиктивного и аверсивного эффектов.

В ходе настоящего исследования в тесте УРИМ АФС РУ-1205 в сравнении с буторфанолом не провоцировало избегание места (Spasov A.A., Zvartau E.E., Grechko O.Iu. et al., 2020). В ходе проведения экспериментов не было установлено у изучаемого соединения свойств, которые можно интерпретировать как предикторы развития аверсии. Механизм подобного измененного фармакологического профиля АФС РУ-1205, возможно, ассоциирован с влиянием на р38-МАР-киназу, что подтверждается при совместном введении с ингибитором р38-МАР-киназы – соединением SB203580.

Неотъемлемой частью комплексного доклинического изучения свойств нового фармакологически активного соединения является исследование безопасности, оцениваемой по спектру общих (острая токсичность, хроническая токсичность) и специфических (эмбрио- и гонадотоксичность и др.) токсикологических показателей.

Острую токсичность исследовали у соединения РУ-1205 как на АФС, так и на лекарственной форме, представленной в виде ГТ на мышах и крысах обоего пола, рассчитывали показатель *острой токсичности* ЛД₅₀ (Рисунок 9.3). В опытах на мышах ЛД₅₀ АФС РУ-1205 для самцов составила 1898,96 мг/кг, для самок – 1565,05 мг/кг; на крысах для самцов – 534,25 мг/кг, для самок – 1583,45 мг/кг.

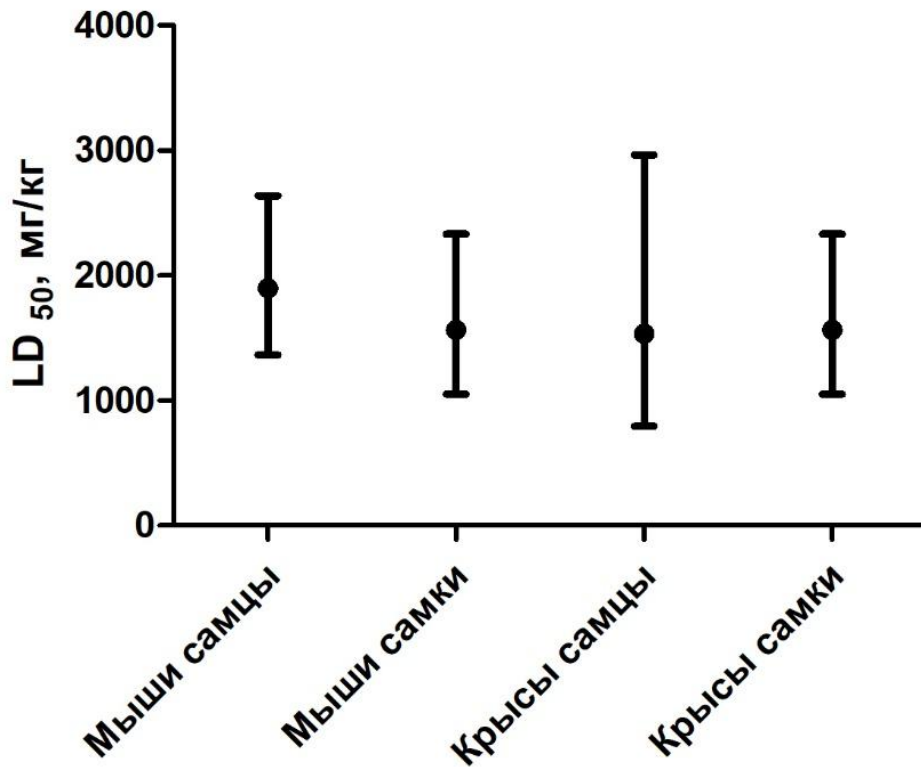


Рисунок 9.3. Показатели ЛД₅₀ АФС РУ-1205 для разных видов животных, М [min; max]

Рассчитанные параметры позволяют отнести соединение РУ-1205 в виде активной фармацевтической субстанции к классу малотоксичных веществ (Sanotski I. V. 1996), а также по степени воздействия на организм причислить его к 3-му классу (умеренно опасному) (ГОСТ 12.1.007-76).

В клинике токсического действия изучаемого соединения, исследуемого в форме АФС и лекарственной формы, прослеживалось угнетение ЦНС: снижение подвижности, отсутствие реакций на звуковые и тактильные раздражители. Вместе с тем после однократного

внутрижелудочного введения соединения РУ-1205 в виде фармацевтической субстанции и в форме ГТ животным у исследуемых мышей и крыс не наблюдалось симптомов интоксикации, характерных для опиоидов (кататонической ригидности хвоста – реакции Штрауба, судорог, тремора, птоза, прыжков).

Для ГТ РУ-1205 не удалось рассчитать значение некоторых параметров острой токсичности, так как гибель животных не превышала 40 % в группе, в которой агонист КОР вводили в максимальной дозе 20 000 мг/кг (1 000 мг/кг субстанции соединения). Таким образом, ГТ РУ-1205 относится к классу малотоксичных веществ (Sanotski I.V., 1996), по степени воздействия на организм – к 3-му классу (умеренно опасному) (ГОСТ 12.1.007-76).

В хронических экспериментах исследовалось влияние соединения РУ-1205 на органы и их функции в виде активной фармацевтической субстанции при ежедневном длительном (3 месяца) пероральном введении крысам обоего пола в дозах 5 мг/кг (соответствует экспериментальной терапевтической дозе, ТД); 50 мг/кг (10×ТД) и 500 мг/кг (100×ТД).

Установлено отсутствие влияния субстанции АФС РУ-1205 в дозе 5 мг/кг на общее состояние животных, прирост массы тела, пищевую и питьевую активность, двигательное и эмоциональное поведение (поведенческую активность), гематологические и биохимические показатели периферической крови, электрофизиологические параметры активности сердца, функциональное состояние печени и почек.

У животных, получавших АФС РУ-1205 в дозе 50 мг/кг, прирост массы тела достоверно не различался с показателями группы контроля. Не было выявлено выраженных изменений в общем состоянии: не отмечалось существенных изменений в пищевой и питьевой активности; в гематологических и биохимических показателях периферической крови, электрофизиологической активности миокарда. У животных данной группы существенно не изменялись функциональные параметры печени и почек.

О влиянии АФС РУ-1205 при длительном (в течение 3 месяцев) введении на состояние иммунной системы судили по показателям лейкоцитарной формулы. Отмечалось снижение общего количества лейкоцитов во всех опытных группах, а также количества палочкоядерных гранулоцитов как у самцов, так и у самок, в дозе 500 мг/кг на 43,5 % ($p < 0,05$) и на 35,0 % ($p > 0,05$) соответственно, а также увеличивалось количество моноцитов. Вместе с тем данные колебания не выходили за рамки физиологических норм во всех исследуемых группах.

На основании проведенного *патоморфологического анализа* состояния внутренних органов можно сделать заключение об отсутствии повреждающего влияния на организм соединения РУ-1205 в виде АФС в дозах 5 и 50 мг/кг при ежедневном длительном (3 месяца) пероральном введении крысам обоего пола и через один месяц после его отмены.

При оценке микропрепаратов тканей легких, надпочечников, селезенки, желудка, тонкого и толстого кишечника, поджелудочной железы, тимуса, семенников и яичников изучаемых животных всех трёх опытных групп различий с контролем не выявлено. При этом у животных, получавших АФС РУ-1205 в дозе 5 мг/кг, не отмечено никаких изменений в головном мозге, сердце, печени и почках. У животных из опытной группы, которым изучаемое соединение вводили в дозе 50 мг/кг, незначительные изменения в вышеупомянутых органах носили обратимый характер и полностью исчезали через 1 месяц после отмены введения вещества.

У крыс, получавших АФС РУ-1205 в максимально изученной дозе 500 мг/кг, ухудшалось состояние шерстного (становилось неопрятным, тусклым с желтоватым оттенком) и кожных покровов (становилось бледным). Прирост массы тела был положительным, но достоверно ниже относительно контрольных значений. Пищевая и питьевая активность снижены. В поведенческой активности данных животных отмечено обратимое мягкое депримирующее влияние на исследуемые параметры. В данной группе животных через один месяц после отмены введения изучаемого соединения отмечено восстановление вышеописанных параметров до уровня группы контроля. Все фиксируемые изменения гематологических показателей периферической крови (снижение уровня эритроцитов и гемоглобина, изменение числа лейкоцитов) не выходили за рамки физиологической нормы. По результатам биохимических исследований отмечено повышение концентрации глюкозы и холестерина в рамках физиологических норм, без изменений активности трансаминаз. Исследуемые параметры восстанавливались до контрольных значений после отмены введения соединения в дозе 500 мг/кг. Можно предположить, что изучаемое соединение не оказывает существенного влияния на основные виды обмена веществ даже в максимально исследуемой дозе, многократно превышающей терапевтическую.

По результатам функциональных тестов в группе животных, получавших АФС РУ-1205 в дозе 500 мг/кг, отмечены обратимые изменения: подавление детоксицирующей функции печени (тест «гексеналовый сон»), снижение поглотительно-выделительной функции печени (тест с красителем бромсульфалеином), а также угнетающее влияние соединения на экскреторную и реабсорбционную функции почек (тест с красителем феноловый красный). В исследованиях же, проведенных после отмены введения АФС РУ-1205 (в дозе 500 мг/кг), зафиксировано восстановление изученных параметров до уровня значений контроля.

Можно предположить наличие негативного действия АФС РУ-1205 в дозе 500 мг/кг на функцию печени, что согласуется и с результатами морфологических исследований (макроскопически – изменение формы и повышение коэффициента масс, микроскопически –

зернистая дистрофия гепатоцитов с признаками пролиферации). Выявленные на момент окончания введения АФС РУ-1205 в дозе 500 мг/кг функциональные изменения в почках были зафиксированы в большей степени среди самок данной опытной группы. При этом изменения практически выравнивались до значений контроля после отмены введения вещества. Данное заключение также подтверждается и результатами морфологических исследований (набухание и дистрофические изменения эпителия проксимальных и дистальных канальцев, а также лизис отдельных ядер клеток канальцев с последующим восстановлением до нормальных значений).

В другой серии хронических токсикологических исследований на кроликах оценивали токсические свойства и безопасность использования ГТ РУ-1205 при 3-месячном внутрижелудочном введении, а также через 1 месяц после его отмены. Половозрелым животным обоего пола ежедневно вводили ГТ РУ-1205 (в форме водной взвеси) в дозах: 5 мг/кг (экспериментально доказанная терапевтическая доза, ТД), 50 мг/кг (10×ТД) и 500 мг/кг (100×ТД). В период эксперимента следили за общим состоянием и поведением животных. Проводили гематологические, биохимические и патоморфологические исследования.

Установлено, что под действием ГТ РУ-1205 в дозе 5 мг/кг (относительно контроля) у кроликов не изменялось общее состояние и поведение, прирост массы тела, дыхание, электрофизиологическая активность сердца, гематологические и биохимические показатели крови, а также коэффициенты масс внутренних органов и их патоморфология.

Общее состояние кроликов, получавших ГТ РУ-1205 в дозе 50 мг/кг, практически не отличалось от контрольной группы. При этом в поведении у кроликов этой опытной группы было зафиксировано тенденции снижения подвижности, но без изменений их реактивности. По результатам гематологических и биохимических исследований не установлено повреждающего влияния ГТ РУ-1205 на показатели периферической крови кроликов.

Патоморфологическими исследованиями внутренних органов не зафиксировано каких-либо значимых изменений в головном мозге, легких, сердце, почках, селезенке, гонадах. При этом прослеживалось увеличение размеров печени, но без статистически значимого достоверного увеличения коэффициента массы органа, и обратимые структурные изменения (явления мелкокапельной дистрофии гепатоцитов) при микроскопической оценке.

У кроликов, получавших ГТ РУ-1205 в дозе 500 мг/кг, прослеживалось обратимое снижение прироста массы тела, ухудшение состояния шерстного покрова, повышение подвижности и эмоциональности. При исследовании гематологических параметров не отмечалось изменений в показателях красной крови, тогда как в белой крови кроликов-самцов зафиксировано снижение, относительно контрольных, значений числа лейкоцитов на треть

($p < 0,05$) (при этом количество сегментоядерных гранулоцитов увеличилось на 59,9 % ($p < 0,01$)), и лимфоцитов на 15 % ($p < 0,05$). У самок этой опытной группы, напротив, повышалось количество лейкоцитов на 64,2 % ($p < 0,05$) относительно группы контроля, а количество лимфоцитов повышалось в среднем на 18 %. В исследованиях, проведенных через 1 месяц после отмены введения вещества ГТ РУ-1205, каких-либо изменений в показателях периферической крови кроликов не зарегистрировано. Среди изученных биохимических показателей зафиксировано обратимое повышение уровня глюкозы и холестерина. При этом выявленные сдвиги не выходили за рамки референсных значений и нивелировались после отмены введения изучаемого вещества. Данное заключение согласуется с результатами патоморфологических исследований.

Так, на основании гистологического анализа внутренних органов животных, получавших ГТ РУ-1205 в течение 3 месяцев в дозе 500 мг/кг, можно предположить наличие наиболее отчетливого обратимого действия вещества на органы детоксикации (легкие, печень, почки), которые являются наиболее чувствительными к действию испытуемого вещества.

В рамках данного исследования оценивали влияние АФС РУ-1205 на репродуктивную функцию крыс. Изучаемое соединение вводили перорально половозрелым животным: самцам (2 месяца), самкам (15 дней) в дозах 5 мг/кг (терапевтическая, ТД) и 500 мг/кг (100×ТД).

Отрицательного влияния изучаемого соединения *на половое поведение животных* не зафиксировано. В группе крыс-самцов, получавших АФС РУ-1205 в дозе 5 мг/кг, установлена тенденция активации полового поведения, в то время как среди крыс-самцов, получавших изучаемое соединение в дозе 500 мг/кг, – незначительное снижение (исходя из параметров рецептивного/спаривательного поведения).

При курсовом введении АФС РУ-1205 не зафиксировано негативного влияния на функции сперматозоидов и процессы сперматогенеза. При этом данное вещество мягко активирует фертилизующую способность самцов, оказывает положительное влияние на функцию эпителиосперматогенного слоя без патологического воздействия на функциональное состояние канальцев.

На основании проведенных исследований можно заключить, что АФС РУ-1205 в дозах 5,0 и 500,0 мг/кг не оказывает негативного влияния на половую мотивационную активность, фертильность и на овуляторную цикличность крыс-самок и способствует тенденции положительного влияния на качество зачатия: снижает эмбриональную гибель плодов, повышает плодовитость у самок.

Исследование эмбрио- и фетотоксического действия АФС РУ-1205, регистрируемое в антенатальном и постнатальном периодах развития крыс, проводили в два этапа.

По результатам первого этапа (исследование антенатальной токсичности) можно заключить, что АФС РУ-1205 в дозах 5, 50 и 500 мг/кг при пероральном введении беременным крысам не проявляет эмбрио- и фетотоксических свойств. Так, не установлено изменений в общем состоянии выделенных плодов и их антенатальном развитии (оценивались масса тела, наличие уродств, внешневидимые изменения: краниокаудальные размеры, процессы оссификации скелета).

По результатам второго этапа исследований можно предположить, что АФС РУ-1205 в дозе 500 мг/кг при хроническом (с 6-го по 20 дни беременности) пероральном введении крысам-самкам не оказывает эмбриотоксического действия, которое регистрируется в постнатальном периоде развития потомства. При этом в особенностях скорости физического и полового развития, а также поведенческих и мнестических реакции у крысят из опытной группы обнаружено опережение по нескольким показателям (открытие глаз, опущение семенников в мошонку и т. д.) относительно группы контроль.

Для изучения *генотоксических свойств АФС РУ-1205* использовали метод щелочного гель-электрофореза отдельных клеток (тест ДНК-комет) при внутрижелудочном введении крысам в дозах 5, 50 и 500 мг/кг. Критерием генотоксичности являлось статистически значимое повышение процентного содержания ДНК в хвосте кометы (% ДНК в хвостах комет) по сравнению с контролем при значении индекса повреждения (ИП) выше 2,0. В рамках исследования генотоксических свойств АФС РУ-1205 учитывали % ДНК в хвостах комет в микропрепаратах крови, печени, почек, костного мозга, головного мозга, желудка (по результатам фармакокинетических исследований) (Spasov A.A., Smirnova L.A., Grechko O.Yu. et al., 2021).

В результате проведенных исследований не было установлено влияния АФС РУ-1205 при однократном внутрижелудочном введении на геном крыс (Таблица 9.4). Это подтверждается отсутствием статистически значимого дозозависимого увеличения показателя повреждения % ДНК в хвостах комет для всех экспериментальных точек на препаратах анализируемых органов и низким уровнем индекса повреждения в максимальной дозе 500 мг/кг.

Таблица 9.4. Влияние АФС РУ-1205 (интрагастрально, однократно) на процентное содержание ДНК в хвостах комет исследуемых органов крыс (%ДНК в хвостах комет)

№ п/п	Орган	% ДНК в хвостах комет								
		Метил- метан- сульфонат 40 мг/кг, в/б	Самцы			Самки				
			контроль, вода очищенная	РУ-1205, 5 мг/кг	РУ-1205, 50 мг/кг	РУ-1205, 500 мг/кг	контроль, вода очищенная	РУ-1205, 5 мг/кг	РУ-1205, 50 мг/кг	РУ-1205, 500 мг/кг
1	Печень	↑↑	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Головной мозг	↑↑	0	0	0	0	0	0	0	0
3	Костный мозг	↑	0	0	0	0	0	0	0	0
4	Кровь	↑	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Желудок	—	↑	↑	↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑

Примечание: 0 – % ДНК в хвостах комет < 10 %; ↑ – % ДНК = 10 %; ↑↑ – % ДНК = 20 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных острой и хронической токсичности была спрогнозирована безопасность соединения РУ-1205 в твердой лекарственной форме для человека при проведении клинических исследований.

Согласно алгоритму, для определения *максимальной рекомендованной начальной дозы* (МРНД) для бессимптомных добровольцев среди людей необходимым является использование следующих параметров: дозы без наблюдаемого отрицательного эффекта (ДБНОЭ), эквивалентной дозы для человека (ЭДЧ), коэффициента пересчета на площадь поверхности тела (КП), коэффициента безопасности (КБ), фармакологически активной дозы (ФАД).

Основным тестом при выборе ДБНОЭ является патоморфологическое исследование. На основании полученных данных ДБНОЭ для кроликов составляет 50 мг/кг.

Эквивалентная доза для человека в мг/кг, то есть доза для человека, которая, с учётом площади поверхности тела (предположительно) обеспечит такой же эффект, как и наблюдаемый у животных в той же дозе, рассчитывалась путём деления ДБНОЭ для кроликов на коэффициент пересчёта (Кп) для кроликов (3,2), исходя из массы тела человека 50–80 кг:

$$\text{ЭДЧ} = \text{ДБНОЭ (для кроликов)} / \text{Кп (для кроликов)} = 50 \text{ мг/кг} / 3,2 = 15,6 \text{ мг/кг}.$$

Тот же результат получается при другом рекомендованном способе вычисления ЭДЧ – умножении дозы для кроликов на коэффициент (Кп 1) 0,32:

$$\text{ЭДЧ} = 50 \text{ мг/кг} \times 0,32 = 16 \text{ мг/кг}.$$

Максимальная рекомендованная начальная доза (Гуськова Т.А. 2010; Гуськова Т.А. Кукес В.Г., Миронов А. Н., 2012), то есть наибольшая начальная доза для изучения новых потенциальных лекарственных средств в клинических исследованиях I фазы у здоровых людей-добровольцев, вычислялась путём деления на КБ, равный 10, чтобы иметь запас безопасности между ЭДЧ и МРНД:

$$16 \text{ мг/кг} / 10 = 1,6 \text{ мг/кг}. \text{ Для человека } 80 \text{ кг}: 1,6 \times 80 = 128 \text{ мг}.$$

Фармакологически активная доза, то есть наименьшая доза, исследованная на крысах в тесте tail-flick (ЭД₅₀ 0,5 мг/кг) (Штарева Д., 2014), которая обладает анальгетической активностью, для человека составила приблизительно 10 мг.

С учетом низкой токсичности исследуемого препарата и, соответственно, высокой дозы МРНД представляется целесообразным исследовать безопасность, переносимость и фармакокинетические параметры в ФАД соединения РУ-1205 (10 мг) и при 5-кратном увеличении ФАД (50 мг) в качестве МРНД при однократном пероральном приеме, и ФАД соединения РУ-1205 (10 мг) при многократном приеме (2 раза в сутки с интервалом 8 часов).

Таким образом, в ходе проведенного исследования были изучены фармакологические и токсикологические свойства каппа-опиоидного агониста – соединения РУ-1205 в твердой лекарственной форме. Анальгетическая активность изучаемого соединения сопоставима с μ -опиоидами (морфин, тримеперидин) и превосходит каппа-агонист буторфанол на модели соматогенной боли *in vivo*. У АФС РУ-1205 не выявлено аверсивных свойств в тесте УРИМ, характерных для других каппа-опиоидных агонистов (U-50,488), предположительно это связано с влиянием на р38-МАРК-киназу. Помимо этого, изучаемое соединение проявляет отличный от буторфанола набор интероцептивных стимульных свойств.

Исследуемое соединение в твердой лекарственной форме относится к классу малоопасных, что также подтверждается результатами хронических экспериментов по изучению общетоксических свойств и параметров специфической токсичности. Соединение РУ-1205 в форме активной фармацевтической субстанции и в виде гранулята таблеток вводили животным (крысам и кроликам соответственно) ежедневно внутривентрикулярно в течение 3 месяцев для оценки общетоксических свойств. Обратимые структурные изменения зафиксированы на микропрепаратах органов животных из группы, получавшей изучаемое соединение в максимальной исследуемой дозе – 500 мг/кг.

При оценке параметров специфической токсичности не прослеживалось влияния АФС РУ-1205 на генеративную функцию крыс, а также не отмечено эмбрио- и фетотоксического действия изучаемого соединения, регистрируемого в антенатальном и постнатальном периодах развития. При исследовании генотоксических свойств методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток (тест ДНК-комет) не выявлено увеличения показателя повреждения ДНК (% ДНК в хвостах комет) в группах животных, получавших АФС РУ-1205 в максимальной дозе.

ВЫВОДЫ

1. Соединение РУ-1205 в виде активной фармацевтической субстанции и гранулята таблеток при однократном введении мышам внутрибрюшинно и внутрь в дозе 5 мг/кг проявляет анальгетический эффект, равный препаратам сравнения – морфину, тримеперидину, буторфанолу на модели отдергивания хвоста от теплового излучения (tail flick).

2. Селективный антагонист каппа-опиоидных рецепторов – норбиналторфимин при предварительном внутрибрюшинном введении мышам в дозе 10 мг/кг в тесте «горячая пластина» статистически значимо снижает анальгетический эффект АФС РУ-1205 (5 мг/кг) в 5,1 раза.

3. Клонидин в дозе 1 мг/кг при совместном внутрибрюшинном введении мышам с активной фармацевтической субстанцией РУ-1205 (5 мг/кг) на модели отдергивания хвоста статистически значимо увеличивает максимально возможный анальгетический эффект (МВЭ, %) опиоида в среднем на 50 %; мидазолам, вводимый аналогичным образом в дозе 0,3 мг/кг, усиливает обезболивающую активность каппа-агониста через 30 минут в 1,8 раза.

4. Атропин (2,7 мг/кг), amitриптилин (3 мг/кг) и карбамазепин (15 мг/кг) при совместном внутрибрюшинном введении мышам с соединением РУ-1205 в виде АФС (5 мг/кг) на модели отдергивания хвоста статистически значимо ослабляют МВЭ (%) каппа-агониста в 0,4; 2,0 и 0,4 раза соответственно. Габапентин (90 мг/кг), галоперидол (0,45 мг/кг), метоклопрамид (5 мг/кг) и диазепам (1 мг/кг) при внутрибрюшинном введении мышам совместно с соединением РУ-1205 в виде активной фармацевтической субстанции не изменяют его анальгетическую активность.

5. Активная фармацевтическая субстанция РУ-1205 при многократном внутрибрюшинном введении мышам в дозе 5 мг/кг в тесте условной реакции избегания места (УРИМ) не изменяет длительность нахождения животного в камере, ассоциированной с введением вещества, в отличие от препарата сравнения каппа-агониста U-50488 (10 мг/кг). В группах животных, которым предварительно (до U-50488) внутрибрюшинно вводили ингибитор p38 MAPK-киназы SB203580 в дозе 0,05 мг/кг или АФС РУ-1205 (5 мг/кг), реакция избегания места не формировалась.

6. Соединение РУ-1205 при курсовом (3 месяца) пероральном введении крысам (АФС) и кроликам (ГТ) обоего пола в дозе 5 мг/кг не вызывает необратимых изменений в функциях и структуре органов. При введении изучаемого соединения в виде активной

фармацевтической субстанции и гранулята таблеток в дозе 50 мг/кг зарегистрированы незначительные обратимые изменения в функции печени.

7. Соединение РУ-1205 в виде АФС и ГТ в дозе 500 мг/кг при курсовом (3 месяца) пероральном введении крысам и кроликам обоего пола приводит к патологическим изменениям строения и функций печени (в тесте «гексеналовый сон» увеличение длительности засыпания и сна, на микропрепаратах печени – кариолизис и мелкокапельная дистрофия гепатоцитов).

8. Соединение РУ-1205 в виде АФС при длительном пероральном введении крысам в различных дозах (5, 50 и 500 мг/кг) не вызывает негативного влияния на генеративные функции самок и самцов, а также не проявляет эмбрио- и фетотоксического действия.

9. Соединение РУ-1205 в виде АФС при пероральном введении крысам в дозах 5, 50 и 500 мг/кг в тесте ДНК-комет не вызывает повреждение генома.

10. Соединение РУ-1205 в виде активной фармацевтической субстанции и в виде гранулята таблеток, согласно ГОСТ 12.1.007-76, при однократном внутрижелудочном введении мышам и крысам относится к 3-му умеренно опасному классу.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основании полученных в рамках настоящего исследования данных о фармакологических и токсикологических свойствах твёрдой лекарственной формы соединения РУ-1205 (активной фармацевтической субстанции и гранулята таблеток) целесообразным является составление регистрационного досье на потенциально новый лекарственный препарат – РУ-1205.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АлАТ – аланинаминотрансфераза
АсАТ – аспаргатаминотрансфераза
АФС – активная фармацевтическая субстанция
БСФ – бромсульфалеин
ВДА – вертикальная двигательная активность
ГДА – горизонтальная двигательная активность
ГТ – гранулят таблеток
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДОА – δ -опиоидный агонист
ДОР – δ -опиоидный рецептор
ИП – индекс повреждения
ИБ – индекс беременности
КОА – κ -опиоидный агонист
КОР – κ -опиоидный рецептор
Капша-ОР – κ -опиоидный рецептор
ЛП – латентный период
МВЭ – максимально возможный эффект
МОА – μ -опиоидный агонист
МОР – μ -опиоидный рецептор
МРНД – максимально рекомендованная начальная доза
ОР – опиоидные рецепторы
ПЗП – площадка зоосоциальных предпочтений
УРПИ – условная реакция пассивного избегания
УРИМ – условная реакция избегания места
ФАД – фармакологически активная доза
ЧДА – чистый для анализа
ЦНС – центральная нервная система
ЦП – цветовой показатель
ХБС – хронический болевой синдром
ЩФ – щелочная фосфатаза
ЭКГ – электрокардиограмма

ANOVA – двухфакторный дисперсионный анализ

GIRKs – (англ.) G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels – G-белок-связанные калиевые каналы внутреннего выпрямления

GPCR – (англ.) G-protein-coupled receptors – рецепторы, связанные с G-белком

IUPHAR – (англ.) International Union of Basic and Clinical Pharmacology

NOR – (англ.) nociceptin opioid peptide receptor – ноцицептиновый опиоидный пептидный рецептор

МАРК – (англ.) mitogen-activated protein kinase – митоген-активируемая протеинкиназа

norBNI – норбиналторфимин

%ДНК в хвосте кометы – процентное содержание ДНК в хвосте кометы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Абрашова, Т.В.** Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных / Т.В. Абрашова, Я.А. Гуцин, М.А. Ковалева [и др.] : под ред. В.Г. Макарова, М.Н. Макаровой. – Санкт-Петербург : Лема, 2013. – 116 с. – Текст : непосредственный.
2. **Анисимова, В.А.** Синтез и фармакологическая активность 9-R-2-галогенфенилимидазобензимидазолов / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, И.Е. Толпыгин [и др.]. – Текст : электронный // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – Т. 44, № 7. – С. 7–13. – EDN TMKXDL.
3. **Арзамасцев, Е.В.** Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств / Е.В. Арзамасцев, И.В. Березовская, О.Л. Верстакова [и др.]. – Текст : непосредственный // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под общ. ред. А.Н. Миронова. – Москва : Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – С. 13–24.
4. **Берхин, Е.Б.** Методы экспериментального исследования почек и водно-солевого обмена / Е.Б. Берхин, Ю.И. Иванов. – Барнаул, 1972. – 199 с. – Текст : непосредственный.
5. **Боровая, Т.Г.** Влияние экспериментальной гиперпролактинемии на половой цикл и фолликулогенез / Т.Г. Боровая, О.В. Волкова. – Текст : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1994. – № 9. – С. 326–328.
6. **Брюн, Е.А.** Психические и поведенческие расстройства, вызванные употреблением психоактивных веществ. Острая интоксикация. Клинические рекомендации. Проект / Е.А. Брюн, Т.В. Агибалова, И.А. Бедина [и др.]. – Текст : непосредственный // Наркология. – 2019. – Т. 18, № 3. – С. 3–32. – DOI 10.25557/1682-8313.2019.03.3-32. – EDN HEKENS.
7. **Буреш, Я.** Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д.П. Хьюстон. – Москва : Высшая школа, 1991. – 210 с. – Текст : непосредственный.
8. **Вальдман, А.В.** Нейрофармакология наркотических анальгетиков / А.В. Вальдман. – Ленинград : Медицина, Ленинградское отделение Академии наук СССР, 1972. – 223 с. – Текст : непосредственный.

9. **Вальдман, А.В.** Психофармакологические и медико-правовые аспекты токсикоманий / А.В. Вальдман, Э.А. Бабаян, Э.Э. Звартау. – Москва : Медицина, 1988. – 320 с. – Текст : непосредственный.
10. **Васильев, П.М.** Поиск *in silico* производных конденсированных азолов с высокой фармакологической активностью / П.М. Васильев, М.Е. Кругликов, А.Н. Кочетков. – Текст : электронный // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2011. – № 5. – С. 20–21. – EDN ZCYUXXL.
11. **Васильев, П.М.** Направленный поиск соединений с противосудорожной активностью в ряду производных бензимидазола / П.М. Васильев, К.Ю. Калитин, А.А. Спасов [и др.]. – Текст : непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 50, № 12. – С. 3–8. – EDN XERXZH.
12. **Введенская, Е.С.** Современные тенденции лечения хронического болевого синдрома с применением опиоидных анальгетиков / Е.С. Введенская. – Текст : электронный // Лечащий врач. – 2022. – № 1 (25). – С. 46–52. – DOI: 10.51793/OS.2022.25.1.009.
13. **Воронина, Т.А.** Экспериментальная психофармакология ноотропов / Т.А. Воронина. – Текст : непосредственный // Фармакология ноотропов: сборник трудов / под ред. А.В. Вальдмана, Т. А. Воронина. – Москва : Медицина, 1989. – С. 91–98.
14. **Воронина, Т.А.** Методические рекомендации по доклиническому изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия лекарственных средств / Т.А. Воронина, С.Б. Середенин, М.В. Яркова – Текст : непосредственный // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – 2012. – Т. 1, Ч. 1. – С. 264–275.
15. **Гижларян, М.С.** Исследование функций печени методом «гексеналевого сна» / М.С. Гижларян. – Текст : непосредственный // Фармакология и токсикология. – 1976. – № 3. – С. 13–14.
16. **Гречко, О.Ю.** Влияние новых производных бензимидазола на уровни болевых порогов в тесте электрического раздражения корня хвоста крыс / О.Ю. Гречко, М.В. Черников, А.А. Спасов, В.А. Анисимова. – Текст : непосредственный // Психофармакология и биологическая наркология. – 2007. – Т. 7, № 4-1. – С. 1666–1667. – EDN SMXAGP.
17. **Гречко, О.Ю.** Виртуальный скрининг и целенаправленный поиск соединений с высокой каппа-опиоидной активностью / О.Ю. Гречко, П.М. Васильев, М.В. Черников, В.А. Анисимова. – Текст : непосредственный // Психофармакология и биологическая наркология. – 2007. – Т. 7, № 4-1. – С. 1666. – EDN SMWCKZ.

18. **Гречко, О.Ю.** Изменения ионных токов нейронов прудовика под влиянием буторфанола и производных имидазобензимидазола соединений РУ-1203, РУ-1205 / О.Ю. Гречко, А.И. Вислобоков, Ю.Д. Игнатов [и др.]. – Текст : непосредственный // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2010. – Т. 8, № 4. – С. 52–59. – EDN NUEIGD.

19. **Гречко, О.Ю.** Изучение анальгетической активности нового производного бензимидазола при различных путях введения / О.Ю. Гречко, Н.В. Елисеева, Д.М. Чикун [и др.]. – Текст : непосредственный // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2012. – № 2 (34). – С. 17–18. – EDN TXJWDN.

20. **Гречко, О.Ю.** Конденсированные бензимидазолы – новый класс каппа-опиоидных агонистов : дис. ... д-ра мед. наук ; специальность 14.03.06 «Фармакология, клиническая фармакология» / Гречко Олеся Юрьевна. – Волгоград, 2012. – 200 с. – EDN NUMTOV. – Текст : непосредственный.

21. **Гречко, О.Ю.** Изучение рецепторного механизма анальгетического действия соединения РУ-1205 / О.Ю. Гречко, А.А. Спасов, Д.М. Штарева, А.И. Ращенко. – Текст : непосредственный // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. – № 1(49). – С. 61–63. – EDN RZSBWL.

22. **Гречко, О.Ю.** Изучение физической зависимости и толерантности к антиноцицептивному действию соединения РУ-1205 / О.Ю. Гречко, Д.М. Штарева, А.А. Спасов [и др.]. – Текст : электронный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016. – Т. 79, № 4. – С. 8–11. – DOI: 10.30906/0869-2092-2016-79-4-8-11. – EDN VXCLQB.

23. **Гречко, О.Ю.** Анальгетическая активность производного бензимидазола на моделях воспалительной боли / О.Ю. Гречко, Н.В. Елисеева, А.А. Спасов, Р.А. Литвинов. – Текст : непосредственный // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2016. – № 2(58). – С. 101–103. – EDN WBLSDJ.

24. **Гречко, О.Ю.** 2-п-Фторфенилимидазо1,2-абензимидазол – перспективный скаффолд для создания селективных каппа-опиоидных агонистов / О.Ю. Гречко, А.А. Спасов, В.А. Анисимова [и др.]. – Текст : непосредственный // XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии : тезисы докладов в 5 томах, Екатеринбург, 26–30 сентября 2016 г. / Уральское отделение Российской академии наук. – Екатеринбург : Уральское отделение РАН, 2016. – Т. 4. – С. 482. – EDN YGLMQP.

25. **Гречко, О.Ю.** Изучение специфической токсичности каппа-опиоидных анальгетиков / О.Ю. Гречко, А.А. Спасов, Р.А. Литвинов, Н.В. Елисеева. – Текст :

непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80, № S6. – С. 9–10. – EDN ZBCSKD.

26. **Гуськова, Т.А.** Категории риска репродуктивной токсичности лекарственных средств / Т.А. Гуськова, Н.М. Смольникова, А.М. Скосырева [и др.]. – Текст : непосредственный // Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. – 2001. – № 3. – С. 36–38.

27. **Гуськова, Т.А.** Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований / Т.А. Гуськова. – Текст : непосредственный // Токсикологический вестник. – 2010. – № 5 (104). – С. 2–5.

28. **Гуськова, Т.А.** Методические рекомендации по определению безопасной дозы лекарственного препарата для проведения I фазы клинических исследований у волонтеров / Т.А. Гуськова, В.Г. Кукес, А.Н. Миронов. – Текст : непосредственный // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под общ. ред. А.Н. Миронова. – Москва : Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – С. 854–864.

29. **Деркачев, Э.Ф.** Способ исследования активации и агрегации тромбоцитов : патент RU 2108579 C1, МПК G01N 33/49 / Э.Ф. Деркачев, И.В. Миндукшев, А.И. Кривченко, А.А. Крашенинников. – Заявл. 30.07.1996 ; Опубл. 10.04.1998. – Текст : непосредственный

30. **Дурнев, А.Д.** Методические рекомендации по изучению репродукционной токсичности лекарственных средств / А.Д. Дурнев, Н.М. Смольникова, Т.А. Гуськова. – Текст : непосредственный // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под общ. ред. А.Н. Миронова. – Москва : Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – С. 80–93.

31. **Дурнев, А.Д.** Методические рекомендации по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток в фармакологических исследованиях / А.Д. Дурнев, В.А. Меркулов, А.К. Жанатаев. – Текст : непосредственный // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под общ. ред. А.Н. Миронова. – Москва : Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – С. 115–128.

32. **Дыбан, А.П.** Методические указания по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и влияния их на репродуктивную функцию / А.П. Дыбан, В.Ф. Пучков, А.М. Торчинский. – Москва : Фармакологический комитет, 1986. – 25 с. – Текст : непосредственный.

33. **Елисеева, Н.В.** Поиск и изучение фармакологических свойств новых агонистов каппа-опиоидных рецепторов : дис. ... канд. мед. наук : 14.03.03 / Елисеева Наталья Владимировна. – Волгоград, 2010. – 182 с. – Текст : непосредственный.

34. **Елисеева, Н.В.** Разработка нового оригинального анальгетика с каппа-опиоидным механизмом действия на основе производного бензимидазола / Н.В. Елисеева, О.Ю. Гречко, Р.А. Литвинов, В.А. Анисимова. – Текст : электронный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81, № 5. – С. 77–78. – DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-5s-1-306. – EDN LTCFPX.

35. **Иванова, Е.А.** Изучение длительности и дозозависимости анальгетического действия тетрапептида Н-Тур-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ (тафалгин) – в сравнении с морфина гидрохлоридом / Е.А. Иванова, Т.А. Воронина, Н.В. Коробов, В.С. Косоруков. – Текст : непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 2022. – Т. 56, № 9. – С. 8–13.

36. **Калитин, К.Ю.** Противосудорожная и мембранотропная активность соединения РУ-1205 / К.Ю. Калитин, А.А. Спасов, О.Ю. Гречко [и др.]. – Текст : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80, № 9. – С. 28–34. – DOI: 10.30906/0869-2092-2017-80-9-28-34. – EDN ZHLEXT.

37. **Калитин, К.Ю.** Противосудорожные свойства новых пара-галогенфенилпроизводных бензимидазола : дис. ... канд. мед. наук : 14.03.06 / Калитин Константин Юрьевич. – Волгоград, 2018. – 194 с. – Текст : непосредственный.

38. Кирющенко, Л.П. Влияние лекарственных средств на плод / Л.П. Кирющенко, М.Л. Тараховский. – Москва : Медицина, 1990. – 286 с. – Текст : непосредственный.

39. **Крупницкий, Е.М.** Двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование эффективности налтрексона в имплантируемой и пероральной формах для стабилизации ремиссии и улучшения приверженности АРВТ у больных ВИЧ-инфекцией с опиоидной зависимостью / Е.М. Крупницкий, Е.А. Блохина, Э.Э. Звартау [и др.]. – Текст : электронный // Вопросы наркологии. – 2020. – № 7(190). – С. 5–30. – DOI: 10.47877/0234-0623_2020_07_5. – EDN ХОАНСҮ.

40. **Кузьмина, Н.Е.** Развитие представлений о взаимодействии лекарственных веществ с опиатными рецепторами / Н.Е. Кузьмина, В.С. Кузьмин. – Текст : непосредственный // Успехи химии. – 2011. – Т. 80, № 2. – С. 157–181.

41. **Литвинов, Р.А.** Фармакотоксикологические свойства нового каппа-опиоидного агониста – производного бензимидазолов : дис. ... канд. мед. наук : 14.03.06 / Литвинов Роман Александрович. – Волгоград, 2016. – 194 с. – EDN YNWKID. – Текст : непосредственный.

42. **Литвинов, Р.А.** Влияние соединения РУ-1205 в разных дозах на поведенческие эффекты, вызываемые фармакологическими нейромедиаторными анализаторами / Р.А. Литвинов, Н.В. Елисеева, О.Ю. Гречко. – Текст : электронный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81, № S. – С. 143–144. – DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-5s-1-306. – EDN UZXFVS.

43. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных. Приняты Советом международных медицинских научных организаций (СММНО) в 1985 г. – Текст : непосредственный // Этические и правовые проблемы клинических испытаний и научных экспериментов на человеке и животных. – Москва, 1994. – С. 1.

44. Методические указания по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и влияния их на репродуктивную функцию / сост.: Б.И. Любимов, Н.М. Смольникова, И.В. Голованова [и др.]. – Москва : Фармакологический комитет, 1986. – 25 с. – Текст : непосредственный.

45. **Миндукшев, И.В.** Способ определения агрегационной активности тромбоцитов и устройство для его осуществления : патент RU 2391665 C1, МПК G01N 33/49 / И.В. Миндукшев. – Заявл. 29.12.2008 ; Оpubл. 10.06.2010. – Текст : непосредственный.

46. **Миронов, А.Н.** Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильев [и др.] ; под общ. ред. А.Н. Миронова. – Москва : Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – 944 с. – Текст : непосредственный.

47. **Новиков, Г.А.** Эпидемиологическое исследование с целью оценки потребности онкологических пациентов в паллиативной медицинской помощи в России / Г.А. Новиков, Е.С. Введенская, О.В. Зеленова [и др.]. – Текст : непосредственный // Паллиативная медицина и реабилитация. – 2018. – № 1. – С. 5–9. – EDN XTCERV.

48. **Осипова, Н.А.** Принципы применения анальгетических средств при острой и хронической боли / Н.А. Осипова, Г.Р. Абузарова, В.В. Петрова. – Москва : ФГБУ «МНИОИ им. П. А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2010. – 68 с. – Текст : непосредственный.

49. **Петров, В.И.** Анализ использования опиоидных анальгетиков в медицинских целях в Волгоградском регионе / В.И. Петров, И.А. Каминская, Н.К. Божко. – Текст : непосредственный // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2016. – № 1(57). – С. 136–139. – EDN VQZNXV.

50. Правила надлежащей лабораторной практики : Приказ Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016. – Текст : непосредственный // Российская газета. – 2016. – № 6937.

51. Принципы оценки риска для потомства в связи с воздействием химических веществ в период беременности. – Женева : ВОЗ, 1986. – 156 с. – Текст : непосредственный.

52. **Ращенко, А.И.** Фармакокинетические свойства нового обезболивающего средства производного имидазобензимидазола : дис. ... канд. фармац. наук : 14.03.03 / Ращенко Андрей Игоревич. – Волгоград, 2014. – 107 с. – Текст : непосредственный.

53. **Ращенко, А.И.** Фармакокинетические и обезболивающие свойства нового производного имидазобензимидазола – соединения РУ-1205 – с каппа-агонистической активностью в таблетированной лекарственной форме / А.И. Ращенко, А.А. Спасов, Л.А. Смирнова [и др.]. – Текст : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77, № 7. – С. 27–30. – EDN SKGBTF.

54. **Саноцкий, И.В.** Методы экспериментального исследования по установлению порогового действия промышленных ядов на генеративную функцию с целью гигиенического нормирования : методические указания НИИ гигиены, труда и профзаболеваний АМН СССР / И.В. Саноцкий, В.И. Фоменко, Л.С. Сальникова [и др.]. – Москва, 1978. – 24 с. – Текст : непосредственный.

55. **Соколов, А.Ю.** Сегментарные анатомические структуры ствола мозга, участвующие в механизмах формирования головной боли / А.Ю. Соколов, Ю.Д. Игнатов. – Текст : непосредственный // Медицинский академический журнал. – 2010. – Т. 10, № 2. – С. 17–31. – EDN TIQRAT.

56. **Спасов, А.А.** Спектр фармакологической активности и токсикологические свойства производных бензимидазола (обзор) / А.А. Спасов, И.Н. Иежица, Л.И. Бугаева, В.А. Анисимова. – Текст : непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 1999. – Т. 33, № 5. – С. 6–17. – EDN YOXGWZ.

57. **Спасов, А.А.** Средство, обладающее каппа-опиоидной агонистической активностью: патент 2 413 512 Российская Федерация, МПК А61К31/485/ А. А. Спасов, В.А. Анисимова, П. М. Васильев [и др.]. – Заявл. 29.07.2009 ; опубл. 11.03.2011, Бюл. № 7. – Текст : непосредственный.

58. **Спасов, А.А.** Новый класс агонистов каппа-опиоидных рецепторов / А.А. Спасов, О.Ю. Гречко, Н.В. Елисеева [и др.]. – Текст : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, № S. – С. 8–9. – EDN YHIGXV.

59. **Спасов, А.А.** Фторфенилпроизводные конденсированных бензимидазолов, селективные каппа-агонисты / А.А. Спасов, О.Ю. Гречко, Н.В. Елисеева, В.А. Анисимова. – Текст : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, № S. – С. 83. – EDN YHNNYZ.

60. **Спасов, А.А.** Направленный поиск веществ с каппа-опиоидной агонистической активностью среди производных гетероциклических систем / А.А. Спасов, О.Ю. Гречко, П.М. Васильев, В.А. Анисимова. – Текст : непосредственный // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2011. – № 8. – С. 52–55. – EDN PVBUSJ.

61. **Спасов, А.А.** Противозипилептическая активность нового производного бензимидазола РУ-1205 / А.А. Спасов, К.Ю. Калитин, О.Ю. Гречко, В.А. Анисимова. – Текст : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 160, № 9. – С. 320–323. – EDN UJVFOZ.

62. **Спасов, А.А.** Абсолютная биодоступность производного морфолиноэтилимидазобензимидазола у крыс / А.А. Спасов, Л.А. Смирнова, А.И. Рашенко [и др.]. – Текст : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77, № 1. – С. 17–19. – EDN SVVOZP.

63. **Спасов, А.А.** Смещённые опиоидные анальгетики – новый класс обезболивающих средств / А.А. Спасов, Н.В. Елисеева, Ю.В. Лифанова [и др.]. – Текст : электронный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2023. – Т. 86, № 11S. – С. 139. – DOI: <https://doi.org/10.30906/ekf-2023-86s-139>.

64. **Тугаринова, В.Н.** Модификация микрометода бромсульфалеиновой пробы на экскреторную функцию печени / В.Н. Тугаринова, В.Е. Миклашевский, Г.Г. Скобцова. – Текст : непосредственный // Лабораторное дело. – 1967. – № 4. – С. 218.

65. **Трахтенберг, И.М.** Проблема нормы в токсикологии: современные представления и методические подходы, основные параметры и константы / И.М. Трахтенберг, Р.Е. Сова, В.О. Шефтель, Ф.А. Оникиенко ; под ред. И.М. Трахтенберга. – Москва : Медицина, 1991. – 208 с. – Текст : непосредственный.

66. **Хныченко, Л.К.** Фармакология производных таурина / Л.К. Хныченко, Н.С. Сапронов, П.Д. Шабанов. – Санкт-Петербург : Арт-Экспресс, 2021. – 280 с. – Текст : непосредственный.

67. **Штарева, Д.М.** Обезболивающие свойства конденсированного производного бензимидазола : дис. ... канд. фармац. наук : 14.03.06 / Штарёва Дарья Михайловна. – Волгоград, 2014. – 132 с. – EDN YOZDBF. – Текст : непосредственный.

68. **Abraham, A.D.** κ -Opioid Receptor Activation in Dopamine Neurons Disrupts Behavioral Inhibition / A.D. Abraham, H.M. Fontaine, A.J. Song [et al.]. – Text : electronic // Neuropsychopharmacology. – 2018. – No. 43(2). – P. 362–372. – DOI: 10.1038/npp.2017.133.

69. **Ahsan, H.M.** Conditioned place preference and self-administration induced by nicotine in adolescent and adult rats / H.M. Ahsan, J.B. de la Peña, C.J. Botanas [et al.]. – Text :

electronic // *Biomol Ther.* – 2014. – No. 22(5). – P. 460–466. – DOI: 10.4062/biomolther.2014.056.

70. **Akbari, E.** The effect of amitriptyline administration on pain-related behaviors in morphine-dependent rats: Hypoalgesia or hyperalgesia? / E. Akbari, E. Mirzaei, L. Rezaee [et al.] – Text : electronic // *Neurosci Lett.* – 2018. – No. 683. – P. 185–189. – DOI: 10.1016/j.neulet.2018.08.001 Epub 2018 Aug 3. PMID: 30081059.

71. **Ananthan, S.** Recent advances in structure-based virtual screening of G-protein coupled receptors / S. Ananthan, W. Zhang, J.V. Hobrath. – Text : electronic // *AAPS J.* – 2009. – No. 11 (1). – P. 178–185. – DOI: 10.1208/s12248-009-9094-3. Epub 2009 Mar 17. PMID: 19291412; PMCID: PMC2664893.

72. **Andurkar, S.V.** Tramadol antinociception is potentiated by clonidine through α_2 -adrenergic and I₂-imidazoline but not by endothelin ET(A) receptors in mice / S.V. Andurkar, L. Gendler, A. Gulati. – Text : electronic // *Eur J Pharmacol.* – 2012. – No. 683 (1–3). – P. 109–115. – DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.03.016. Epub 2012 Mar 16. PMID: 22449379.

73. **Ankier, S.I.** New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities / S.I. Ankier. – Text : unmediated // *European Journal of Pharmacology.* – 1974. – Vol. 27, Issue 1. – P. 1–4.

74. **Beck, T.C.** Therapeutic Potential of Kappa Opioid Agonists / T.C. Beck, M.A. Hapstack, K.R. Beck, T.A. Dix. – Text : electronic // *Pharmaceuticals (Basel).* – 2019. – No. 12(2). – P. 95. – DOI: 10.3390/ph12020095. PMID: 31226764; PMCID: PMC6631266.

75. **Bigoni, R.** In vitro characterization of J-113397, a non-peptide nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist / R. Bigoni, G. Calo', A. Rizzi [et al.]. – Text : electronic // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* – 2000. – No. 361(5). – P. 565–568. – DOI: 10.1007/s002100000220. PMID: 10832612.

76. **Blattner, R.** Biological Measuring Techniques / R. Blattner, H.G. Classen, H. Dehnert, H.J Döring. – – Text : electronic // *Experiments on isolated smooth muscle preparations.* – Freiburg, Germany: Hugo Sach Elektronik; 1978. – P. 4–12. [Google Scholar]

77. **Bruchas, M.R.** Kappa opioid receptor activation of p38 MAPK is GRK3- and arrestin-dependent in neurons and astrocytes / M.R. Bruchas, T.A. Macey, J.D. Lowe, C. Chavkin. – Text : electronic // *J Biol Chem.* – 2006. – No. 281(26). – P. 18081–18089. – DOI: 10.1074/jbc.M513640200. Epub 2006 Apr 28. PMID: 16648139; PMCID: PMC2096730.

78. **Bruchas, M.R.** Selective p38 α MAPK deletion in serotonergic neurons produces stress resilience in models of depression and addiction / M.R. Bruchas, A.G. Schindler, H. Shankar [et al.]. – Text : electronic // *Neuron.* – 2011. – No. 71(3). – P. 498–511. – DOI: 10.1016/j.neuron.2011.06.011. PMID: 21835346; PMCID: PMC3155685.

79. **Brüggemann, I.** Colocalization of the mu-opioid receptor and calcium/calmodulin-dependent kinase II in distinct pain-processing brain regions / I. Brüggemann, S. Schulz, D. Wiborny, V. Höllt. – Text : electronic // *Brain Res Mol Brain Res.* – 2000. – No. 85 (1–2). – P. 239–250. – URL: [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(00\)00265-5](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00265-5).

80. **Brummett, C.M.** New Persistent Opioid Use After Minor and Major Surgical Procedures in US Adults / C.M. Brummett, J.F. Waljee, J. Goesling [et al.]. – Text : electronic // *JAMA Surg.* – 2017. – No. 152 (6). – P. e170504. – DOI: 10.1001/jamasurg.2017.0504. Epub 2017 Jun 21. – Erratum in: *JAMA Surg.* – 2019. – No. 154(3). – P. 272. – PMID: 28403427; PMCID: PMC7050825.

81. **Celik, M.Ö.** Leukocyte opioid receptors mediate analgesia via Ca(2+)-regulated release of opioid peptides / M.Ö. Celik, D. Labuz, K. Henning [et al.]. – Text : electronic // *Brain Behav Immun.* – 2016. – No. 57. – P. 227–242. – DOI: 10.1016/j.bbi.2016.04.018.

82. **Chien, C.C.** Sigma antagonists potentiate opioid analgesia in rats / C.C. Chien, G.W. Pasternak. – Text : electronic // *Neurosci Lett.* – 1995. – No. 190(2). – P. 137–139. – URL: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11504-p](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11504-p).

83. **Cohen, S.P.** Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances / S.P. Cohen, L. Vase, W.M. Hooten. – Text : electronic // *Lancet.* – 2021. – No. 397 (10289). – P. 2082–2097. – DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00393-7. PMID: 34062143.

84. **Conway, S.M.** Females are less sensitive than males to the motivational- and dopamine-suppressing effects of kappa opioid receptor activation / S.M. Conway, D Puttick., S. Russell [et al.]. – Text : electronic // *Neuropharmacology.* – 2019. – No. 146. – P. 231–241. – DOI: 10.1016/j.neuropharm.2018.12.002. Epub 2018 Dec 5. PMID: 30528327; PMCID: PMC6339824.

85. **Chen, Sh.-R.** Spinal Endogenous Acetylcholine Contributes to the Analgesic Effect of Systemic Morphine in Rats / Shao-Rui Chen, Hui-Lin Pan. – Text : electronic // *Anesthesiology.* – 2001. – No. 95. – P. 525–530. – DOI: <https://doi.org/10.1097/00000542-200108000-00039>.

86. **Crush, J.** Misappropriation of the 1986 WHO analgesic ladder: the pitfalls of labelling opioids as weak or strong / J. Crush, N. Levy, R.D. Knaggs, D.N. Lobo. – Text : electronic // *Br J Anaesth.* – 2022. – No. 129(2). – P. 137–142. – DOI: 10.1016/j.bja.2022.03.004. Epub 2022 Apr 6. PMID: 35397880.

87. **Dalefield, M.L.** The Kappa Opioid Receptor: A Promising Therapeutic Target for Multiple Pathologies / M.L. Dalefield, B. Scouller, R. Bibi, B.M. Kivell. – Text : electronic // *Front Pharmacol.* – 2022. – No. 13. – P. 837671. – DOI: 10.3389/fphar.2022.837671. PMID: 35795569; PMCID: PMC9251383.

88. **D'Amour, F.E.** A method for determination of pain sensation / F.E. D'Amour, D.L. Smith. – Text: unmediated // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1941. – No. 72. – P. 74–79.
89. **Dean, L.** Diazepam Therapy and CYP2C19 Genotype / L. Dean. – Text: unmediated // *Medical Genetics Summaries* [Internet] / editors: V.M. Pratt, S.A. Scott, M. Pirmohamed [et al.]. – 2018 Dec 10 [updated 2020 Oct 15]. – Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2012 – PMID: 28520370.
90. **Dinges, H.-Ch.** Equianalgesic potency ratios of opioids used in patient-controlled analgesia: A network meta-analysis / H.-Ch. Dinges, A.-K. Schubert, G. Rücker [et al.]. – Text : electronic // *Meta-Analysis J Opioid Manag.* – 2022. – No. 18(6). – P. 567–586. – DOI: 10.5055/jom.2022.0751.
91. **Dowell, D.** CDC Clinical Practice Guideline for Prescribing Opioids for Pain, United States, 2022 / D. Dowell, K.R. Ragan, C.M. Jones [et al.]. – Text : electronic // *MMWR Recomm Rep.* – 2022. – No. 71(3). – P. 1–95. – DOI: 10.15585/mmwr.rr7103a1. PMID: 36327391; PMCID: PMC9639433.
92. **Duttaroy, A.** Analysis of muscarinic agonist-induced analgesia by the use of receptor knockout mice / A. Duttaroy, J. Gomeza, J.W. Gan [et al.]. – Text : electronic // *Neurosci Abstr.* – 2000. – No. 26. – P. 616–618. – DOI: 10.1124/mol.62.5.1084.
93. **Due, M.R.** Carbamazepine potentiates the effectiveness of morphine in a rodent model of neuropathic pain / M.R. Due, X.-F. Yang, Y.M. Allette [et al.]. – Text : electronic // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9(9). – P. e107399. – DOI: 10.1371/journal.pone.0107399.
94. **El Daibani, A.** Molecular mechanism of biased signaling at the kappa opioid receptor / A. El Daibani, J.M. Paggi, K. Kim [et al.]. – Text : electronic // *Nat Commun.* – 2023. – No. 14(1). – P. 1338. – DOI: 10.1038/s41467-023-37041-7.
95. **Ehrich, J.M.** Kappa Opioid Receptor-Induced Aversion Requires p38 MAPK Activation in VTA Dopamine Neurons / J.M. Ehrich, D.I. Messinger, C.R. Knakal [et al.]. – Text : electronic // *J Neurosci.* – 2015. – No. 35(37). – P. 12917–12931. – DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2444-15.2015.
96. **Faouzi, A.** Biased Opioid Ligands / A. Faouzi, B.R. Varga, S. Majumdar. – Text : electronic // *Molecules.* – 2020. – No. 25(18). – P. 4257. – DOI: 10.3390/molecules25184257. PMID: 32948048; PMCID: PMC7570672.
97. **Fogg, L.C.** The changes in cell morphology and histochemistry of the testis following irradiation and their relation to other induced testicular changes / L.C. Fogg, R.F. Cowing. – Text : electronic // *Cancer Res.* – 1951. – No. 11(2). – P. 81–86. – PMID: 14812431.

98. **Garzón, J.** Do pharmacological approaches that prevent opioid tolerance target different elements in the same regulatory machinery? / J. Garzón, M. Rodríguez-Muñoz, P. Sánchez-Blázquez. – Text : electronic // *Curr Drug Abuse Rev.* – 2008. – No. 1(2). – P. 222–238. – DOI: 10.2174/1874473710801020222. PMID: 19630721.
99. **Gaveriaux, C.** Identification of κ - and δ -opioid receptor transcripts in immune cells / C. Gaveriaux, J. Peluso, F. Simonin [et al.]. – Text : electronic // *FEBS Lett.* – 1995. – No. 369. – P. 272–276. – DOI: 10.1016/0014-5793(95)00766-3.
100. **Gear, R.W.** Benzodiazepine mediated antagonism of opioid analgesia / R.W. Gear, C. Miaskowski, P.H. Heller [et al.]. – Text : electronic // *Pain.* – 1997. – No. 71(1). – P. 25–29. – DOI: 10.1016/s0304-3959(97)03332-0. PMID: 9200170.
101. **Graven-Nielsen, C.S.** Opioids in the Treatment of Chronic Idiopathic Diarrhea in Humans-A Systematic Review and Treatment Guideline / C.S. Graven-Nielsen, C.S. Knoph, T. Okdahl [et al.]. – Text : electronic // *J Clin Med.* – 2023. – No. 12(7). – P. 2488. – DOI: 10.3390/jcm12072488. PMID: 37048572; PMCID: PMC10094889. Graven-Nielsen CS, Knoph CS, 2023
102. **Grechko, O.Yu.** Comparative studying of abuse potential of kappa-opioid agonist RU-1203 / O.Yu. Grechko, N.V. Eliseeva, A.A. Spasov, V.A. Anisimova. – Text : electronic // *Eropean Neuropsych. Pharm. J. (ENP).* – 2011. – No. 21(Suppl. 2). – P. 162–163. – DOI: 10.1016/S0924-977X(11)70206-1.
103. **Gross, J.D.** Role of RGS12 in the differential regulation of kappa opioid receptor-dependent signaling and behavior / J.D. Gross, S.W. Kaski, K.T. Schmidt [et al.]. – Text : electronic // *Neuropsychopharmacology.* – 2019. – No. 44(10). – P. 1728–1741. – DOI: 10.1038/s41386-019-0423-7.
104. **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 / A. Hirao, A. Imai, Y. Sugie [et al.]. – Text : electronic // *J Pharmacol Sci.* – 2008. – No. 106(3). – P. 361–368. – DOI: 10.1254/jphs.fp0071742. Epub 2008 Mar 5. PMID: 18319566.
105. **Jagla, G.** Analgesic effects of antidepressants alone and after their local co-administration with morphine in a rat model of neuropathic pain / G. Jagla, J. Mika, W. Makuch [et al.]. – Text : electronic // *Pharmacol Rep.* – 2014. – No. 66(3). – P. 459–465. – DOI: 10.1016/j.pharep.2013.11.004 Epub 2014 Apr 3. PMID: 24905524.
106. **Ji, J.** Molecular Interaction Between Butorphanol and κ -Opioid Receptor / J. Ji, W. Lin, A. Vruthula [et al.]. – Text : electronic // *Anesth Analg.* – 2020. – No. 131 (3). – P. 935–942. – DOI: 10.1213/ANE.0000000000005017.

107. **Kaski, S.W.** Potential for Kappa-Opioid Receptor Agonists to Engineer Nonaddictive Analgesics: A Narrative Review / S.W. Kaski, A.N. White, J.D. Gross, D.P. Siderovski. – Text : electronic // *Anesth Analg.* – 2021. – No. 132(2). – P. 406–419. – DOI: 10.1213/ANE.0000000000005309. PMID: 33332902; PMCID: PMC7992303.
108. **Khan, M.I.** Opioid and adjuvant analgesics: compared and contrasted / M.I. Khan, D. Walsh, N. Brito-Dellan. – Text : electronic // *Am J Hosp Palliat Care.* – 2011. – No. 28(5). – P. 378–383. – DOI: 10.1177/1049909111410298. Epub 2011 May 26. PMID: 21622486.
109. **Kukkar, A.** Implications and mechanism of action of gabapentin in neuropathic pain / A. Kukkar, A. Bali, N. Singh, A.S. Jaggi. – Text : electronic // *Arch Pharm Res.* – 2013. – No. 36(3). – P. 237–251. – DOI: 10.1007/s12272-013-0057-y. Epub 2013 Feb 24. PMID: 23435945.
110. **Lazenka, M.F.** Antinociceptive Effects of Kappa-Opioid Receptor Agonists / M.F. Lazenka. – Text : electronic // *Handb Exp Pharmacol.* – 2022. – No. 271. – P. 293–313. – DOI: 10.1007/164_2020_430. PMID: 33387069
111. **Leppert, W.** Analgesic effects of morphine in combination with adjuvant drugs in rats / W. Leppert, I. Okulicz-Kozaryn, E. Kaminska [et al.]. – Text : electronic // *Pharmacology.* – 2014. – Vol. 94 (5-6). – P. 207–213. – DOI: 10.1159/000365220. Epub 2014 Nov 8.
112. **Li, X.** Efficacy of opioid receptor modulators in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis / X. Li, B. Li, J. Zhang [et al.]. – Text : electronic // *Medicine (Baltimore).* – 2021. – No. 100(4). – P. e24361. – DOI: 10.1097/MD.00000000000024361. PMID: 33530231; PMCID: PMC7850711.
113. **Litvinov, R.A.** Influence of the kappa-opioid agonist RU-1205 compound in wide spread of doses on the effects of neuromediator analyzers: Behavioral testing / R.A. Litvinov, N.V. Eliseeva, O.Yu. Grechko, A.A. Spasov. – Text : electronic // *Clinical Research and Trials.* – 2017. – Vol. 3, No. 6. – P. 1–7. – EDN XQWEPR.
114. **Loram, L.C.** Tramadol is more effective than morphine and amitriptyline against ischaemic pain but not thermal pain in rats / L.C. Loram, D. Mitchell, M. Skosana, L.G. Fick. – Text : electronic // *Pharmacol Res.* – 2007. – No. 56(1). – P. 80–85. – DOI: 10.1016/j.phrs.2007.04.003. Epub 2007 May 1. PMID: 17572099.
115. **Lyden, J.** The United States opioid epidemic / J. Lyden, I.A. Binswanger. – Text : electronic // *Semin Perinatol.* – 2019. – No. 43(3). – P. 123–131. – DOI: 10.1053/j.semperi.2019.01.001. Epub 2019 Jan 14. PMID: 30711195; PMCID: PMC6578581.
116. **Machelska, H.** Opioid Receptors in Immune and Glial Cells-Implications for Pain Control / H. Machelska, M.Ö. Celik. – Text : electronic // *Front Immunol.* – 2020. – No. 11. – P. 300. – DOI: 10.3389/fimmu.2020.00300. PMID: 32194554; PMCID: PMC7064637.

117. **Mahmood, K.** Synthesis, characterization and biological evaluation of novel benzimidazole derivatives / K. Mahmood, Z. Akhter, M.A. Asghar [et al.]. – Text : electronic // *J Biomol Struct Dyn.* – 2020. – No. 38(6). – P. 1670–1682. – DOI: 10.1080/07391102.2019.1617783. Epub 2019 May 22. PMID: 31074356.

118. **Manjunath, A.K.** Pain-management protocol aimed at reducing opioids following total knee arthroplasty does not negatively impact patient satisfaction / A.K. Manjunath, D.A. Bloom, J.W. Fried [et al.]. – Text : electronic // *Knee.* – 2023. – Vol. 43. – P. 106–113. – DOI: 10.1016/j.knee.2023.06.003. Epub 2023 Jun 27.

119. **Margolis, E.B.** Dopaminergic cellular and circuit contributions to kappa opioid receptor mediated aversion / E.B. Margolis, A.N. Karkhanis. – Text : electronic // *Neurochem Int.* – 2019. – No. 129. – P. 104504. – DOI: 10.1016/j.neuint.2019.104504. Epub 2019 Jul 10. PMID: 31301327; PMCID: PMC6702044.

120. **Matthews, E.A.** A combination of gabapentin and morphine mediates enhanced inhibitory effects on dorsal horn neuronal responses in a rat model of neuropathy / E.A. Matthews, A.H. Dickenson. – Text : electronic // *Anesthesiology.* – 2002. – No. 96(3). – P. 633–640. – DOI: 10.1097/00000542-200203000-00020.

121. **Milligan, G.** G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function / G. Milligan. – Text : electronic // *Br J Pharmacol.* – 2009. – No. 158(1). – P. 5–14. – DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00169.x. Epub 2009 Mar 20. PMID: 19309353; PMCID: PMC2795239.

122. **Møller, P.** The comet assay: ready for 30 more years / P. Møller. – Text : electronic // *Mutagenesis.* – 2018. – No. 33(1). – P. 1–7. – DOI: 10.1093/mutage/gex046. PMID: 29325088.

123. **Nagase, H.** Research and development of κ opioid receptor agonists and δ opioid receptor agonists / H. Nagase. – Text : electronic // *Pharmacol Ther.* – 2020. – No. 205. – P. 107427. – DOI: 10.1016/j.pharmthera.2019.107427. Epub 2019 Oct 22. PMID: 31654658.

124. **Naseri, K.** Carbamazepine potentiates morphine analgesia on postoperative pain in morphine-dependent rats / K. Naseri, M. Sabetkasaei, T. Moini Zanjani, E. Saghaei. – Text : electronic // *Eur J Pharmacol.* – 2012. – No. 674 (2–3). – P. 332–336. – DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.10.026

125. **Nemmani, K.V.** Serotonin-GABA interactions in the modulation of mu- and kappa-opioid analgesia / K.V. Nemmani, J.S. Mogil. – Text : electronic // *Neuropharmacology.* – 2003. – No. 44(3). – P. 304–310. – DOI: 10.1016/s0028-3908(02)00374-x. PMID: 12604090.

126. **Ofoegbu, A.** Pharmacogenomics and Morphine / A. Ofoegbu, B.E. Ettienne. – Text : electronic // *J Clin Pharmacol.* – 2021. – Vol. 61(9). – P. 1149–1155. – DOI: 10.1002/jcph.1873.

Epub 2021 Jun 16. – Erratum in: *J Clin Pharmacol.* – 2023. – No. 63(6). – P. 747. – PMID: 33847389; PMCID: PMC8453761.

127. **Olkkola, K.T.** Midazolam and other benzodiazepines / K.T. Olkkola, J. Ahonen. – Text : electronic // *Handb Exp Pharmacol.* – 2008. – No. 182. – P. 335–360. – DOI: 10.1007/978-3-540-74806-9_16. PMID: 18175099.

128. **Paech, M.J.** Postcesarean analgesia with spinal morphine, clonidine, or their combination / M.J. Paech, T.J. Pavy, C.E. Orlikowski [et al.]. – Text : electronic // *Anesth Analg.* – 2004. – No. 98(5). – P. 1460–1466. – DOI: 10.1213/01.ane.0000111208.08867.3c. PMID: 15105231.

129. **Pang, C.S.** Effects of melatonin, morphine and diazepam on formalin-induced nociception in mice / C.S. Pang, S.F. Tsang, J.C. Yang. – Text : electronic // *Life Sci.* – 2001. – No. 68(8). – P. 943–951. – DOI: 10.1016/s0024-3205(00)00996-6. PMID: 11213364.

130. **Papathanasiou, T.** Co-administration of morphine and gabapentin leads to dose dependent synergistic effects in a rat model of postoperative pain / T. Papathanasiou, R.V. Juul, A.M. Heegaard [et al.]. – Text : electronic // *Eur J Pharm Sci.* – 2016. – No. 82. – P. 97–105. – DOI: 10.1016/j.ejps.2015.11.015. Epub 2015 Nov 21. PMID: 26610393.

131. **Pogozheva, I.D.** Homology modeling of opioid receptor-ligand complexes using experimental constraints / I.D. Pogozheva, M.J. Przydzial, H.I. Mosberg. – Text : electronic // *AAPS J.* – 2005. – No. 7(2). – P. E434–448. – DOI: 10.1208/aapsj070243. PMID: 16353922; PMCID: PMC2750980.

132. **Pugsley, M.K.** Cardiovascular actions of the kappa-agonist, U-50,488H, in the absence and presence of opioid receptor blockade / M.K. Pugsley, W.P. Penz, M.J. Walker, T.M. Wong. – Text : electronic // *Br J Pharmacol.* – 1992. – No. 105(3). – P. 521–526. – DOI: 10.1111/j.1476-5381.1992.tb09012.x. PMID: 1320979; PMCID: PMC1908472.

133. **Pugsley, M.K.** An examination of the cardiac actions of PD117,302, a κ -opioid receptor agonist / M.K. Pugsley, D.A. Saint, E.S. Hayes [et al.]. – Text : electronic // *Eur J Pharmacol.* – 2015. – No. 761. – P. 330–340. – DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.06.018. Epub 2015 Jun 15. PMID: 26086860.

134. **Pugsley, M.K.** Electrophysiological and antiarrhythmic actions of the kappa agonist PD 129290, and its R,R (+)-enantiomer, PD 129289 / M.K. Pugsley, D.A. Saint, M.P. Penz, M.J. Walker. – Text : electronic // *Br J Pharmacol.* – 1993. – No. 110(4). – P. 1579–1585. – DOI: 10.1111/j.1476-5381.1993.tb14004.x. PMID: 8306104; PMCID: PMC2175892.

135. **Quy, N.P.** Design, Synthesis and Cytotoxicity Evalufation of Substituted Benzimidazole Conjugated 1,3,4-Oxadiazoles / N.P. Quy, B.T.B. Hue, K.M. Do [et al.]. – Text :

electronic // Chem Pharm Bull (Tokyo). – 2022. – No. 70(6). – P. 448–453. – DOI: 10.1248/cpb.c22-00162. PMID: 35650042.

136. **Ragia, G.** Influence of CYP3A5 polymorphism on the pharmacokinetics of psychiatric drugs / G. Ragia, M.L. Dahl, V.G. Manolopoulos. – Text : electronic // Curr Drug Metab. – 2016. – No. 17(3). – P. 227–236. – DOI: 10.217 /1389200217666151210125831. PMID: 26651976.

137. **Resendez, S.L.** κ -Opioid receptors within the nucleus accumbens shell mediate pair bond maintenance / S.L. Resendez, M. Kuhnmuensch, T. Krzywosinski, B.J. Aragona. – Text : electronic // J Neurosci. – 2012. – No. 32(20). – P. 6771–6784. – DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5779-11.2012. PMID: 22593047; PMCID: PMC6622186.

138. **Robles, C.F.** Effects of kappa opioid receptors on conditioned place aversion and social interaction in males and females / C.F. Robles, M.Z. McMackin, K.L. Campi [et al.]. – Text : electronic // Behav Brain Res. – 2014. – No. 262. – P. 84–93. – DOI: 10.1016/j.bbr.2014.01.003. Epub 2014 Jan 18. PMID: 24445073; PMCID: PMC4073310.

139. **Rusovici, D.E.** Kappa-opioid receptors are differentially labeled by arylacetamides and benzomorphans / D.E. Rusovici, S.S. Negus, N.K. Mello, J.M. Bidlack. – Text : electronic // Eur J Pharmacol. – 2004. – No. 485(1-3). – P. 119–125. – DOI: 10.1016/j.ejphar.2003.11.078. PMID: 14757131.

140. **Santino, F.** Design of κ -Opioid Receptor Agonists for the Development of Potential Treatments of Pain with Reduced Side Effects / F. Santino, L. Gentilucci. – Text : electronic // Molecules. – 2023. – No. 28(1). – P. 346. – DOI: 10.3390/molecules28010346. PMID: 36615540; PMCID: PMC9822356.

141. **Schattauer, S.S.** Nalfurafine is a G-protein biased agonist having significantly greater bias at the human than rodent form of the kappa opioid receptor / S.S. Schattauer, J.R. Kuhar, A. Song, C. Chavkin. – Text : electronic // Cell Signal. – 2017. – No. 32. – P. 59–65. – DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.01.016. Epub 2017 Jan 11. PMID: 28088389; PMCID: PMC5779083.

142. **Spasov, A.A.** Toxic Effect of Single Treatment with Kappa-Opioid Agonist, Ru-1205 Compound, on the Neurological Status of Wild Type Mice / A.A. Spasov, O.Yu. Grechko, N.V. Eliseeva [et al.]. – Text : electronic // JSM Clinical Pharmaceutics. – 2017. – Vol. 3, no. 1. – EDN XQWKGD.

143. **Spasov, A.A.** Analgesic Activity of the Kappa Opioid Receptor Agonist – RU-1205 in Rats / A.A. Spasov, O.Yu. Grechko, D.M. Shtareva [et al.] – Text : electronic // Journal of Clinical and Health Sciences. – 2018. – Vol. 3, no. 2. – P. 13–18. – EDN YRZVUT.

144. **Spasov, A.A.** Study of aversive and p38 mapk-inhibitory properties of kappa-agonist with analgesic activity – compound RU-1205 / A.A. Spasov, E.E. Zvartau, O.Iu. Grechko

[et al.]. – Text : electronic // *Research Results in Pharmacology*. – 2020. – No. 6(3). – P. 59–65. – URL: <https://doi.org/10.3897/rrpharmacology.6.54558>.

145. **Spasov, A.A.** Pharmacokinetic properties of a new kappa-opioid analgesic RU-1205 compound at a single peroral administration / A.A. Spasov, L.A. Smirnova, O.Yu. Grechko [et al.]. – Text : electronic // *Pharmacy & Pharmacology*. – 2021;9(2). – P. 149–160. – URL: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2021-9-2-149-160>.

146. **Spasov, A.A.** Distribution, excretion and metabolic pathways of a single parenteral administration of kappa-opioid receptor agonist RU-1205 / A.A. Spasov, L.A. Smirnova, O.Iu. Grechko [et al.]. – Text : electronic // *Research Results in Pharmacology*. – 2021. – Vol. 7, no. 2. – P. 59–65. – DOI 10.3897/rrpharmacology.7.67261. – EDN OFZZOA.

147. **Spasov, A.A.** Pharmacological Properties of 2-Aminobenzimidazole Halides and Imidazo[1,2-a] Benzimidazole Derivatives / A.A. Spasov, N.A. Gurova, L.V. Naumenko [et al.] – Text : electronic // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2022. – Vol. 48, no. 2. – P. 281–291. – DOI: 10.1134/S1068162022020236. – EDN KOGIIV.

148. **Spina, E.** Clinically Significant Pharmacokinetic Drug Interactions with Carbamazepine / E. Spina, F. Pisani, E. Perucca. – Text : electronic // *Clin-Pharmacokinet*. – 1996. – Vol. 31. – P. 198–214. – URL: <https://doi.org/10.2165/00003088-199631030-00004>.

149. **Stone, L.S.** ST91 [2-(2,6-diethylphenylamino)-2-imidazoline hydrochloride]-mediated spinal antinociception and synergy with opioids persists in the absence of functional alpha-2A- or alpha-2C-adrenergic receptors / L.S. Stone, K.F. Kitto, J.C. Eisenach [et al.]. – Text : electronic // *J Pharmacol Exp Ther*. – 2007. – No. (3). – P. 899–906. – doi: 10.1124/jpet.107.125526. Epub 2007 Sep 13. PMID: 17855473.

150. **Tomić, M.** Stepanović-Petrović R. Antiepileptic drugs as analgesics/adjuvants in inflammatory pain: current preclinical evidence / M. Tomić, U. Pecikoza, A. Micov, S. Vučković. – Text : electronic // *Pharmacol Ther*. – 2018. – No. 192. – P. 42–64. – DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.06.002. Epub 2018 Jun 15. PMID: 29909236.

151. **Tsukahara-Ohsumi, Y.** SA14867, a newly synthesized kappa-opioid receptor agonist with antinociceptive and antipruritic effects / Y. Tsukahara-Ohsumi, F. Tsuji, M. Niwa [et al.]. – Text : electronic // *Eur J Pharmacol*. – 2010. – No. 647(1-3). – P. 62–67. – DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.08.012. Epub 2010 Sep 4. PMID: 20813108.

152. **Tsukahara-Ohsumi, Y.** The kappa opioid receptor agonist SA14867 has antinociceptive and weak sedative effects in models of acute and chronic pain / Y. Tsukahara-Ohsumi, F. Tsuji, M. Niwa [et al.]. – Text : electronic // *Eur J Pharmacol*. – 2011. – No. 671(1-3). – P. 53–60. – DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.09.169. Epub 2011 Sep 28. PMID: 21970808.

153. **Vakharia, P.P.** New therapies for atopic dermatitis: Additional treatment classes / P.P. Vakharia, J.I. Silverberg. – Text : electronic // *J Am Acad Dermatol.* – 2018. – No. 78(3 Suppl 1). – P. S76–S83. – DOI: 10.1016/j.jaad.2017.12.024. Epub 2017 Dec 14. PMID: 29248520. Vakharia PP, Silverberg JI, 2018

154. **Wang, S.** Historical Review: Opiate Addiction and Opioid Receptors / S. Wang. – Text : electronic // *Cell Transplant.* – 2019. – No. 28(3). – P. 233–238. – DOI: 10.1177/0963689718811060. Epub 2018 Nov 13. PMID: 30419763; PMCID: PMC6425114.

155. **Wińska, P.** Synergistic Interactions of 5-Fluorouracil with Inhibitors of Protein Kinase CK2 Correlate with p38 MAPK Activation and FAK Inhibition in the Triple-Negative Breast Cancer Cell Line / P. Wińska, O. Karatsai, M. Staniszevska [et al.]. – Text : electronic // *Int J Mol Sci.* – 2020. – No. 21(17). – P. 6234. – DOI: 10.3390/ijms21176234. PMID: 32872257; PMCID: PMC7504329.

156. **Zan, G.Y.** p38 mitogen-activated protein kinase activation in amygdala mediates κ -opioid receptor agonist U50,488H-induced conditioned place aversion / G.Y. Zan, Q. Wang, Y.J. Wang [et al.]. – Text : electronic // *Neuroscience.* – 2016. – No. 320. – P. 122–128. – DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.01.052.