

ДОКЛИНИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ К-ОПИАТНЫХ АНАЛЬГЕТИКОВ НА ОСНОВЕ ИХ НЕЙРОТОКСИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ

Иванов Д. Г., Афонькина Е. А., Лысенко Ю. Н., Хромов Р. Н., Никифоров А. С.,
Субботина С. Н., Ситников Д. К.

*ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной
медицины» Министерства обороны Российской Федерации*

Резюме

В работе разработана схема доклинического скрининга эффективности и безопасности к-опиатных анальгетиков на основе их нейротоксического профиля. Определены дозы препаратов, вызывающие 50 %, 16 % и 84 % эффект. Показана возможность скрининга эффективности и безопасности, а также возможность идентификации к-опиатных анальгетиков на основе симптомокомплекса их нейротоксического действия. Значимыми для оценки отличия к-опиатных анальгетиков от других симптомов были седация, гипотермия, диурез, при отсутствии катаlepsии и реакции Штраубе. Исследование нейротоксического профиля к-опиатных анальгетиков в эксперименте позволяет сравнивать эффективность и безопасности к-опиатных анальгетиков с целью выбора наиболее перспективных препаратов.

Ключевые слова: токсичность, к-опиатные анальгетики, доклинические исследования

PRECLINICAL SCREENING FOR THE EFFICACY AND SAFETY OF κ -OPIATE ANALGESICS BASED ON THEIR NEUROTOXIC PROFILE

Ivanov D.G., Afonkina E. A., Lysenko Y. N., Khromov R. N., Nikiforov A. S.,
Subbotina S. N., Sitnikov D. K.

*Federal State Budgetary Institution "State Research Testing Institute of Military
Medicine" of the Ministry of Defense of the Russian Federation*

Abstract

The article developed a scheme for preclinical screening of the efficacy and safety of κ -opiate analgesics based on their neurotoxic profile. Doses of drugs that cause 50%, 16% and 84% effect are determined. The possibility of screening efficacy and safety, as well as the possibility of identifying κ -opiate analgesics based on the symptom complex on their neurotoxic action. Sedation, hypothermia, diuresis, in the absence of catalepsy and the Straub reaction were significant for assessing the difference between κ -opiate analgesics and other symptoms. The study of the neurotoxic profile of opiate analgesics in the experiment allows us to compare the efficacy and safety of opiate analgesics in order to select the most promising drugs.

Key words: toxicity, κ -opiate analgesics, preclinical trials

Введение

Агонисты κ -опиатных рецепторов рассматриваются в качестве перспективных анальгетиков в связи с меньшим аддиктивным потенциалом и угнетающим влиянием на дыхание по сравнению с μ -опиатными агонистами [1, 2, 3]. Побочные эффекты, ограничивающие введение κ -опиатных агонистов в клиническую практику, проявляются в виде седации, дисфории, диуреза, моторной дискоординации [1, 2, 3], а также ложных галлюцинаций, связанных с нарушением ощущения пропорций тела и искажением тактильной чувствительности [4, 5].

Анализ каскада сигнальных реакций κ -опиатного рецептора в дорсальном ядре шва [6] и вентральной покрышке [7] обнаружил, что анальгетический эффект κ -опиатных агонистов связан с активацией G-белка ингибитора аденилатциклазы, тогда как побочные эффекты обусловлены независимой от G-белка активацией, так называемого, аррестинового пути [8]. Анализ соотношения активностей G-белка ингибитора аденилатциклазы и аррестинового пути у клеточных культур позволил выявить κ -опиатные агонисты с высокой анальгетической активностью и слабовыраженными побочными эффектами [6, 9].

При разработке к-опиатных анальгетиков возникает необходимость скрининга вновь синтезированных соединений. Однако методы исследования анальгетической активности, седации, моторной дискоординации и дисфории к-агонистов на животных являются достаточно трудоёмкими для скрининга, а исследования на клеточных культурах требуют специально оснащённой лаборатории, что усложняет разработку к-опиатных анальгетиков. Кроме этого, иногда на доклиническом этапе скрининга вновь синтезированных препаратов возникает необходимость отнесения их к тому или иному классу, что может быть сделано на основании специфических симптомов отдельных классов препаратов [10]. В связи с этим, целью настоящей работы была разработка и апробация схемы доклинического скрининга эффективности и безопасности к-опиатных анальгетиков на основе их нейротоксического профиля.

Материалы и методы

В качестве стандартных образцов для разработки схемы скрининга были выбраны BRL 52537, обладающий одинаковой способностью активировать G-белок ингибитор аденилатциклазы и аресстиновый сигнальный путь, и GR 89696, который в 5 раз сильнее активирует аресстиновый сигнальный путь, по сравнению с каскадом, реализуемым через G-белок ингибитор аденилатциклазы [11].

Исследование проводили на 187 белых беспородных крысах-самцах массой 180-220 г, полученных из питомника «Андреевка», филиал РАМН, Россия, и прошедших 14-дневный карантин. Содержание и обращение с использованными в эксперименте животными соответствовали приказу МЗССР от 01.04.2016 №199Н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Животные содержались по 6 особей в клетках 1500U Eurostandart Type IV S, Tecniplast, Италия, при температуре воздуха 20-22 °С, относительной влажности 40-60%, световом режиме 12:12 с включением света в 8.00, на стандартном корме, со свободным доступом к воде и пище.

Препараты вводили однократно в хвостовую вену в виде раствора в 0,9 % водном хлориде натрия в удельном объёме 1 мл/кг. Внутривенный способ введения был выбран с целью исключить эффекты всасывания препаратов. Введение BRL 52537 осуществляли в диапазоне доз 5-5000 мкг/кг, введение GR 89696 в дозах 0,5 – 1500 мкг/кг. Наблюдение за животными проводили, через 30 минут после введения препаратов, что соответствовало максимальному развитию наблюдаемых эффектов в предварительно проведённых экспериментах.

При каждом наблюдении регистрировали гибель животных, а также признаки нарушения двигательной и рефлекторной активности, мышечного тонуса и моторной

дискоординации, сохранности вестибулярной функции [12, 13], наличие вокализаций и пачения при касании. Исследовали тактильную чувствительность животных по сохранности периорального рефлекса [12]. Болевую чувствительность определяли в тесте «Горячая пластина» [14], анальгезией считали отсутствие болевой реакции (прыжок или облизывание задней лапы) у животных в течение 25 секунд. Оценивали влияние препаратов на вегетативные функции. В каждой группе подсчитывалось число животных с эффектом.

Ректальную температуру животных измеряли с точностью до 1 °С с использованием электронного термометра (Thermolet, США). Подсчитывали число животных с отклонением температуры тела от нормы, выше 39,0° и ниже 36,5°С.

Силу хвата передних конечностей измеряли с использованием динамометра Grip strength meter (Colombus instruments, США). Подсчитывали число животных с отклонением показателя от нормы, выше 1,723 кг и ниже 0,791 кг.

Значения нормы рассчитаны, как границы двух стандартных отклонений от среднего арифметического на выборке из 64 интактных животных.

По результатам наблюдения методом пробит-анализа [15] рассчитывались дозы препаратов, вызывающие 50 %, 16 % и 84 % эффект. Сравнение среднеэффективных анальгетических доз препаратов, а также среднеэффективных доз симптомов побочного действия с анальгетическими дозами проводили только при статистически значимой параллельности линий регрессионных зависимостей «доза-эффект». Параллельность линий оценивали с помощью z-теста, линии считали параллельными при значении z-критерия меньше 1,96 [15]. Для рассчитанных доз и отношений в скобках указывали границы 95% доверительного интервала.

Результаты и обсуждение

Введение BRL 52537 и GR 89696 вызывало симптомы, связанные с действием препаратов на структуры пирамидального (нарушение постановки лапы на опору) и экстрапирамидального (нарушение позы в виде распластывания и походки в виде ползания) трактов, базальных ганглиев (седация), на дугу спинномозговых рефлексов (рефлекс отдёргивания лапы, рефлекс подтягивания лапы), сенсорных и вставочных элементов тактильного аппарата (нарушение чувствительности перироральной области), гладкую мускулатуру мочевого пузыря (диурез). Наиболее ярко симптомы BRL 52537 и GR 89696 проявлялись через 30 минут после введения, за исключением диуреза и вокализаций. В таблице 1 приведены дозы, вызывающие 50 %, 16 % и 84 % эффект, по наиболее значимым симптомам.

**Эффективные дозы препаратов BRL 52537 и GR 89696 при внутривенном введении
белым крысам по результатам нейротоксического тестирования**

Симптом	Дозы BRL 52537, мкг/кг			Дозы GR 89696, мкг/кг		
	ЕД ₁₆	ЕД ₅₀	ЕД ₈₄	ЕД ₁₆	ЕД ₅₀	ЕД ₈₄
Седация	55,3 (12,1-252,5)	197,2 (69,1-562,4)	703,3 (201,1-2459,2)	1,6 (0,7-3,5)	5,0 (2,8-8,8)	15,8 (7,1-35,3)
Нарушение позы	68,9 (14,0-338,8)	280,6 (93,7-839,9)	1142,7 (274,3-4760,0)	1,2 (0,4-4,0)	9,2 (3,8-22,0)	69,80 (14,5-337,0)
Нарушение походки (ползание)	144,2 (30,8-676,6)	719,7 (217,2-2385,0)	3591,2 (556,1-23189,2)	4,41 (2,15-9,05)	9,4 (5,83-15,08)	19,90 (9,52-41,59)
Нарушение походки (пячение)	1524,0*	239353,3*	37591332,5*	16,7 (5,3-53,0)	35,4 (13,0-97,0)	75,2 (14,1-399,4)
Вокализация#	16,7 (0,1-4949,6)	644,8 (21,6-19251,2)	24834,1*	4,9 (1,1-22,3)	17,5 (4,8-63,5)	62,1 (6,9-557,6)
Диурез^	167,0 (36,5-763,8)	223,6 (53,5-933,8)	299,3 (65,5-1368,8)	3,9 (0,8-18,8)	12,7 (4,1-39,5)	40,9 (7,0-239,3)
Гипотермия	328,2 (17,7-6101,4)	12324,0* (50,5-3007281,9)	462742,9*	6,0 (0,9-39,3)	33,1 (4,5-244,3)	181,7 (4,2-7814,0)
Анальгезия	507,5 (105,4-2443,8)	1720,5 (452,8-6537,6)	5833,5 (635,6-53537,5)	15,8 (2,8-88,1)	34,7 (8,4-143,4)	76,3 (7,1-816,8)
Примечания: 1 -* - 95 % доверительный интервал не указан в связи с большим разбросом значений; 2 -# - для GR 89696 наличие симптома регистрировали через 10 мину после введения; 3 -^ - наличие симптома регистрировали через 2 часа после введения.						

Введение BRL 52537 и GR 89696 в указанном диапазоне доз не вызывало птоза, саливации, лакримации, изменения консистенции стула, тремора, не влияло на силу хвата, кровенаполнение сосудов кожи лап и ушей, роговичный и вращательный рефлекс, а также способность поддерживать позу при повороте таза вправо или влево. Введение BRL 52537 не влияло на абдоминальный тонус и дыхательные движения животных. GR 89696 снижал абдоминальный тонус начиная с дозы 50 мкг/кг, а также вызывал изменение частоты дыхательных движений, дыхание становилось поверхностным частым. Среднеэффективная доза по изменению частоты дыхательных движений у GR 89696 была равна 220,5 (27,7-1754,2) мкг/кг, дозы вызывающие 16 % и 84 % составили 4,7 и 10339,8 мкг/кг соответственно, угол наклона регрессионной линии $0,60 \pm 0,14$.

Выявленный симптомокомплекс BRL 52537 и GR 89696 позволяет отличить к-агонисты от анальгетиков других классов на этапе доклинического скрининга (таблица 2). В частности эффект седации отличает к-агонисты от δ -агонистов [16, 17, 18], гипотермия и диурез отличают к-агонисты от нестероидных противовоспалительных препаратов [19], а отсутствие катаlepsии и реакции Штраубе отличает к-агонисты от μ -агонистов [13] и каннабиноидов [10].

Сравнительный анализ анальгетической активности препаратов показал, что среднеэффективная доза BRL 52537 в 49,6 (17,4-141,3) раза больше, чем у GR 89696, при статистически значимой параллельности регрессионных зависимостей «доза эффект» ($z=0,14$).

Таблица 2.

Специфичность симптомокомплекса к-агонистов по результатам нейротоксического тестирования

Симптом	Класс анальгетиков				
	к-агонисты	μ -агонисты	δ -агонисты	каннабиноиды	НПВС
	BRL 52537, GR 89696	морфин [13]	AZD2327 [16], SCN 80 [17,18]	анандамид, Δ^8 -тетрагидроканнабинол [10]	Ибупрофен [19]
Анальгезия	есть	есть	есть	есть	есть
Двигательная активность	седация	седация	ажитация	седация	седация
Температура тела	гипотермия	гипотермия	гипотермия	гипотермия	нет
Катаlepsия	нет	есть	есть	есть	нет
Реакция Штраубе	нет	есть	нет	нет	нет
Диурез	есть	нет	нет	нет	нет

Сравнение среднеэффективных доз симптомов действия препаратов обнаружило, что анальгетические дозы BRL 52537 и GR 89696 больше, чем дозы вызывающие седацию, нарушение походки и позы, вокализацию и диурез (таблица 3).

Таблица 3.

Отношение среднеэффективных доз симптомов побочного действия препаратов к среднеэффективной анальгетической дозе

Симптом	BRL 52537			GR 89696		
	Наклон**	Z##	$\frac{ED_{50}^{симп}}{ED_{50}^{аналг}}$	Наклон	Z	$\frac{ED_{50}^{симп}}{ED_{50}^{аналг}}$
Анальгезия	1,88±0,66	-	-	2,90±1,29	-	-
Седация	1,80±0,46	0,01	0,12 (0,04-0,35)	1,98±0,43	0,18	0,14 (0,06-0,33)

Нарушение позы (распластывание)	1,63±0,44	0,03	0,16 (0,05-0,50)	1,13±0,27	0,39	0,26 (0,10-0,72)
Нарушение походки (ползание)	1,42±0,39	0,06	0,42 (0,13-1,36)	3,04±0,87	0,03	0,27 (0,13-0,57)
Нарушение походки (пячение)	0,45±0,38	0,22	139,1*	3,04±1,31	0,02	1,02 (0,42-2,50)
Вокализация#	0,63±0,31	0,20	0,38 (0,04-3,55)	18,1±0,71	0,22	0,51 (0,17-1,54)
Диурез^	7,85±3,23	0,31	0,13 (0,05-0,37)	1,95±0,64	0,38	0,41 (0,20-0,84)
Гипотермия	0,63±0,35	0,19	7,16 (0,14-378,33)	1,35±0,55	0,32	0,96 (0,24-3,84)
<i>Примечания:</i> 1 -* - 95 % доверительный интервал не указан в связи с большим разбросом значений; 2 -# - для GR 89696 наличие симптома регистрировали через 10 мину после введения; 3 -^ - наличие симптома регистрировали через 2 часа после введения; 4 -**- коэффициент наклона регрессионной зависимости «доза-эффект»; 5 -##- значение Z-критерия статистической значимости параллельности регрессионных линий зависимостей «доза-эффект».						

Зарегистрированные симптомы соотносятся с побочными эффектами к-агонистов, наблюдающимися у людей. В частности, к-агонист MR 2033 в течение 30 минут после внутривенного введения добровольцам в дозе 3,8 мг/кг вызывал слабость, головокружение, нарушение восприятия времени и пространства, в виде иллюзии:двигающиеся линии или стены, которые сменялись седацией [20]. Внутримышечное введение энадолина добровольцам в дозе 2,3 мкг/кг вызывало нарушение тактильного восприятия: ощущение волны, бегущей по полу, парестезии (пощипывание), озноб [21]. Спирадолин в дозе в дозе 3,2 мкг/кг внутримышечно вызывал седацию и сонливость, нарушение координации, дисфорию, скомканную речь [22]. Таким образом, обнаруженные в ходе доклинического скрининга побочные эффекты к-агонистов с высокой вероятностью могут иметь клиническое значение.

При этом, в отличие от GR 89696, среднеэффективная анальгетическая доза BRL 52537 была меньше, доз вызывающих пячение и гипотермию, что вероятно связано с различным эффектом препаратов на клеточном уровне.

Заключение

Проведенное исследование показало возможность идентификации к-опиатных анальгетиков на основе их нейротоксического профиля. Значимыми симптомами при применении к-опиатных анальгетиков у крыс являются седация, гипотермия, диурез при одновременном отсутствии каталепсии и реакции Штраубе.

Скрининг эффективности и безопасности к-опиатных анальгетиков по разработанной нами схеме позволит проводить нетрудоемкую доклиническую оценку фармакологической активности вновь синтезированных соединений и на основании специфических симптомов определять их принадлежность к тому или иному классу.

Список цитированной литературы

1. Быков В.Н., Анохин А.Г., Чепур С.В., Иванов И.М., Покровская Л.А., Назаров Г.В., Галан С.Е., Мурадов М.М. Исследование психолептических эффектов к-опиоидных агонистов // Токсикологический вестник. 2011. № 3. С. 13-16.
2. Lovell K.M., Frankowski K.J., Stahl E.L., Slauson S.R., Yoo E., Prisinzano T.E., Aubé J., Bohn L.M. Structure Activity Relationship Studies of Functionally Selective Kappa Opioid Receptor (KOR) Agonists that Modulate ERK ½ Phosphorylation While Preserving G Protein Over β-Arrestin 2 Signaling Bias // ACS Chem. Neurosci. 2015. P. 1411-1419. DOI: 10.1021/acscchemneuro.5b00092.
3. Butelman E.R., Ko M.C.H., Traynor J.R., Vivian J.A., Kreek M.J., Woods J.H. GR89,696: a potent – opioid agonist with subtype selectivity in rhesus monkeys // The journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2001. V. 298. P. 1049–1059.
4. Lemos J.C., Chavkin C. Kappa Opioid Receptor Function // The Receptors 23. The Opiate Receptors by ed. G.W. Pasternak. Springer Science+Business Media. 2011. P.265-306.
5. Walsh S.L., Strain E.C., Abreu M.E., Bigelow G.E. Enadoline, a selective kappa opioid agonist: comparison with butorphanol and hydromorphone in humans // Psychopharmacology. 2001. V.157. P.151–162.
6. Brust T.F., Morgenweck J., Kim S.A., Rose J.H., Locke J.L., Schmid C.L., Zhou L., Stahl E.L., Cameron M.D., Scarry S.M., Aubé J., Jones S.R., Martin T.J., Bohn L.M. Biased agonists of the kappa opioid receptor suppress pain and itch without causing sedation or dysphoria // Science Signaling. 2016. Vol. 9 DOI: 10.1126/scisignal.aai8441.
7. Ehrich J.M., Messinger D.I., Knakal C.R., Kuhar J.R., Schattauer S.S., Bruchas M.R., Zweifel L.S., Kieffer B.L., Phillips P.E.M., Chavkin C. Kappa Opioid Receptor-Induced Aversion Requires p38 MAPK Activation in VTA Dopamine Neurons // The journal of neuroscience. 2015. V. 35. N.37. P. 12917–12931.
8. Bruchas M.R., Chavkin C. Kinase cascades and ligand-directed signaling at the kappa opioid receptor // Psychopharmacology. 2010. V. 210. P. 137–147.
9. Dunn A.D., Reed B., Guariglia C., Dunn A.M., Hillman J.M., Kreek M.J. Structurally Related Kappa Opioid Receptor Agonists with Substantial Differential Signaling Bias:

Neuroendocrine and Behavioral Effects in C57BL6 Mice // International Journal of Neuropsychopharmacology. 2018. V. 21. N. 9. P. 847–857.

10. Fride E., Perchuk A., Hall F.S., Uhl G.R., Onaivi E.S. Behavioral Methods in Cannabinoid Research// In: Marijuana and Cannabinoid Research: Methods and Protocols/ ed. E.S. Onaivi. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 2006. P. 269–290

11. White K.L., Alex P. Sclipton, Marie-Laure Rives, Ruslan V. Bikbulatov, Prabhakar R. Polepally, Peter J. Brown, Terrance Kenakin, Jonathan A. Javitch, Jordan K. Zjawiony, and Bryan L. Roth identification of novel functionally selective κ -opioid receptor scaffolds // Mol. Pharmacol. 2014. V. 85. P. 83–90.

12. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Дж.П. Хьюстон. М.: Высшая школа. 1991. 399 с.

13. Roux, S. Primary Observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function / S. Roux, E. Sabre, R.D. Porsolt // Current protocols in pharmacology. 2004. P. 1–23.

14. Hama A., Sagen J. Sustained antinociceptive effect of cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 over time in rat model of neuropathic spinal cord injury pain // Journal of Rehabilitation Research & Development. 2009. V. 46. N. 1. P. 135–144.

15. Lei C., Sun X. Comparing lethal dose ratios using probit regression with arbitrary slopes // BMC Pharmacology and Toxicology, 2018. V. 19. P. 61

16. Hudzik T.J., Maciag C., Smith, M.A., Caccese R., Pietras M.R., Bui K.H., Coupal M., Adam L., Payza K., Griffin A., Smagin G., Song D., Swedberg M.D.B., Brown W. Preclinical pharmacology of AZD2327- a highly selective agonist of the δ -opioid receptor // ASPET Journals. 2011.

17. Jutkiewicz E.M., Eller E.B., Folk J.E., Rice K.C., Traynor J.R., Woods J.H. -Opioid agonists: differential efficacy and potency of snc80, its 3-oh (snc86) and 3-desoxy (snc162) derivatives in sprague-dawley rats // The journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2004. V. 309. P. 173–181.

18. Baker A.K., Meert T.F. Functional effects of systemically administered agonists and antagonists of μ , δ , and κ opioid receptor subtypes on body temperature in mice // The journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2002. V. 302. N. 3. P. 1253–1264.

19. Adams S.S., Bough R.G., Cliffe E.E., Lessel B., Mills R.F.N. Absorption, distribution and toxicity of ibuprofen // Toxicology and applied pharmacology. 1969. V. 15. P. 310–330.

20. Pfeiffer A., Brantl V., Herz A., Emrich H.M. Psychotomimesis mediated by κ -opiate receptors // Science. 1986. V. 233. P. 774–776.

21. Walsh S.L., Strain E.C., Abreu M.E. Bigelow G.E. Enadoline, a selective kappa opioid agonist: comparison with butorphanol and hydromorphone in humans // Psychopharmacology. 2001. V.157. P.151–162.

22. Chappell P.B., Leckman J.F., Scahill L.D., Hardin M.T., Anderson G., Cohen D.J. Neuroendocrine and behavioral effects of the selective kappa agonist spiradoline in Tourette's syndrome: a pilot study // Psychiatry res. 1993. V. 47. P. 267–280.