

**НЕЙРОТОКСИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ АГОНИСТА КАППА-ОПИОИДНЫХ
РЕЦЕПТОРОВ ИЗ КЛАССА ПРОИЗВОДНЫХ АЛКИЛЗАМЕЩЕННЫХ
ПИПЕРАЗИНОВ**

Субботина С.Н.¹, Вахвияйнен М.С.¹, Юдин М.А.^{1,2}

¹ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной
медицины» Министерства обороны Российской Федерации

195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4,

²ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава Российской Федерации, 195067, Санкт-
Петербург, Пискаревский проспект, д. 47

Резюме.

В работе проведена экспериментальная оценка нейротоксического профиля производного алкилзамещенных пиперазинов DPI-3290, являющегося высокоселективным агонистом каппа-опиоидных рецепторов с выраженными анальгетическими свойствами. Прослежена роль неопиоидных нейромедиаторных систем в механизмах токсического действия DPI-3290. Показано, что побочные эффекты производного алкилзамещенных пиперазинов определяются активирующим действием в отношении адренергической системы и блокирующим влиянием в отношении дофамин- и ГАМК-ергической нейротрансмиссии. Установлена способность DPI-3290 влиять на обратный захват дофамина за счет увеличения концентрации активного переносчика дофамина в коре больших полушарий и мозжечке, создавая дефицит внеклеточного медиатора в первые сутки после воздействия. Продemonстрировано отсутствие влияния агониста каппа-опиоидных рецепторов на системы серотонина и ацетилхолина при воздействии в дозах, не превышающих средние эффективные по развитию седации у грызунов. Полученные данные могут быть использованы при разработке новых анальгетических соединений на основе производных пиперазина. В частности, на доклиническом этапе скрининга вновь синтезированных соединений целесообразно проводить отбор агонистов каппа-опиоидных рецепторов, обладающих наименьшей активностью в отношении адрен-, дофамин- и ГАМК-ергической нейротрансмиссии.

Ключевые слова: агонист каппа-опиоидных рецепторов; производное алкилзамещенных пиперазинов; побочные эффекты; фармакологические зонды; неопиоидные нейромедиаторные системы

NEUROTOXIC PROFILE OF KAPPA-OPIOID RECEPTOR AGONIST FROM THE CLASS OF ALKYL-SUBSTITUTED PIPERAZINE DERIVATIVES

Subbotina S.N.¹, Vakhviyaynen M.S.¹, Yudin M.A.^{1,2}

¹*Federal State Budgetary Institution "State Research Testing Institute of Military Medicine" of the Ministry of Defense of the Russian Federation, St. Petersburg 195043, St Petersburg, st.*

Lesoparkovaya, 4

²*Federal State-Funded Education Institution of Higher Professional Education North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov (NWSMU), Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, 195067, St. Petersburg, Piskarevsky prospect, 47*

Summary.

The article carried out an experimental assessment of the neurotoxic profile of an alkyl-substituted piperazine derivative DPI-3290, which is a highly selective kappa-opioid receptor agonist with pronounced analgesic properties. The role of non-opioid neurotransmitter systems in the mechanisms of the toxic action of DPI-3290 was traced. It has been shown that the side effects of an alkyl-substituted piperazine derivative are determined by an activating effect on adrenergic system and blocking action against dopaminergic and GABA-ergic neurotransmission. The ability of DPI-3290 to influence the reuptake of dopamine by increasing the concentration of the active dopamine transporter in the cerebral cortex and cerebellum was established, creating a deficiency of the extracellular mediator in the first day after exposure. Demonstrated the absence of the effect of kappa-opioid receptor agonist on the serotonin and acetylcholine system when exposed to doses not exceeding the average effective for the development of sedation in rodents. The obtained data can be used in the development of new analgesic compounds based on piperazine derivatives. In particular, at the preclinical stage of screening of newly synthesized compounds, it is advisable to select kappa-opioid receptor agonists with the least activity against adrenergic, dopaminergic and GABA-ergic neurotransmission.

Key words: kappa-opioid receptor agonist; derivative of alkyl-substituted piperazines; side effects; pharmacological probes; non-opioid neurotransmitter systems

Введение.

Болевой синдром является самой распространенной причиной обращения за медицинской помощью [1]. Согласно докладом ВОЗ за 2020-2021 года, более 30 % мирового населения испытывают дефицит физической, психической, профессиональной, социальной и экономической полноценности в связи с наличием болевой симптоматики в анамнезе заболеваний [2]. Острая и хроническая боль затрагивает качество жизни миллионов людей, и

ложится тяжелым эмоциональным и экономическим бременем на общество и системы государственного здравоохранения [3].

Согласно клиническим рекомендациям, регламентирующим сопровождение лиц, страдающих болевым синдромом, для терапии умеренной и сильной боли назначают неинвазивные и пролонгированные формы лекарственных средств на основе трамадола, тапентадола, морфина, фентанила, оксикодона, бупренорфина, буторфанола, налбуфина и их комбинаций, большинство из которых обладают полным или умеренным сродством к μ -подтипу опиоидных рецепторов (МОР) [4, 5]. Широкое использование селективных агонистов μ -опиоидных рецепторов в лечебной практике обосновано их высокой эффективностью подавления нейрональной активности путей проведения болевых сигналов, но лимитирующим фактором до настоящего времени остается комплекс побочных эффектов (эйфория, зависимость, седация и угнетение дыхания), ограничивающих их применение [3].

Эти ограничения послужили поводом к поиску альтернативных обезболивающих средств, среди которых большой интерес представляют соединения, обладающие сродством к κ -опиоидным рецепторам (КОР). Агонисты КОР характеризуются высокой анальгетической активностью, низким аддиктивным потенциалом и отсутствием угнетающего влияния на дыхание в сравнении с агонистами МОР. В то же время, развитие побочных эффектов, таких как седация, дисфория, депрессия, аффективные расстройства, моторная дискоординация препятствуют внедрению этих средств в медицинскую практику [7].

Анализ каскада сигнальных реакций, реализуемых через КОР в различных зонах головного мозга, позволил обнаружить связь возникновения побочных эффектов с активацией аррестинового пути в ГАМК-ергических нейронах прилегающего ядра, коры головного мозга, гиппокампа [8, 9] и в дофаминергических нейронах вентральной покрышки [10]. Кроме того, предполагается, что выраженность и специфичность побочного действия соединений данного класса определяется общим дисбалансом неопиоидных нейромедиаторных систем, возникающим в ответ на активацию КОР [11, 12].

Анализ данных литературы указывает на то, что каппа-опиоидная система обладает молекулярными и анатомическими механизмами взаимодействия с дофаминергической, серотонинергической, глутаматергической и ГАМК системами, которые вносят значительный вклад в вероятность возникновения побочных эффектов [3]. Так, в экспериментах на мышах и крысах установлено, что активация КОР на дофаминергических нервных окончаниях приводит к снижению концентрации внеклеточного дофамина, что характерно для патогенеза дисфорических расстройств человека [9; 13]. Взаимодействие КОР с α_2 -адренорецепторами в нейронах стриатума и астроцитах, предположительно,

формирует у грызунов поведение условного избегания и неподвижности в тесте принудительного плавания, что указывает на роль этого сигнального пути в депрессивно подобных состояниях [14]. КОР-опосредованная модуляция моноаминергических путей – причина аффективных расстройств [15]. Ингибирование глутаматергических механизмов нейрональной стимуляции при пресинаптической активации КОР, предположительно, приводит к развитию диссоциативных расстройств, сопровождающихся седативными проявлениями (вялостью, апатией). Обнаружено, что активация КОР сопряжена с ингибированием ГАМК-ергической передачи, которая лежит в основе нарушений функций внимания, двигательного и эмоционального контроля (тревога, страх, депрессия) [16, 17].

Принимая во внимание высокую анальгетическую активность агонистов КОР, поиск новых соединений данного класса, обладающих низкой токсичностью, является актуальной задачей фармакологии [7, 18]. Особый интерес могут представлять производные алкилзамещенных пиперазинов, характеризующиеся высокими терапевтическими индексами и безопасностью. Вместе с тем, оценка переносимости ряда соединений указывает на большой разброс данных по степени проявления побочного действия [19].

Учитывая ключевую роль межмедиаторных механизмов в реализации токсических эффектов агонистов КОР, одним из важнейших направлений оценки переносимости и безопасности вновь синтезированных к-опиоидных анальгетиков является изучение их нейротоксического профиля методом фармакологического зондирования. Полученные данные позволяют существенно расширить представления об участии различных нейромедиаторных систем в реализации обезболивающего действия и побочных эффектов соединений с к-опиоидной активностью.

Исходя из вышесказанного, оценка нейротоксического профиля производных алкилзамещенных пиперазинов в рамках разработки перспективных анальгетических средств на основе агонистов КОР представляется актуальным направлением исследований.

Цель исследования. Методом фармакологического зондирования провести экспериментальную оценку участия неопиоидных нейромедиаторных систем в реализации неспецифического действия производных алкилзамещенных пиперазинов (на примере DPI-3290).

Материалы и методы. Исследования выполнены на половозрелых самцах белых беспородных крыс и мышей, полученных из питомника «Рапполово», Ленинградской области. Эксперименты проводили в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г № 199н). Дизайн исследования одобрен Комитетом по этике биомедицинских исследований ГНИИИ ВМ МО РФ (протокол № 15 от 28.10.2020 г.)

Исследовали эффекты специфического агониста опиоидных рецепторов DPI-3290 – производное пиперазина, обладающего δ -, μ - и κ -опиоидной активностью и отличающегося высокими значениями аффинности к КОР ($K_i=0,62\pm0,09$ nmol/L) [20]. Препарат является сильнодействующим анальгетиком и широко используется в научных исследованиях (субстанция «TargetMol», США).

Изучение нейротоксического профиля агониста КОР проводили методом фармакологического зондирования. DPI-3290 вводили в хвостовую вену животных в диапазоне доз 0,01-0,5 мг/кг. Совместно с агонистом КОР осуществляли введение фармакологических зондов (ФЗ). Препараты вводили в виде растворов (растворитель 0,9 % NaCl) в удельном объеме 1 мл/кг (для крыс) и 10 мл/кг (для мышей). В качестве ФЗ неопиоидных нейромедиаторных систем использовали следующие соединения:

- *адренергическая* – дексмететомидин (ДММ) (субстанция, Sigma Aldrich, США), диапазон исследуемых доз - 0,005-0,05 мг/кг; тест-система – крысы; путь введения - внутрибрюшинный (в/б); тест «Открытое поле»; оцениваемый параметр – параметры двигательной (пройденная дистанция (см), средняя скорость перемещения (см/с), длительность замираний (с)) и исследовательской активности (количество обследованных стоек и норок (ед.)); критерий оценки – статистически значимые изменения параметров теста в сравнении с контрольной группой (животные с введением растворителя). Регистрацию осуществляли через 30 мин после совместного введения DPI-3290 и ДММ в течение 5 мин. Оценку характера взаимодействия DPI-3290 и ДММ проводили с помощью метода изоболографического анализа. Результат лекарственного взаимодействия двух препаратов представляли путем нанесения на график точек с координатами доз, обеспечивающих достижение эффекта на уровне ED_{50} по седации. Индекс взаимодействия рассчитывали, как отношение ED_{50} , полученной при суммировании фармакологических эффектов каждого препарата в отдельности, к ED_{50} , полученной при совместном введении препаратов в эксперименте. Считали, что комбинация обладает суммирующим эффектом, если точка расположена на изоболе, индекс взаимодействия равен 1; потенцирующим (синергическим), если точка находится под изоболой, индекс взаимодействия < 1 ; взаимоподавляющим (антагонистическим), когда координаты точки находятся выше изоболы, индекс взаимодействия > 1 [21].

- *ГАМК-ергическая*: пентилентетразол (ПТЗ) (субстанция, Sigma Aldrich, США), 20 мг/кг, тест-система – крысы; путь введения - в/б; тест «Светло-темная камера»; оцениваемые параметры – время нахождения в светлом отсеке (с), количество переходов из одного отсека в другой (ед.), количество выглядываний из темного отсека (ед.), количество стоек в светлом отсеке (ед.); критерий оценки – статистически значимые отличия параметров

теста в сравнении с группой интактных животных, и группой контроля (животные с изолированным введением ПТЗ). Регистрацию осуществляли через 30 мин после совместного введения DPI-3290 и ПТЗ в течение 3 мин.

- *дофаминергическая*: апоморфин (субстанция, Sigma Aldrich, США), 0,5 мг/кг, тест-система – крысы; путь введения - подкожный (п/к); тест – «Апоморфиновая стереотипия», регистрация эпизодов стереотипии в актометре (Optovarimex, Columbus Instruments, США), оцениваемые параметры – длительность стереотипии (с), количество эпизодов стереотипии (ед.); критерий оценки - статистически значимые отличия параметров теста в сравнении с группой интактных животных, и группой контроля (животные с изолированным введением апоморфина). Регистрацию осуществляли сразу после совместного введения DPI-3290 и апоморфина в течение 60 мин. Дополнительно проводили оценку содержания дофамина и транспортера обратного захвата дофамина (DAT) в тканях головного мозга (кора больших полушарий (БП) и мозжечок) крыс методом иммуноферментного анализа (ИФА) [22] с помощью тест системы Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for dopamine (Cloud-Clone Corp., США). Сроки регистрации – 0,5 ч и 24 ч после введения DPI-3290.

- *серотонинергическая*: 5-гидрокситриптофан (5-ГТФ) (субстанция, Sigma Aldrich, США), 200 мг/кг, тест-система – мыши; путь введения - в/б; тест – «5-ГТФ-индуцированная стереотипия»; оцениваемые параметры – латентный период развития гиперкинезии (мин), количество встряхиваний (ед.); критерий оценки - статистически значимые отличия параметров теста в сравнении с группой контроля (животные с изолированным введением 5-ГТФ). Регистрацию осуществляли сразу после совместного введения DPI-3290 и 5-ГТФ в течение 15 мин.

- *М-холинергическая*: ареколин (субстанция, Sigma Aldrich, США), 25 мг/кг, тест-система – мыши; путь введения - п/к, тест «Ареколиновый тремор»; оцениваемые параметры – латентный период (мин) и длительность (мин) тремора, количество животных с признаком (ед.): критерий оценки - статистически значимые отличия параметров теста в сравнении с группой контроля (животные с изолированным введением ареколина).

- *Н-холинергическая*: никотин (субстанция, Sigma Aldrich, США), 10 мг/кг, тест-система – мыши; путь введения - п/к, тест – «Никотиновые судороги»; оцениваемые параметры – латентный период начала тремора (мин), латентный период начала судорог (мин), длительность судорог (мин), количество животных с судорогами (ед.): критерий оценки - статистически значимые отличия параметров теста в сравнении с группой контроля (животные с изолированным введением никотина).

Все полученные данные были обобщены и подвергнуты статистической обработке с использованием пакета программного обеспечения Statistica 10.0 и Excel 2010. Для анализа

данных применяли непараметрические методы статистики: для сравнения количественных показателей - критерий Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса, для качественных показателей – критерий χ^2 , для сравнения зависимых выборок – критерий Вилкоксона. Критическое значение уровня статистической значимости принимали равным 0,05. Расчёт эффективных доз проводили методом пробит-анализа по Финни.

Результаты.

Исследование роли адренергической нервной системы в механизмах неспецифического действия DPI-3290 проводили на модели опиоид-индуцированной седации у крыс в тесте «Открытое поле». Результаты оценки эффектов DPI-3290 на параметры ориентировочно-исследовательского поведения крыс представлены в таблице 1. Установлено, что DPI-3290 при в/в введении в дозах 0,05 мг/кг и более вызывает снижение двигательной и исследовательской активности у крыс, эффекты носят дозозависимый характер (таблица 1).

Таблица 1

Влияние DPI-3290 (в/в) на параметры ориентировочно-исследовательского поведения крыс в тесте «Открытое поле» (Me [Q₂₅; Q₇₅], n=6)

Доза, мг/кг	Средняя скорость см/с	Пройденная дистанция, см	Суммарная длительность замираний, с	Кол-во стоек, ед	Кол-во норок, ед	Доля крыс с нарушениями
контроль	6 [5; 7]	1714 [1295; 1990]	105 [75; 124]	18 [13; 22]	6 [4; 8]	-
0,01	8 [6; 9]	2125 [1669; 2342]	68 [57; 88]	22 [20; 25]	6 [4; 9]	0/6
0,05	6 [5; 6]	1562 [1221; 1615]	149 [112; 162]	7 [4; 9]	1 [0; 2]	1/6
0,1	4 [3; 6]	1047 [686; 1156]	178 [139; 208]	3 [0,5; 9]*	1 [0; 1]	2/6
0,5	1 [0,7; 1]*	256 [180; 279]*	249 [245; 252]*	0 [0; 0]*	0 [0; 0]*	6/6*
Примечание: * - отличия от контрольных значений статистически значимы, при $p \leq 0,05$.						

В опытных группах наблюдали уменьшение значений параметров, отражающих моторный (пройденная дистанция, средняя скорость) и исследовательский (количество заглядываний в норки, стойки) компоненты поведения в сравнении с группой контроля (при $p \leq 0,05$). Максимум изменений регистрировали в группе с введением агониста КОР в дозе 0,5 мг/кг. Поведение животных в открытом поле характеризовалось гиподинамией, низкой скоростью перемещения, длительными паузами между эпизодами двигательной активности, отсутствием исследовательского паттерна поведения. Нарушения наблюдали у всех животных в группе.

Средние эффективные дозы агониста КОР по развитию седации у крыс составили $ED_{16} - 0,04$ мг/кг, $ED_{50} - 0,20 \pm 0,065$ мг/кг, $ED_{99} - 0,44$ мг/кг.

В отдельной серии экспериментов в тесте «Открытое поле» были определены средние эффективные дозы агониста α_2 -адренорецепторов ДММ по эффекту седации у крыс при внутрибрюшинном введении. Они составили $ED_{16} - 0,013$ мг/кг, $ED_{50} - 0,02 \pm 0,004$ мг/кг, $ED_{99} - 0,030$ мг/кг.

Для установления влияния агониста КОР на адренергическую нервную систему проводили оценку взаимодействия с ДММ методом изоболографического анализа. Изоболограмма и результаты расчета индексов взаимодействия представлены на рисунке 1 и в таблице 2, соответственно.

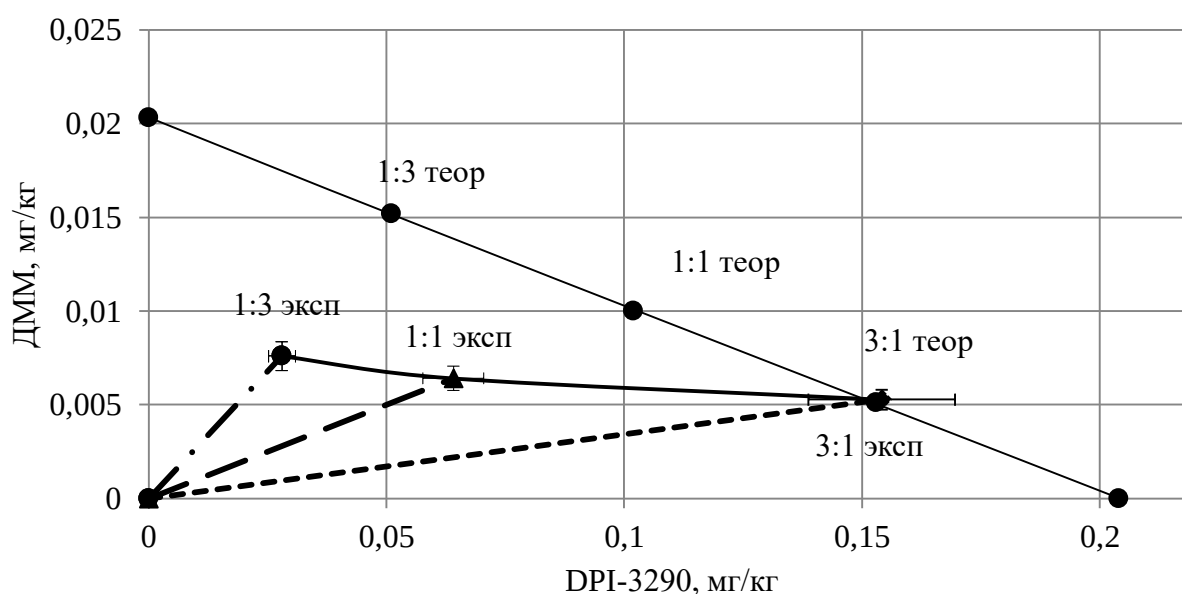


Рисунок 1 – Изоболограмма взаимодействия DPI-3290 (в/в) и ДММ (в/б) в дозах ED_{50} по эффекту седации

Таблица 2

**Значения средних эффективных доз и индексов взаимодействия при комбинировании
DPI-3290 и ДММ в различных соотношениях, (M±SEM, n=6)**

Соотношение DPI-3290 : ДММ	ЕД ₅₀ теорет	ЕД ₅₀ экспер	Индекс взаимодействия
3:1	0,158±0,084	0,159±0,076	1,01
1:1	0,112±0,065	0,070±0,027	0,63
1:3	0,066±0,014	0,033±0,008	0,50

Установлено, что при совместном введении DPI-3290 с агонистом α_2 -адренорецепторов ДММ в различных соотношениях средних эффективных доз (1:3; 1:1; 3:1) тип взаимодействия препаратов определяется как суммация и потенцирование.

При применении препаратов в соотношении 3:1 (минимальное содержание ДММ) комбинация характеризуется суммирующим эффектом (точка расположена на изоболе, значение индекса взаимодействия 1,01). Комбинации с соотношением препаратов 1:1 и 1:3 (при максимальном содержании ДММ) обладают потенцирующим (синергическим) эффектом (точки расположены ниже изоболы, значения индекса взаимодействия меньше 1). Полученные результаты свидетельствуют о тесной связи опиоидной и адренергической нейромедиации в реализации седативных эффектов агониста КОР.

Оценку участия ГАМК-ергической нервной системы при активации к-опиоидной нейротрансмиссии определяли на модели протревожного поведения крыс, вызванного введением блокатора хлорного канала ГАМК_A-рецепторов ПТЗ в дозе 20 мг/кг. Для исключения вероятности влияния DPI-3290 на моторную функцию крыс, введение агониста КОР осуществляли в дозах, не превышающих ЕД₅₀ по седации.

Было установлено, что введение ПТЗ сопровождается снижением длительности пребывания крыс в освещенном отсеке камеры, сокращением количества совершенных стоек и увеличением количества выглядываний из темного отсека (при $p < 0,05$) (таблица 3). Указанные изменения свидетельствовали об усилении тревожно-фобического состояния крыс на фоне применения ФЗ.

Таблица 3

**Влияние DPI-3290 (в/в) на параметры тревожности крыс в тесте «Светло-темная
камера» при совместном введении с ПТЗ в дозе 20 мг/кг
(Me [Q₂₅; Q₇₅], n=6)**

Группа	Время нахождения в светлом отсеке, с	Количество переходов, ед	Количество выглядываний из темного отсека, ед	Количество стоек в светлом отсеке, ед
Интактная	82 [68; 118]	5 [5; 6]	2 [0; 3]	8 [6; 9]
ПТЗ, 20 мг/кг	52 [41; 75]*	4 [3; 5]	5 [4; 17]*	3 [2; 4]*

+ DPI-3290, 0,02 мг/кг	105 [68; 143]#	2 [0,8; 3]	2 [1; 3]	2 [1,5; 2,5]
+ DPI-3290, 0,05 мг/кг	112 [101; 150]#	2 [1; 3]#	2 [0; 4]#	2 [1; 4]
+ DPI-3290, 0,1 мг/кг	128 [79; 146]#	2 [1; 2]#	1 [0,9; 2]#	2 [1; 3]
+ DPI-3290, 0,2 мг/кг	159 [120; 178]#	1 [1; 1]#	1 [0,8; 1]#	1 [0; 1] #
Примечания: 1 - * - отличия от значений интактной группы статистически значимы, при $p < 0,05$; 2 - # - отличия от значений контрольной группы (ПТЗ) статистически значимы при $p < 0,05$.				

Введение DPI-3290 в диапазоне доз 0,02-0,2 мг/кг (максимальная доза не превышает ED_{50} по седации) крысам со сформированным уровнем повышенной тревожности сопровождалось усилением тревоги. Эффект проявлялся в снижении исследовательской (количество стоек, выглядываний) и двигательной активности крыс в светло-темной камере (при $p < 0,05$). Вместе с тем, было отмечено, что время, проведенное крысами в светлом отсеке, превышает значения интактной и контрольной группы. Учитывая, значимое снижение остальных параметров теста, полученные данные могли указывать на наличие депрессивно-подобного поведения, проявляющегося в полном отказе крыс от перемещения и исследовательской деятельности на фоне совместного введения агониста КОР и блокатора ГАМК_A-рецепторов. Дополнительно проведенная оценка силы хватки (Chatillon 10 LBF Ametek, США) подтверждала, что изменения поведения животных не ассоциированы с дефицитом нейромышечной системы.

Изменение дофаминергической передачи формировали путем п/к введения крысам агониста D₂-рецепторов апоморфина. Установлено, что апоморфин в дозе 0,5 мг/кг значительно увеличивает частоту и длительность актов стереотипии у крыс (при $p < 0,05$) (таблица 4).

Таблица 4

**Влияние DPI-3290 (в/в) на апоморфин-индуцированную стереотипию
(Me [Q₂₅; Q₇₅], n=6)**

Группа	Длительность стереотипии, с	Количество эпизодов стереотипии, ед
Интактная	318 [237; 392]	224 [174; 270]
Апоморфин, 0,5 мг/кг	852 [714; 1042]*	532 [393; 643]*
+ DPI-3290, 0,02 мг/кг	911 [743; 1008]	625 [564; 645]
+ DPI-3290, 0,05 мг/кг	341 [334; 407]#	281 [278; 327]#
+ DPI-3290, 0,1 мг/кг	367 [313; 390]#	321 [283; 329]#
+ DPI-3290, 0,2 мг/кг	320 [268; 376]#	275 [235; 312]#
Примечания: 1 - * - отличия от значений интактной группы статистически значимы, при $p < 0,05$; 2 - # - отличия от значений контрольной группы статистически значимы при $p < 0,05$.		

Введение DPI-3290 в дозах 0,05-0,2 мг/кг совместно с ФЗ вызывало отмену психомоторного возбуждения, индуцированного введением агониста D₂-рецепторов. В опытных группах отмечали снижение параметров теста до интактных значений, при этом

полученные результаты статистически значимо отличались от группы контроля (животные с изолированным введением апоморфина) (при $p < 0,05$).

Таблица 5

**Влияние DPI-3290 на содержание дофамина и DAT
в структурах головного мозга крыс, (Me [Q₂₅; Q₇₅], n=6)**

Доза DPI-3290	Срок регистрации, ч	Концентрация дофамина, нг/г		Концентрация DAT, нг/г	
		Кора БП	Мозжечок	Кора БП	Мозжечок
Интактные	-	146 [131; 147]	98 [94; 102]	196 [166; 281]	200 [197; 201]
0,2 мг/кг	0,5	110 [101; 127]	123 [108; 127]	167 [143; 179]	267 [249; 282]
	24	113 [109; 131]	105 [103; 115]	228 [216; 237]*	397 [388; 423]*
0,5 мг/кг	0,5	105 [100; 123]	109 [98; 113]	259 [237; 275]*	529 [346; 942]*
	24	106 [96; 119]	108 [105; 113]	193 [184; 234]	201 [169; 216]

Примечание:* - отличия от значений интактной группы статистически значимы при $p < 0,05$.

Результаты ИФА анализа содержания дофамина и транспортера обратного захвата дофамина (DAT) в структурах головного мозга указывали на способность агониста КОР изменять уровень концентрации белка-переносчика (таблица 5). Через сутки после в/в введения DPI-3290 в дозе 0,2 мг/кг (ЕД₁₆ по седации) отмечали увеличение содержания DAT в коре БП и мозжечке крыс в сравнении с показателями интактной группы (при $p < 0,05$). Применение агониста КОР в дозе 0,5 мг/кг (ЕД₉₉ по седации) способствовало быстрому (в течение 0,5 ч) увеличению концентрации DAT в исследуемых тканях. Полученные результаты указывали на тесную взаимосвязь к-опиоидной и дофаминергической иннервации в патогенетических механизмах действия агонистов КОР.

Для изучения роли серотонинергической нейромедиаторной системы в реализации эффектов агониста КОР использовали модель 5-ГТФ-индуцированной стереотипии, внешне проявляющейся у мышей в виде частых гиперкинезов головы. Так, в/б введение ФЗ в дозе 200 мкг/кг приводило к возникновению гиперкинезии через 5 [3;5] мин после аппликации, количество эпизодов составляло 12-18 ед в течение первых 15-ти минут наблюдения (таблица 6).

Таблица 6

**Влияние DPI-3290 (в/в) на 5-ГТФ-индуцированную стереотипию у мышей
(Me [Q₂₅; Q₇₅], n=6)**

Группа	Латентный период гиперкинезии, мин	Количество встряхиваний головой, ед.
5-ГТФ, 200 мг/кг	5 [3; 5]	13 [12; 18]
+ DPI-3290, 0,04 мг/кг	4 [3; 5]	18 [9; 27]
+ DPI-3290, 0,15 мг/кг	4 [3; 5]	18 [10; 23]

Совместное введение 5-ГТФ с DPI-3290 в дозах ЕД₁₆ (0,04 мг/кг) и ЕД₅₀ (0,15 мг/кг) по седации не вызывало изменений степени выраженности гиперкинезии у мышей. В

опытных группах отмечали незначительное повышение количества встряхиваний головой, однако выявленные различия были не достоверны. Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии центрального серотонин-блокирующего/активирующего действия агониста КОР в исследуемом диапазоне доз.

Взаимодействие DPI-3290 с холинергической нервной системой изучали на мышах в тестах «ареколиновый тремор» и «никотиновые судороги». Установлено, что выраженность проявлений холинопозитивного синдрома у мышей на фоне введения агониста КОР не изменяется (таблицы 7-8). Это косвенно свидетельствовало об отсутствии влияния производных алкилзамещенных пиперазинов на холинергическую иннервацию в дозах, вызывающих седативные эффекты.

Таблица 7

**Влияние DPI-3290 (в/в) на ареколин-индуцированный тремор у мышей,
(Me [Q₂₅; Q₇₅], n=6)**

Группа	ЛП начала тремора, мин	Длительность тремора, мин	Доля животных с признаком, %
Ареколин, 25 мг/кг	1 [0,8; 1,1]	23,3 [23; 25,4]	100
+ DPI-3290, 0,04 мг/кг	0,9 [0,8; 1]	20,6 [16,5; 21,6]	83
+ DPI-3290, 0,15 мг/кг	1,3 [1,6; 1,9]	18,7 [18,1; 20,8]	100

Таблица 8

**Влияние DPI-3290 (в/в) на никотин-индуцированные судороги у мышей,
(Me [Q₂₅; Q₇₅], n=6)**

Группа	ЛП начала тремора, мин	ЛП судорог, мин	Длительность судорог, мин	Доля животных с признаком, %
Никотин, 10 мг/кг	1,7 [1,6; 1,9]	6,9 [3,3; 10]	0,5 [0; 1,5]	50
+ DPI-3290, 0,04 мг/кг	0,9 [0,7; 1,2]	5,9 [1,7; 10]	0,4 [0; 1,3]	50
+ DPI-3290, 0,15 мг/кг	1 [0,9; 1,4]	6 [1,5; 10]	0,3 [0; 0,8]	50

Обсуждение результатов.

Известно, что системная активация КОР вызывает обезболивание, аналогичное тому, которое опосредуется активацией МОР, при этом побочные эффекты агонистов КОР лишены угнетения дыхания, эйфории, физической зависимости. Эти особенности делают к-опиоидные рецепторы многообещающей лекарственной мишенью для разработки новых анальгетиков.

В ходе настоящего исследования проведена оценка нейротоксического профиля агониста КОР, относящегося к классу производных алкилзамещенных пиперазинов (DPI-3290). Интерес к указанному классу соединений обусловлен не только равнозначным с агонистами МОР анальгетическим потенциалом (ЕД₅₀=0,05±0,007 мг/кг при в/в введении крысам), но и более высокими показателями безопасности (например, индекс безопасности

для DPI-3290 по развитию гиперкапнии у крыс при применении в анальгетических дозах составляет 18,2 против 2,1 и 3,7 для морфина и фентанила, соответственно) [23]). Вместе с тем, для производных алкилзамещенных пиперазинов характерны психотические эффекты, ограничивающие их внедрение в медицинскую практику. В этой связи необходимость изучения нейротоксического профиля пиперазинов для изучения межмедиаторных взаимодействий, обуславливающих выраженность их побочного действия, становится очевидна.

Учитывая многочисленные данные литературы, где указывается, что седация является одним из универсальных признаков неспецифического действия опиоидов, изучение нейротоксического профиля агониста КОР DPI-3290 проводили на модели опиоид-индуцированной седации у грызунов, вызванной введением DPI-3290 в средних эффективных дозах. Мы предполагали, что наблюдаемая в эксперименте седация, имеет психогенную природу и вызвана вторично опосредованным дисбалансом нейромедиаторных систем.

Полученные в работе данные подтверждают тесную взаимосвязь к-опиоидной и адренергической нервной системы в реализации седативных эффектов агонистов КОР. Совместное введение ДММ и DPI-3290 приводило к потенцированию эффекта седации (индекс взаимодействия 0,5-0,63), что свидетельствовало о центральном адреномиметическом действии агониста КОР.

Установлено, что активация к-опиоидной нейромедиации влияет на функциональное состояние ГАМК-ергической системы. В эксперименте наблюдали усиление коразол-индуцированной тревоги у крыс на фоне введения агониста КОР. Учитывая доказанную роль ГАМК в интеграции тревожно-депрессивной патологии [24], подавление ГАМК-ергической системы на фоне активации КОР может являться причиной развития тревоги и депрессии как одного из признаков неспецифического действия пиперазинов.

Для получения представлений о механизмах формирования дисфории на фоне применения агонистов КОР, в работе была проведена оценка влияния исследуемого образца на систему дофамина. Так, на модели апоморфин-индуцированной стереотипии у крыс установлено блокирующее влияние агониста КОР в отношении дофаминергической иннервации. В эксперименте наблюдали уменьшение выраженности апоморфинового ответа, что указывало на снижение содержания медиатора в синаптической щели и торможение его выброса. Полученные результаты согласуются с данными литературы, где упоминается, что в отличие от возбуждающих эффектов агонистов МОР и ДОР, агонисты КОР подавляют активность нейронов дофамина [13]. Кроме того, нами было установлено стимулирующее действие DPI-3290 на обратный транспорт медиатора. Увеличение концентрации DAT в коре

БП и мозжечке через 0,5 и 24 ч после введения агониста КОР свидетельствовало об активации процессов, вызывающих дефицит дофамина в ЦНС, ввиду чего повышается вероятность появления аффективных расстройств при применении агонистов КОР.

Известно, что применение агонистов КОР может сопровождаться галлюциногенными эффектами, в основе которых лежит изменение активности серотонин-, глутамат- и холинергической нервных систем. Результаты настоящего исследования свидетельствуют об отсутствии неспецифического влияния DPI-3290 на систему серотонина. Полученные данные могут быть обусловлены воздействием DPI-3290 в низком дозовом диапазоне или отсутствием признака в спектре побочных эффектов производных алкилзамещенных пиперазинов.

В ходе определения холинергического действия DPI-3290 не было выявлено значимого влияния исследуемого образца на центральные М- и Н-холинергические звенья нейротрансмиссии. Время развития, продолжительность и частота появления признаков холинопозитивного синдрома (тремор и судороги) у животных на фоне введения DPI-3290 не изменялись. Вместе с тем, введение агонистов КОР в высоких дозах может сопровождаться появлением судорожного синдрома, рвоты, сопора и комы, что косвенно свидетельствует об активации холинергической нервной системы в ответ на воздействие опиатами. Кроме того, нарушение активности холинергической системы специфично для делириозных расстройств, а одним из возможных признаков побочного действия агонистов КОР может быть делирий. В этой связи отсутствие влияния DPI-3290 на функциональное состояние холинергической системы может быть сопряжено с удовлетворительной переносимостью соединений данного класса, либо с использованием образца в дозах, не приводящих к дисбалансу холинергической нейромедиации.

Заключение. Проведенное исследование позволило установить участие неопиодных нейромедиаторных систем в реализации побочного действия производных алкилзамещенных пиперазинов. На примере селективного агониста КОР DPI-3290, обладающего высоким анальгетическим потенциалом, подтверждено тесное взаимодействие каппа-опиоидной системы с адрен-, дофамин- и ГАМК-ергической нейромедиаторными системами, функциональное изменение которых вносит значительный вклад в реализацию побочных эффектов производных пиперазина. Для соединения DPI-3290 определено активирующее действие в отношении адренергической системы (потенцирование эффектов DPI-3290 и дексмететомидина), блокирующее влияние в отношении дофамин- (купирование апоморфиновой стереотипии) и ГАМК-ергической (усиление тревоги) нейротрансмиссии, установлена способность агониста КОР влиять на обратный захват дофамина за счет увеличения концентрации DAT в коре БП и мозжечке, усиливая дефицит внеклеточного

медиатора. Влияние экспериментального соединения на эффекты 5-ГТФ, ареколина и никотина выявлено не было.

Полученные данные могут быть использованы при разработке новых анальгетических соединений на основе производных пиперазина. Представления о механизмах неспецифического действия агонистов КОР позволят на доклиническом этапе скрининга проводить отбор соединений, обладающих наименьшей активностью в отношении адрен-, дофамин- и ГАМК-ергической нейромедиации.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miclescu A. Chronic pain patient and anesthesia // Rom J Anaesth Intensive care. 2019. Vol. 26. No. 1. P. 59-66.
2. Cohen S.P., Vase L., Hooten W.M. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances // The Lancet. 2021. Vol. 397. P. 2082-2097.
3. Al-Hasani R., Bruchas M.R. Molecular mechanisms of opioid-receptor signaling and behavior // Anesthesiology. 2011. Vol. 115. P. 1363-1381.
4. Когония Л.М., Новикова Г.А., Орлова Р.В. и др. Практические рекомендации по лечению хронического болевого синдрома у взрослых онкологических больных // Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO. 2021. Том 12. С. 182-202.
5. Mills S.E., Nicolson K.P., Smith B. H. Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies // British journal of anesthesia. 2019. Vol. 123. No. 2. P. 273-283.
6. Laing R.J., Dhaka A. ThermoTRPs and pain // Neuroscientist. 2016. Vol. 22. No. 2. P. 171-187.
7. Lovell K.M., Frankowski K.J., Stahl E.L. et al. 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.
8. Brust T.F., Morgenweck J., Kim S.A. et al. 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.
9. Bruchas M.R., Land B.B., Aita M. et al. Stress-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation mediates opioid dependent dysphoria // The journal of neuroscience. 2007. Vol. 27. No. 43. P. 11614-11623.
10. Ehrich J.M., Messinger D.I., Knakal C.R. Kappa opioid receptor-induced aversion requires p38 MAPK activation in VTA dopamine neurons // The journal of neuroscience. 2015. Vol. 35. No. 37. P. 12917-12931.
11. Ona A.G., Sampedro F., Romero S. et al. The kappa opioid receptor and the sleep of reason: cortico-subcortical imbalance following Salvinorin // International Journal of Neuropsychopharmacology. 2022. Vol. 25. No. 1. P. 54-63.
12. Beardsley P.M., Howard J.L., Shelton K.L. Differential effects of the novel kappa opioid receptor antagonist, JDTic, on reinstatement of cocaine-seeking induced by footshock stressors vs cocaine primes and its antidepressant like effects in rats // Psychopharmacology. 2005. Vol. 183. No. 1. P. 118-126.

13. Karkhanis A.N., Rose J.H., Weiner J.L. Early-life social isolation stress increases kappa opioid receptor responsiveness and downregulates the dopamine system // *Neuropsychopharmacology*. 2016. Vol. 41. P. 2263-2274.
14. Pliakas A.M., Carlson R.R., Neve R.L. Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens // *J Neurochem*. 2001. Vol. 15. No. 21. P. 7397-73403.
15. Bals-Kubik R. Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioid as mapped by the conditioned place preference paradigm in rats // *J Pharmacol Exp Ther*. 1993. Vol. 264. No. 1. P. 486-495.
16. Pina M.M., Pati D., Hwa L.S. et al. The kappa opioid receptor modulates GABA neuron excitability and synaptic transmission in midbrainprojections from the insular cortex // *Neuropsychopharmacology*. 2020. Vol. 165. P. 1-25.
17. Карпова М.Н., Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю. Влияние однократного введения пентилентетразола в субсудорожных и судорожных дозах на острую боль у крыс линии Вистар // *Российский журнал боли*. 2019. Т. 17. № 3. С. 18-21.
18. Dunn A.D., Reed B., Guariglia C., et al. Structurally related kappa opioid receptor agonists with substantial differential signaling bias: neuroendocrine and behavioral effects in C57BL6 mice // *International journal of neuropsychopharmacology*. 2018. Vol. 21. No. 9. P. 847-857.
19. Чепур С.В., Галан С.Е., Вахвияйнен М.С. и др. Экспериментальная оценка токсикометрических показателей и анальгетической активности агонистов каппа-опиоидных рецепторов // *Токсикологический вестник*. 2020. Т.4 № 163. С.27-33.
20. Shou-Pu Y., Qing-Hong K., Yu-Lei L. The opioid receptor triple agonist DPI-125 produces analgesia with less respiratory depression and reduced abuse liability // *Acta Pharmacol Sinica*. 2017. Vol. 38. No. 7. P. 977-989.
21. Soerensen H., Cedergeen N., Skovgaard I.M. An isobole-based statistical model and test synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments // *Environmental and Ecological Statistics*. 2007. Vol. 14. No. 4. P. 383-397.
22. Иммуноферментный анализ / Ред. Т.Т. Нго, Г. Ленхофф. М.: Мир, 1988. 446 с.
23. Gengo P.J., Pettit H.O., O'Neill S.J. et al. DPI-3290 [(+)-3-3((alpha-R)-alpha-((2S,5R)-4-Allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-hydroxybenzyl)-N-(3-fluorophenyl)-N-methylbenzamide]. II. A mixed opioid agonist with potent antinociceptive activity and limited effects on respiratory function // *J Pharmacol Exp Ther*. 2003. Vol.307. N. 3. P. 1227-1233. DOI:10/1124/jpet.103.054429.

24. Калусев А.В., Натт Д. Дж. О роли ГАМК в патогенезе тревоги и депрессии // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2004. Т. 67. № 4. С. 71-76.
25. Ranganathan M.D., Schnakenberg A., Skosnik P. et al. Dose-related behavioral, subjective, endocrine and psychophysiological effects of the kappa opioid agonist salvinorin A in humans // Biol Psychiatry. 2021. Vol.72. N. 10. P. 871-879.