

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

На правах рукописи

РАЩЕНКО АНДРЕЙ ИГОРЕВИЧ

**ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО
ОБЕЗБОЛИВАЮЩЕГО СРЕДСТВА ПРОИЗВОДНОГО
ИМИДАЗОБЕНЗИМИДАЗОЛА**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология.

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель
Академик РАН
Заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук,
профессор А.А. Спасов

ВОЛГОГРАД 2014

Сокращения:

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ЦНС – центральная нервная система

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

κ, κарра, КОР – каппа-опиоидные рецепторы

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	6
Глава 1. Фармакология каппа-опиоидных препаратов. Фармакокинетика агонистов каппа-опиоидных рецепторов (обзор литературы)	13
1.1 Фармакологические свойства каппа-опиоидных средств.....	15
1.2 Фармакокинетические свойства каппа-агонистов.....	26
Глава 2. Материалы и методы исследования	31
2.1 Материалы исследования.....	31
2.2 Методы исследования.....	33
2.2.1 <i>Хроматографические методы количественного определения соединения РУ-1205 в органах и тканях животных</i>	33
2.2.2 <i>Методы экстракции соединения РУ-1205 из биологического материала</i>	33
2.2.3 <i>Схемы проведения фармакокинетических исследований</i>	34
2.2.4 <i>Схема проведения биофармацевтических исследований</i>	36
2.2.5 <i>Расчеты фармакокинетических параметров</i>	37
2.2.6 <i>Методы статистической обработки</i>	39
Глава 3. Экспериментальная фармакокинетика соединения РУ-1205	40
3.1 Валидационные параметры методов ВЭЖХ, используемых для определения соединения РУ-1205.....	40
3.2 Линейность фармакокинетических свойств.....	44
3.3 Фармакокинетические свойства соединения РУ-1205 при внутривенном введении.....	44
3.3.1 <i>Фармакокинетика в плазме крови крыс</i>	44
3.3.2 <i>Распределение в органах и тканях крыс</i>	46
3.3.3 <i>Экскреция</i>	47
3.4 Фармакокинетические свойства соединения РУ-1205 при пероральном введении.....	49
3.4.1 <i>Фармакокинетика в плазме крови крыс</i>	49
3.4.2 <i>Распределение по органам и тканям крыс</i>	50

3.4.3 Экскреция	51
3.5 Фармакокинетические свойства соединения РУ-1205 при подкожном введении.....	53
3.5.1 Фармакокинетика в плазме крови крыс.....	53
3.5.2 Распределение по органам и тканям.....	54
3.5.3 Экскреция	55
3.6. Зависимость фармакокинетических свойств от фармакодинамики.....	56
3.6.1 Зависимость фармакодинамических свойств от фармакокинетики при пероральном введении.....	56
3.6.2 Зависимость фармакодинамических свойств от фармакокинетики при подкожном введении.....	58
3.7 Метаболизм соединения РУ-1205.....	59
3.7.1 Определение путей метаболизма соединения РУ-1205 <i>in silico</i>	59
3.7.2 Ферментативный, щелочной и кислотный гидролиз.....	61
3.7.3 Взаимодействие соединения РУ-1205 с тест-субстратами некоторых изоформ CYP450.....	61
3.8. Заключение.....	62
Глава 4 Исследование фармакокинетических свойств соединения РУ-1205 в виде лекарственных форм.....	65
4.1 Относительная биодоступность твердых лекарственных форм соединения РУ-1205.....	65
4.1.1. Относительная биодоступность таблеток, покрытых оболочкой, соединения РУ-1205.....	65
4.1.2 Относительная биодоступность капсул соединения РУ-1205.....	67
4.1.3 Межвидовые различия фармакокинетических свойств соединения Ру-1205 при пероральном пути введения.....	69
4.2 Относительная биодоступность инъекционной лекарственной формы соединения РУ-1205.....	71
4.2.1 Относительная биодоступность инъекционной лекарственной формы соединения РУ-1205 при внутривенном пути введения.....	71

<i>4.2.2. Межвидовые различия фармакокинетических свойств соединения Ру-1205 при внутривенном пути введения.....</i>	<i>73</i>
<i>4.2.3 Относительная биодоступность инъекционной лекарственной формы соединения РУ-1205 при подкожном пути введения.....</i>	<i>74</i>
4.3 Заключение.....	76
Глава 5 Обсуждение результатов.....	79
Выводы.....	90
Список используемой литературы.....	92

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Наиболее часто в клинической практике используют наркотические обезболивающие препараты, которые неселективно действуют на различные подтипы опиоидных рецепторов. Однако, данные средства обладают рядом серьезных нежелательных реакций, таких как: развитие пристрастия и привыкания, эйфория, угнетение дыхательного центра, обстипация и седация. Следует отметить, что при длительном использовании опиоидных анальгетиков развивается толерантность к обезболивающему эффекту, что в итоге приводит к необходимости повышать дозу применяемого препарата, а их свойство вызывать физическую и психическую зависимость может стать причиной сложной социальной адаптации после окончания терапии [Savage S.R., Kirsh K. L. et al, 2008]. В связи с этим, большое значение имеет разработка опиоидных обезболивающих средств, не вызывающих побочные эффекты, которые развиваются при активации μ -рецепторов [Kivell B., Prisinzano T.E., 2009]. К подобным веществам относятся соединения, обладающие каппа-агонистической активностью [Guzman D.S. 2011].

В результате исследований, проведенных на базе ВолгГМУ совместно с НИИ ФОХ Южного федерального университета, были выявлены вещества с каппа-агонистическими свойствами [Спасов А.А., Гречко О.Ю., 2007, Елисеева Н.В, 2011], одно из которых - конденсированное производное морфолиноэтилимидазобензимидазола под лабораторным шифром РУ-1205, проявляет антиноцицептивные свойства и характеризуется агонистической активностью по отношению к каппа-опиоидным рецепторам [Спасов А.А. и др., 2013]. Так, было установлено, что в анальгетических тестах соединение РУ-1205 развивает обезболивающий эффект, ингибируемый специфическим блокатором каппа-опиоидных рецепторов – норбиналторфимином и неспецифическим блокатором опиоидных рецепторов – налоксоном.

Необходимо отметить, что для оценки фармакодинамических параметров новых лекарственных препаратов, принципиально важно знать их

фармакокинетические свойства, такие как всасывание, распределение по органам и тканям, метаболизм и выведение [Каркищенко Н.Н. и др., 2001]. Знание данных процессов позволяет дать объективную оценку связи концентрации лекарственных веществ в крови с величиной и продолжительностью терапевтического действия, что может иметь большое значение для обоснованной разработки схем дозирования нового лекарственного средства и их корректировки [Смирнова Л.А. 2004].

Данная работа является продолжением серии исследований фармакологических свойств соединения РУ-1205 и представляет собой экспериментальное изучение его фармакокинетических свойств при внутривенном, пероральном и подкожном введении в виде субстанции и лекарственных форм.

Степень разработанности. Применяемые в клинической практике опиоидные анальгетики характеризуются рядом нежелательных побочных эффектов, таких как: развитие пристрастия и привыкания, эйфория, угнетение дыхательного центра и др. Создание обезболивающих средств, лишенных данных побочных реакций, остается актуальной задачей. Подобные препараты создаются на основе агонистов каппа-опиодных рецепторов. На сегодняшний день на российском фармацевтическом рынке отсутствуют отечественные аналоги таких лекарственных средств. Кроме того, зарубежные каппа-агонисты (буторфанола тартрат, пентазоцин) обладают низкой биодоступностью при пероральном введении и применяются в основном в виде инъекций.

Цель исследования. Исследование фармакокинетических свойств нового обезболивающего вещества РУ-1205 и его лекарственных форм.

Задачи исследования

1. Разработать метод количественного определения соединения РУ-1205 в биологическом материале.
2. Изучить фармакокинетические свойства исследуемого вещества в плазме крови крыс при внутривенном пути введения.

3. Исследовать фармакокинетические свойства соединения РУ-1205 при пероральном пути введения. Рассчитать значение абсолютной биодоступности.

4. Определить фармакокинетические свойства исследуемого вещества при подкожном введении. Рассчитать значение абсолютной биодоступности.

5. Исследовать распределение соединения РУ-1205 по органам и тканям крыс.

6. Изучить процессы экскреции субстанции соединения РУ-1205.

7. Определить взаимосвязь между фармакокинетическими и обезболивающими свойствами исследуемого вещества.

8. Исследовать возможный метаболизм соединения РУ-1205 *in silico*, а также *in vivo* по результатам взаимодействия изучаемого вещества со специфическими тест-субстратами цитохромов Р450.

9. Изучить фармакокинетические свойства таблеток, покрытых оболочкой, капсул соединения РУ-1205 при пероральном введении и его лиофилизата при внутривенном и подкожном путях введения. Рассчитать относительную биодоступность лекарственных форм изучаемого вещества.

Научная новизна. Впервые разработан метод количественного определения соединения РУ-1205 в биологических тканях, исследованы фармакокинетические свойства при внутривенном, пероральном и подкожном путях введения у крыс, при этом определены основные параметры распределения и элиминации изучаемого вещества. Впервые были рассчитаны величины абсолютной биодоступности соединения при внесосудистых путях введения были изучены возможные процессы биотрансформации производного имидазобензимидазола. Впервые экспериментально определена зависимость фармакодинамических свойств соединения РУ-1205 от его фармакокинетики в плазме крови, оценены фармакокинетические свойства таблеток, покрытых оболочкой, капсул при пероральном пути введения, а также лиофилизата при внутривенной и подкожной инъекции соединения РУ-1205. Определены

параметры относительной биодоступности лекарственных форм изучаемого вещества

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены данные о фармакокинетических процессах соединения РУ-1205 в организмах крыс и кроликов. Установлены принципиальные параметры – абсолютная биодоступность субстанции изучаемого вещества и относительная биодоступность его лекарственных форм при внутривенном, пероральном и подкожном путях введения. Определена взаимосвязь между фармакокинетическими и антиноцицептивными свойствами соединения РУ-1205, а также получены данные о возможных путях его метаболизма.

Методология и методы исследования. Согласно поставленным задачам выбраны современные методические подходы, имеющиеся в ВолгГМУ. В качестве объекта исследования использованы субстанция соединения РУ-1205 и его лекарственные формы, представленные в виде таблеток, покрытых оболочкой, капсул, а также лиофилизата. Основные методы исследования: физико-химический - высокоэффективная жидкостная хроматография (изучение количественного содержания исследуемого вещества в биологическом материале); исследование конкурентного взаимодействия соединения РУ-1205 со специфическими тест-субстратами цитофхромов P450; компьютерный метод *in silico* (прогноз возможных метаболитов изучаемого вещества), статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработан метод количественного определения соединения 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола под лабораторным шифром РУ-1205 в биологическом материале. Изучаемое вещество определяется на хроматографе с УФ-детектором при длине волны 205 нм. Температура термостатирования колонки 50 °С. Мобильная фаза: ацетонитрил:КН₂РО₄ (рН=5,0) 1:1 (v:v). Скорость потока мобильной фазы – 1 мл/мин. При этом чувствительность метода составила - 0,5 мкг/мл. Средняя

ошибка измерения – 11,85 %, а воспроизводимость и повторяемость метода 15 % и 20 % соответственно;

2. При внутривенном введении в дозе 10 мг/кг соединение РУ-1205 циркулирует в плазме крови крыс на протяжении 12 часов. Установлено, что пик концентрации наблюдается через 5 минут после введения и составляет 1,58 мкг/мл. Экскретируется преимущественно почками на протяжении 72 часов;

3. При пероральном введении в дозе 50 мг/кг изучаемое вещество наблюдается в плазме крови крыс на протяжении 12 часов. Выявлено, что максимальная концентрация наблюдается через 1 час после начала эксперимента и составляет 1,04 мкг/мл. Величина абсолютной биодоступности при данном пути введения у крыс составляет 37,34 %. Выводится преимущественно через почки в течение 96 часов;

4. При подкожном введении в дозе 50 мг/кг соединение РУ-1205 циркулирует в плазме крови крыс на протяжении 12 часов. Максимальная концентрация наблюдается через 30 минут после введения и составляет 10,20 мкг/мл. Величина абсолютной биодоступности при подкожной инъекции составляет 49,02 %. Экскретируется в основном почками на протяжении 72 часов;

5. Время достижения максимальной концентрации соединения РУ-1205 в крови крыс опережает время наступления максимального обезболивающего эффекта при пероральном введении на 3 часа и при подкожном – на 30 минут;

6. Относительная биодоступность для лекарственных форм соединения РУ-1205 составила: для таблеток, покрытых оболочкой - $105,3 \pm 11,70$ %; для капсул - $109,53 \pm 6,76$ %; для лиофилизата при внутривенном введении - $98,72 \pm 8,72$ %; для лиофилизата при подкожном введении - $81,94 \pm 10,12$ %.

Внедрение результатов исследования. Данные о фармакокинетических и фармакодинамических свойствах нового агониста к-опиоидных рецепторов используются в лекционном материале на кафедре фармакологии, кафедре

фармакологии и биофармации ФУВ, кафедре фармацевтической химии Волгоградского государственного медицинского университета,. В работе НИИ фармакологии ВолгГМУ, Волгоградского научного медицинского центра применяется метод количественного определения соединения РУ-1205.

Связь темы исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена по ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» в рамках госконтракта № 11411.1008700.13.090 от 13.09.2011 по теме «Доклинические исследования лекарственного средства с каппа-опиоидной агонистической активностью на основе производного имидазобензимидазола».

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментальных исследований, выполненных на большом количестве крыс и кроликов. Используются современные методы и методические подходы для изучения фармакокинетических процессов, высокотехнологичное оборудование (ВЭЖХ), а также выбраны адекватные критерии для статистической обработки результатов с использованием параметрических и непараметрических критериев.

Основные положения диссертации представлены на IV съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 2012); IV Всероссийском научно-практическом семинаре для молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств», Волгоград 2012; первой всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (Москва, 2013); XVIII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области, 2013 г.; 70,71,72-й итоговой научных конференциях студентов и молодых ученых Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград 2012, 2013, 2014 гг.; IV Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов

с международным участием «молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2014).

По теме диссертации опубликовано 16 работ, в том числе 3 в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных Минобрнауки РФ.

Личный вклад автора.

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ зарубежных и отечественных источников литературы по теме: «Фармакодинамика и фармакокинетика каппа-агонистов». Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования по изучению фармакокинетических свойств нового конденсированного производного бензимидазола – соединения РУ-1205: решения поставленных задач, обсуждения результатов, разработке практических рекомендаций. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований на всех его этапах. При написании диссертационной работы автором лично выполнен сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, оформление рукописи.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 107 страницах машинописного текста и состоит из введения, 5 глав, выводов и списка литературы, включающего отечественные и зарубежные источники. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 20 рисунками.

ГЛАВА 1. ФАРМАКОДИНАМИКА И ФАРМАКОКИНЕТИКА АГОНИСТОВ КАППА-ОПИОДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Купирование болевого синдрома является ключевым фактором в современной медицине [Reid K.J., Harker J. et al, 2011]. Несмотря на наличие значительного количества анальгетических препаратов, до сих пор не решен вопрос эффективного и безопасного лечения боли [Richards N., McMahon S.B.].

В клинической практике наиболее часто применяют опиоидные антиноцицептивные средства [Katz N., Benoit C.]. Каудилл-Слосберг один из первых продемонстрировал что применение опиоидов выросло в два раза с 8% в 1980 году до 16% в 2000 году [Caudill-Slosberg M.A., Schwartz L.M., Woloshin S. Et al. 2004]. В другом исследовании выявлено, что в 2007 году рецептов на опиоиды было выписано 29 % взрослого населения США [Centers for Disease Control and Prevention. Adult use of prescription opioid pain medications, 2010]. В США с 1999 по 2010 год применение морфина выросло с 96 мг до 710 мг на человека [Laxmaiah M., et al., 2012]. Однако, в результате исследований было обнаружено, что 40% послеоперационных больных сообщали о неполном облегчении боли при приеме опиоидов, а половина пациентов с неизлечимыми заболеваниями имели умеренную или сильную боль во время последних дней жизни [Brennan F., Daniel B. Carr, M. Cousins, 2007]. Недостаточная анальгезия при использовании наркотических обезболивающих средств часто происходит из-за намеренного применения заниженных доз. Это связано с возможным развитием наркомании или из-за присутствия типичных побочных эффектов, характерных для данных препаратов [Kaye A.M., Kaye A.D., Lofton E.C., 2013]. Наркотические анальгетики обеспечивают облегчение боли через действие на мю, каппа и/или дельта рецепторы, которые распределены по центральной и периферической нервной системе. Активация каждого из типов рецепторов характеризуется развитием специфических реакций. Так, например, при активации μ -опиодных рецепторов характерны следующие эффекты: анальгезия, седативный, противокашлевый эффекты, эйфория, зависимость, угнетение

дыхания, миоз, запор [Lahmaiah M., et al., 2012; Плелинцев М., 2012]; при активации каппа-рецепторов – аналгезия, седативный эффект, дисфория, миоз, менее выраженное, чем у мю-агонистов, угнетение дыхательного центра [Плелинцев М., 2012; Carlezon W.A. Jr. Et al., 2009]; и при активации дельта-опиоидных рецепторов – аналгезия, стимуляция дыхания, дисфория, галлюцинации и тахикардия [Плелинцев М., 2012]. Наиболее часто в клинической практике используют препараты, которые неселективно действуют на опиоидные рецепторы [Seddon R. Savage et al, 2008]. Однако, активация μ -рецепторов вызывает ряд серьезных побочных эффектов (табл 1.1) – наркотический потенциал, эйфория, тошнота, рвота, головокружение, седативный эффект, когнитивные дисфункции, зуд, потливость, обстипация и респираторная депрессия [Lahmaiah M., Salahadin A., Sairam At. et al. 2012]. Последний связан с непосредственным влиянием наркотических анальгетиков на дыхательный центр. Респираторные депрессии характеризуются снижением объема вдыхаемого воздуха, урежением частоты дыхания и гипоксией [Shahrokh C. Bagheri, 2014]. Существуют серьезные доказательства того, что даже низкие дозы морфина - 40 мг или 50 мг в сутки могут вызвать передозировку и привести к летальному исходу [Lahmaiah M., Salahadin A., 2012]. С этим связано почти 15 000 летальных исходов в год, число которых возросло с увеличением количества выписываемых рецептов на опиоидные анальгетики [Manchikanti et al. 2012].

Существует также значительная обеспокоенность по поводу опиоидной зависимости и толерантности.[Brennan F., Daniel B., Carr M. Cousins, 2007]. При длительном использовании наркотических анальгетиков развивается привыкание к обезболивающему эффекту, что в итоге приводит к необходимости повышать дозу применяемого препарата [Seddon R. Savage et al, 2008]. Физическая зависимость проявляется в результате резкого прекращения поступления вещества в организм, при снижении его концентрации в крови или при использовании антагониста [ASAM, 2001].

Таблица 1.1

Побочные эффекты, характерные для неселективных агонистов опиоидных рецепторов (Источник: Канадское руководство по эффективному и безопасному использованию опиатов при хронической неонкологической боли. 2010)

Побочные эффекты	Количество исследований	Встречаемость в группе опиоидов	Встречаемость в плацебо группе
Тошнота	38	28%	9%
Запор	37	26%	7%
Сонливость	30	24%	7%
Головокружение	33	18%	5%
Зуд	25	15%	2%
Рвота	23	15%	3%

По сравнению с агонистами мю-опиоидных рецепторов, у каппа-агонистов реже встречаются такие побочные эффекты как: дыхательная депрессия, и тошнота, а также для них не характерна зависимость [Seddon R. Savage, M.D..et al., 2008]. По мнению ряда исследователей именно каппа-рецепторная система является самой перспективной с точки зрения клинической проблемы боли и ее облегчения [Елисеева Н.В., 2010].

1.1. ФАРМАКОДИНАМИКА КАППА-ОПИОИДНЫХ АГОНИСТОВ

По литературным данным [Smith H.S. 2012; Осипова Н.А. 1998] агонисты каппа-опиоидных рецепторов вызывают развитие целого ряда фармакологических реакций, в том числе и анальгетический ответ.

По литературным данным [Aldrich V.J. 2009] выраженность анальгетического эффекта агонистов каппа-опиоидных рецепторов зависит от типа раздражителя. Максимальный эффект наблюдается при воздействии на организм механических и химических раздражителей. Однако, при тепловом воздействии наблюдается наименьшее развитие обезболивания. Агонисты каппа-опиоидных рецепторов обладают также противовоспалительной активностью и эффективны при артрите [Kaye A.M. 2013; Bileviciute-Ljungar, I. 2006]. Следует отметить, что на развитие антиноцицептивного эффекта каппа-

агонистов существенное влияние оказывает половой признак, однако, при купировании воспалительных реакций отличий установлено не было [Walker J.S. 2003]. Также установлено, что данные препараты оказывают мощное обезболивающее действие при развитии висцеральной боли [Riviere P.J. 2004].

Активация каппа-опиоидных рецепторов также приводит к развитию противозудного [Inan S. 2004], диуретического эффектов [Barber A. 1997; DeHaven-Hudkins D.L. 2004], нейропротекторного действия [Tortella F.C. 1994] и модуляции иммунного ответа [McCarthy L. 2001], а также подавление ВИЧ-1 экспрессии [Peterson P.K., 2001]. Агонисты каппа-опиоидных рецепторов могут использоваться в качестве средств, снижающих последствия абстинентного синдрома после приема морфина [Munro T.A. 2012]. Однако, наличие дисфории и седации у данных препаратов (U-50,488, спирадолин, бремазоцин и др.) ограничивает их клиническое использование [Pfeiffer A. 1987, Mello N.K. 2000].

Важно отметить, что каппа-агонисты снижают мезолимбический уровень дофамина и, тем самым, могут использоваться в качестве антагонистов кокаина. Таким образом, данные препараты являются потенциальными средствами для лечения наркоманий [Mello N.K. 2000]. Однако, следует отметить, что применение каппа-агонистов в качестве антинаркотических средств целесообразно только в случае купирования острой тяги к кокаину. Это обусловлено тем, что при хроническом приеме лигандов каппа-рецепторов возможно развитие реакций, подобных тем, которые вызывает кокаин [McLaughlin J.P. 2005, Negus S.S. 2004].

На сегодняшний день разработан целый ряд лигандов каппа-опиоидных рецепторов. Однако из селективных агонистов данных рецепторов ни один препарат не нашел применения в клинической практике [Aldrich V. J., 2009]. Применяемые в клинике анальгетические препараты являются смешанными агонистами-антагонистами опиоидных рецепторов [Barber A. 1997, DeHaven-Hudkins D.L. 2004].

Так, к классу смешанных опиоидных агонистов–антагонистов относятся два препарата – пентазоцин и буторфанол, которые являются агонистами κ - и

антагонистами μ -опиоидных рецепторов. Как агонисты k -рецепторов, эти опиоиды вызывают менее выраженную анальгезию, чем морфин, и имеют несколько иной спектр побочных эффектов (преобладает седация, реже проявляются тошнота, головокружение, депрессия дыхания). Будучи антагонистами μ -рецепторов, опиоиды этого класса могут ослаблять или устранять действия классических опиоидных агонистов, включая анальгезию [Лебедева, Р.Н. 1998, Осипова Н.А. 1998, WHO Expert Committee on Drug Dependence 2003].

Бупрофанола тартрат является агонистом κ - и слабым антагонистом μ -опиоидных рецепторов. При исследовании радиолигандного связывания было показано, что бупрофанол взаимодействует как с μ -, так и с κ -опиоидными рецепторами [WHO Expert Committee on Drug Dependence 2006]. В результате взаимодействия с κ -рецепторами у него сильно выражены анальгетические свойства и седация, а при μ -антагонистическом действии бупрофанол ослабляет основные побочные эффекты наркотических анальгетиков и в меньшей степени влияет на дыхание и кровообращение. По своему анальгетическому потенциалу он уступает морфину, но превосходит действие тримеперидина. В доклинических исследованиях бупрофанол проявляет анальгетическую активность на различных экспериментальных моделях при введении крысам и приматам. В клинике бупрофанол используется для лечения умеренной и сильной острой боли при ожогах, почечных коликах и в хирургии. Послеоперационное использование бупрофанола вызывает обезболивание у 89% пациентов в течение двух дней после оперативного вмешательства. Бупрофанол в виде парентеральных инъекций может быть использован в терапии хронической боли в онкологической и неврологической практиках. Например, эффективность 1-8 мг бупрофанола при внутримышечном введении каждые 3-4 часа в течение 2-34 недель оценивали у 63 больных с хроническим болевым синдромом в связи с злокачественными заболеваниями и обнаружили, что высокий уровень обезболивания наблюдается у 51% больных и умеренно выраженная анальгезия - у 30% пациентов [WHO

Expert Committee on Drug Dependence 2006]. Бупрофанол в дозе 0,07 мг/кг при в/м введении не оказывает отрицательного действия на тонус и моторику ЖКТ, является препаратом выбора после операции в абдоминальной хирургии. Не вызывает физической и психической зависимости [Guzman D.S. 2014]. Со стороны сердечно-сосудистой системы бупрофанол не изменяет частоту сердечных сокращений и кровяное давление. Однако показано, что некоторые параметры сердечно-сосудистой системы могут быть изменены под его воздействием. Бупрофанол в дозе 0,025 мг / кг при внутривенном введении увеличивает давление в легочной артерии, диастолическое давление, системное артериальное давление и сердечный индекс [WHO Expert Committee on Drug Dependence 2006].

Характерной особенностью κ -агонистов является их способность относительно резко увеличивать диурез. Так, бупрофанол умеренно повышает диурез у крыс и мышей, но гораздо меньше, чем этилкетозиклазоцин или U50,488, которые являются полными агонистами κ -рецепторов [Leander J.D. 1987,. Horan P.J. 1989] Однако, при экспериментах на приматах повышение диуреза не наблюдалось [Butelman E.R. 1995]. Это наблюдение согласуется с понятием, что бупрофанол может быть частичным агонистом κ -опиоидных рецепторов и имеет большую κ -рецепторную активность у грызунов, чем у приматов. Существуют данные, что бупрофанол может вызывать различное по силе обезболивание в зависимости от полового признака. В частности, половые различия наблюдаются у грызунов и приматов после введение бупрофанола, который является более мощным и эффективным у самцов, чем у самок [Guzman D.S. 2014]. Половые различия в поведении могут возникнуть в результате эффектов циркулирующих в организме половых гормонов или генетических различий во время формирования половых хромосом [Russell S.E. 2013].

Бупрофанол, как морфин и бупренорфин, проявляет дозозависимую релаксацию мышц, блокируемую налоксоном у макак-резусов [Woods J.H. 1985]. Однако более поздние исследования показали, что мягкая седация или

расслабление мышц наблюдалось только у буторфанола и морфина [Butelman et al. 1995]. Такие к-агонисты как MR 2033, U50, 488 и этилкетозацин проявляют гораздо большее расслабление мышц, и седативный эффект, чем морфин, бупренорфин или буторфанол [WHO Expert Committee on Drug Dependence 2006]. В клинике наиболее частый побочный эффект к-агонистов – седация – наблюдается у 43 % принимающих данные препараты. Также характерны головокружение и тошнота – у 19 % и 13 % соответственно [Bethesda M.D: 2005].

Пентазоцин, который является агонистом к- и частичным антагонистом μ -опиоидных рецепторов, часто применяется для купирования болевого синдрома в акушерстве и гинекологии, так как обладает свойством незначительно угнетать дыхательный центр [Carlezon, W.A. 2009].

Антиноцицептивные эффекты пентазоцина проявляются значительно выше у самцов, чем у самок мышей в тестах «горячая пластина», «уксусные корчи», «формалиновая алгезия» и «tail-flick». Эти половые различия проявляются у гетерозиготных мышей, лишенных гена μ -опиоидного рецептора. Однако половые различия антиноцицептивных эффектов пентазоцина у мышей дикого типа могут быть незаметны [Mogil J.S. 2003, Craft R.M. 2001, Ide S. 2011]. Было показано, что U50488H, селективный агонист к-рецептора и другие подобные опиоиды, например, U-69593 и бремезоцин являются более эффективными, у самцов, чем у самок [Ide S. 2011]. Кроме того, самки мышей могут дифференцированно реагировать в тестах боли на различных этапах их эстрального цикла [Mogil J.S. 2000]. Однако, в противоположность выше сказанному, существуют некоторые противоречивые исследования с участием людей, в результатах которых сообщается, что антиноцицептивные эффекты пентазоцина при купировании послеоперационной боли были выше у женщин, чем у мужчин [Gear R.W. 1996, 1999].

За прошедшие три десятилетия были потрачены значительные усилия на поиск и изучение селективных каппа-агонистов. В 1980-х годах несколько

научно-исследовательских программ рассматривали избирательные агонисты каппа-опиоидных рецепторов в качестве потенциальных средств лечения боли [Von Voigtlander P.F. 1982, Szmuszkovicz J. 1982, Inui S. 2012, Nemoto T. 2013]. Предполагалось, что такие препараты обладают болеутоляющими свойствами и лишены побочных эффектов морфиноподобных веществ - физической зависимости и угнетения дыхания. Синтез и изучение аналогов арилацетамида привели к созданию мощного класса агонистов КОР. В частности, в 1982 году выявлен селективный агонист каппа-опиоидных рецепторов U-50,488 [Szmuszkovicz j. 1982]. Впоследствии был синтезирован целый ряд соединений, избирательно действующих на каппа-опиоидные рецепторы [Nemoto T. 2013]. Примерами таких веществ являются: U62,066 (спирадолин); U69,593 и CI-977 (энадолин) [Wadenberg M.L. 2003]. Установлено, что данные препараты характеризуются антиноцицептивными свойствами в экспериментальных моделях на животных. Однако, в дальнейшем у производных арилацетотомида были выявлены побочные эффекты, проявляющиеся в виде психосоматических расстройств [Nemoto T. 2013]. Впоследствии эти соединения начали использоваться только в доклинических исследованиях [Carlezon W.A. 2009]. Дальнейший поиск селективных агонистов КОР выявил соединения с тирозин-глицин-дипептидным основанием, структура которых лежит в основе эндогенных опиоидов. Представителем данного класса соединений является препарат налфурафина гидрохлорид (лабораторный шифр TRK-820) [Nemoto T. 2013]. Существуют также агонисты каппа-опиоидных рецепторов, являющиеся производными растений. Наиболее известный представитель – сальвинорин А [Inan S. 2009].

Сальвинорин А - один из первых селективных каппа-опиоидных агонистов. Соединение представляет собой активный компонент растения шалфей наркотический - *Salvia divinorum* [Wang et al. 2005? Prisinzano T.E 2008]. В результате ранее проведенных исследований было установлено, что сальвинорин А является мощным и высокоселективным агонистом каппа-опиоидных рецепторов и характеризуется большей эффективностью, чем

синтетические каппа-агонисты – U-50,488 и U-60,593 [Carlezon W.A. 2006]. Сальвинорин А при системном введении вызывает изменение в поведении крыс. Так, в тесте свободного плавания, часто используемого для изучения депрессивных свойств у животных [Cryan et al. 2002], было установлено, что под влиянием сальвинорина А в диапазоне доз 0,125-2 мг/кг увеличивалось время неподвижного состояния у крыс по отношению к контролю [Butelman E.R. 2004, Carlezon W. A. 2009, Zhang Y. 2005]. Также выявлено, что соединение U-60,593 проявляет подобные эффекты в аналогичных тестах [Mague S.D. 2003, Todtenkopf M.S. 2004]. Учитывая, что сальвинорин А мало или вообще не связывается с другими типами рецепторов в головном мозге, по полученным в экспериментах данным можно предположить, что стимуляция каппа-рецепторов может привести к развитию депрессии [Carlezon W.A. 2006, Zhang Y. 2005]. Механизмы, лежащие в основе данного эффекта, не ясны. Возможно сальвинорин А, селективно действуя на каппа-рецепторы, влияет на функционирование дофаминовой системы. Предполагается, что мезолимбическая дофаминовая система, участвующая в формировании настроения, модулируется норадренергической и серотониновой системами, а также эндогенными опиатами [Carlezon W.A. 2006, Simonson B. 2014]. Последние могут оказывать существенные влияния на настроение человека [Sheffler D.J. 2003, Simonson B. 2014]. В ранее проведенных исследованиях было выявлено, что синтетические каппа-агонисты (U-50,488 или динорфина) при системном или интрацеребровентрикулярном введении снижают внеклеточные концентрации дофамина [Devine D.P. 1993; Maisonneuve I.M. 1994]. Предполагается, что каппа-опиоидные рецепторы локализуются на окончаниях дофаминовых нейронов, где способны регулировать высвобождение дофамина [Margolis E.B. 2003]. С помощью полученных данных появилась возможность поднять вопрос об использовании в клинике селективных каппа-агонистов в качестве антидепрессантов и средств для лечения наркоманий [Pliakas A.M. 2001, Mague S.D. 2003]. Однако, в

исследованиях с участием людей было показано, что сальвинорин А вызывает галлюциногенный эффект в дозе 500 мг [Butelman E.R. 2004].

Активация каппа-опиоидных рецепторов традиционными агонистами, такими как U-50,488, U-69,593 и сальвинорином А в экспериментальных моделях приводила к развитию таких побочных эффектов как седация, дисфория и депрессии [Wee S. 2009; Morani A.S. 2009], что ограничивает их клиническое использование. Было установлено, что у сальвинорина А менее выражены нежелательными реакциями, но более короткое время действия [Butelman E.R 2009, Teksin Z.S. 2009, Ranganathan M. 2012]. В связи с чем, некоторые исследователи [Prisinzano T.E. 2008, Lovell K.M. 2011], используя его уникальную структуру, синтезировали новые соединения, обладающие селективностью по отношению к каппа-опиоидным рецепторам. Так, например, было показано, что сальвинорин В в доклинических исследованиях проявляет эффекты, аналогичные сальвинорину А, при этом побочные эффекты, характерные для последнего, зарегистрированы не были [Prevatt-Smith K.M. 2011]. По результатам анальгетических исследований было выявлено, что сальвинорин В характеризуется более продолжительным антиноцицептивным эффектом в тесте электрического отдергивания хвоста у мышей [Simonson B. 2014]. Кроме того, данное соединение приблизительно в 10 раз активнее сальвинорина А в исследованиях *in vitro* [Munro T.A. 2008] и *in vivo* на грызунах [Baker L.E. 2009]. Также установлено, что сальвинорин В, как и его природный аналог, ослабляет наркотический эффект кокаина [Simonson B. 2014].

По данным литературы [Inan S. 2006, 2009] другой селективный агонист каппа-опиоидных рецепторов - налфурафин - изначально выступал как антиноцицептивный препарат, однако в дальнейшем было обнаружено его противозудное действие. Также было показано, что налфурафин, как и соединение U-50,488, ингибирует эффект встряхивания головой по типу «мокрой собаки» и абдоминальные корчи у крыс, вызванные ицилином. Предполагается, что налфурафин блокирует ицилин-индуцированное

высвобождение глутамата в спинном стриатуме и, тем самым, ингибирует вышеуказанные эффекты. В то же время, агонисты периферических каппа-опиодных рецепторов не вызывают подобных реакций [Werkheiser J.L. 2007].

При анализе ранее проведенных исследований было отмечено, что агонисты каппа-опиодных рецепторов индуцируют диурез у животных и человека. Каппа-агонисты вызывают мочегонный эффект у мышей, крыс, собак, обезьян и людей. В частности, при введении налфурафина (0.005-0.06 мг/кг), сальвинорина В (0,1-10 мг/кг) и соединения U-50,488 (0.625-5 мг/кг) увеличивается диурез у крыс. В тоже самое время, сальвинорин А не оказывает диуретического эффекта [Inan S. 2009]. Отсутствие мочегонного эффекта у сальвинорина А объясняется непродолжительностью его действия. Также было высказано предположение, что сайт взаимодействия сальвинорина А с каппа-опиодными рецепторами отличается от его аналогов [Prisinzano T.E. 2008]. Стоит отметить, что увеличение диуреза происходит без увеличения экскреции ионов Na^+ [Gottlieb H.V. 2005]. Например, было показано, что норфуларфин вызывает диурез без электролитного дисбаланса у крыс – при исследовании нескольких доз препарата уровень сывороточного натрия оставался в пределах физиологической нормы. Более того, при инъекции норфуларфина в течение 7 дней объем экскретируемой мочи оставался на постоянном уровне, что подтверждает отсутствие толерантности к диуретическому эффекту [Inan S. 2009].

Соединение U-60,593 проявляет антиноцицептивный эффект. Так, было показано, что в анальгетическом тесте «уксусные корчи» данное вещество оказывало выраженное анальгетическое действие. Однако, в тесте свободного плавания оно вызывает депрессию у экспериментальных животных [Negus S.S. 2010].

Побочные эффекты, вызываемые центрально действующими агонистами КОР, привели к необходимости поиска и изучения лигандов, влияющих на периферические рецепторы [DeHaven-Hudkins D.L. 2004, Riviere P.J. 2004]. Одним из первых препаратов подобного действия является федотцин, который

изначально выступал как средство, применяемое при синдроме раздраженного кишечника и диспепсии [Delvaux M. 2001]. В дальнейшем данный препарат оказался недостаточно эффективным, и его клиническое применение было приостановлено [Callahan M. J. 2002].

Другой периферической агонист КОР – азидаолин – прошел клинические испытания и оказался также эффективным при синдроме раздраженного кишечника и диспепсических расстройствах. Однако было выявлено, что в больших дозах (более 10 мг) азидаолин развивает сильную болевую реакцию, хотя появление данного эффекта не опосредовано влиянием на опиоидные рецепторы [Aldrich V.J. 2009].

На сегодняшний день существуют также агонисты каппа-опиоидных рецепторов, имеющие пептидное строение. Наибольший интерес из данного класса соединений представляет производное динорфина А – соединение E-2078 [Yoshino H. 1990]. Анальгетическая активность данного пептида была изучена на обезьянах [Butelman E.R. 2004] и грызунах [Takahiro N. 1991]. В результате исследований селективности соединения E-2078 было установлено, что в развитии анальгетического ответа ключевую роль играют именно каппа-опиоидные рецепторы [Nakazawa T. 1991]. Также было показано, что E-2078 повышает уровень пролактина в сыворотке и индуцирует диурез. Однако аналог динорфина А проникает через ГЭБ и вызывает типичные побочные эффекты непептидных каппа-агонистов [Butelman E. R. 1999].

Другой агонист КОР с пептидным строением – SK-9709 – характеризуется более высокой селективностью в отношении каппа-рецепторов. Данное соединение проявляет анальгетическую активность в тестах укусы корчи и горячая пластина у мышей при подкожном и интратекальном введении. В дальнейшем было установлено, что антиноцицептивная реакция опосредована влиянием соединения как на каппа-, так и на мю-опиоидные рецепторы [Aldrich V.J. 2009].

По литературным данным [Гречко О.Ю. 2007, Елисеева Н.В. 2010], соединения из нового класса конденсированных производных бензимидазола

могут являться агонистами каппа-опиоидных рецепторов. Так, было выявлено вещество под лабораторным шифром РУ-1205. Установлено, что для данного соединения характерна анальгетическая активность на различных моделях ноцицептивных реакций, вызванных термическими (тест горячая пластина – супраспинальный уровень болевой чувствительности), электрическими (тест отдергивания хвоста – спинальный уровень организации болевой чувствительности) и химическими (тест укусы корчи – периферический уровень организации болевой чувствительности) стимулами. Для соединения РУ-1205 наиболее выраженная антиноцицептивная активность характерна в тесте «горячая пластина». Следует отметить, что уровень обезболивающего эффекта превосходит таковой у буторфанола тартрата в диапазоне доз 0,01 - 1 мг/кг. Каппа-опиоидный механизм действия соединения РУ-1205 подтверждается блокированием анальгетической реакции селективным блокатором κ-рецепторов норбиналторфимином [Спасов А.А. 2013].

Соединение РУ-1203 является близким по структуре и активности соединению РУ-1205. Было установлено, что соединение РУ-1203 в диапазоне доз 0,01-1 мг/кг на различных экспериментальных ноцицептивных моделях проявляет выраженную анальгетическую активность, по некоторым показателям превышающую препарат сравнения буторфанола тартрат. Анальгетический эффект исследуемого соединения на 90% блокировался неселективным антагонистом опиоидных рецепторов налоксоном, что подтверждает опиоидергический механизм его обезболивающего действия. Установлено, что соединение РУ-1203 обладает мембранотропным действием. Так, было выявлено, что под влиянием данного вещества происходит дозозависимое снижение натриевых, кальциевых и калиевых ионных токов. Вероятно, это обусловлено взаимосвязанным функционированием каппа-рецепторов и ионных каналов. [Елисеева Н.В. 2009]. По литературным данным [Su X. et al., 2002] соединение U-50,488 и препарат бремасоцин также подавляют высокопороговые Ca^{2+} токи в сенсорных нейронах ободочной кишки крысы.

1.2. ФАРМАКОКИНЕТИКА КАППА-ОПИОИДНЫХ АГОНИСТОВ

Для облегчения сильной или умеренной боли буторфанола тартрат вводят внутримышечно или внутривенно [Vachharajani N.N. 1997]. При инъекционных путях введения препарат активно распределяется по органам и тканям, а также связывается с белками плазмы крови приблизительно на 80 %. Буторфанол быстро проникает через плацентарный барьер, а также распространяется в грудное молоко [WHO Expert Committee on Drug Dependence, 2006]. При пероральном приеме данный препарат подвергается активному метаболизму в печени и его абсолютная биодоступность составляет порядка 5 %. При внутривенном введении радиоизотопов буторфанола выявлено, что в моче определяется только 5 % неизмененного препарата. При дальнейшем исследовании метаболизма было установлено, что буторфанол подвергается первой и второй фазе биотрансформации [Vachharajani N.N. 1997]. Так, было выявлено, что образуются следующие продукты реакции – гидроксидбуторфанола, норбуторфанола и глюкоронидные конъюгаты [Gaver R.C. 1980].

Для увеличения скорости всасывания, повышения показателя биодоступности была разработана трансназальная лекарственная форма буторфанола тартрата [Vachharajani N.N. 1997]. На основании фармакокинетических исследований было показано, что после данного типа введения буторфанол определяется в плазме крови на протяжении 24 часов. Максимальная концентрация препарата наблюдается через 30-60 мин после однократного введения и составляет 0,9-1,04 нг/мл [WHO Expert Committee on Drug Dependence 2006]. При этом период полувыведения составляет порядка 10 часов [Boulton D.W. 2002]. Установлено, что абсолютная биодоступность буторфанола тартрата при интраназальном введении составляет 70 % [Shyu W. C. 1993]. При исследовании метаболизма данного препарата после трансназального введения была выявлена только гидроксигидрированная форма исходного соединения. Было показано, что более продолжительный период полувыведения гидроксидбуторфанола характеризует более медленные

процессы элиминации данного соединения [Vachharajani N. N. 1997]. При исследовании обезболивающей активности метаболитов буторфанола установлено, что они не проявляют данного фармакологического эффекта [WHO Expert Committee on Drug Dependence 2006].

При исследовании фармакокинетических свойств пентазоцина было выявлено, что данный препарат после внутривенного введения циркулирует в плазме крови человека на протяжении 6 часов [Pittman K. A. 1974]. Период полувыведения пентазоцина составляет порядка 2 часов [Pittman K. A. 1974, Yeh S.Y. 1986]. При внутримышечном введении препарата наблюдается быстрая фаза всасывания и длительная элиминация. Так, было показано, что при введении в мышцу 40 мг пентазоцина максимальная концентрация наблюдалась уже через 15 мин. По литературным данным [Yeh S.Y. 1986] установлено, при в/м введении пентазоцин также циркулирует в плазме крови на протяжении 6 часов. При пероральном применении данный препарат хорошо всасывается из ЖКТ. Максимальная концентрация наблюдается через 2 часа после начала эксперимента. Однако после попадания в печень подвергается активному метаболизму – абсолютная биодоступность составляет порядка 20 % [Tegeeder I, 1999].

Пентазоцин подвергается достаточно активному метаболизму. Так, было установлено, что при внутривенном введении площадь под фармакокинетической кривой пентазоцина в плазме крови после прохождения через печеночный барьер составляет всего 14 % от исходной. Данные по экскреции подтвердили эти результаты – суммарно с мочой выводится 13 % от первоначальной дозы неизменного вещества [Pittman K.A. 1974]. В процессе метаболизма образуются гидроксированные и окисленные формы пентазоцина, которые в дальнейшем экскретируются в виде конъюгатов [Pittman K.A. 1974, Tegeeder I, 1999]. Накопленный фактический материал позволяет заключить, что при пероральном применении препарата наблюдаются значительные межличностные различия в скорости метаболизма [Tegeeder I, 1999]. С помощью этих данных можно объяснить изменение

анальгетической активности пентазоцина в зависимости от индивидуума [Hoskin P.J. 1991]. Согласно литературным данным [Tegeeder I, 1999] экскретируется пентазицион в основном почками – порядка 30 % - в виде конъюгатов с глюкуроновой кислотой.

Селективный агонист каппа-опиоидных рецепторов растительного происхождения сальвинорин А характеризуется короткой продолжительностью действия, что обосновывается его фармакокинетическими свойствами [Schmidt, M.D. 2005]. По литературным данным [Teksin Z.S. 2009], было установлено, что данное соединение после внутривенного введения циркулирует в плазме крови на протяжении 4 часов, при этом в головном мозге обнаруживается только на протяжении 1 часа исследования, а его максимальная концентрация в данном органе наблюдается через 10 минут, чем можно объяснить быстрое начало галлюциногенного эффекта. В результате предварительно проведенных исследований было установлено, что Сальвинорин А является субстратом Р-гликопротеинового транспортера и характеризуется высоким аффинитетом к нему, однако, несмотря на это, данное соединение характеризуется высокой степенью липофильности ($XlogP = 2.3$) [Prisinzano T.E. 2005, Babu K.M. 2008,], что объясняет высокую скорость преодоления ГЭБ [Teksin Z. S. 2009].

При рассмотрении химической структуры сальвинорина А можно предположить, что данный препарат является субстратом ферментов семейства CYP450, а также способен связываться с глюкуроновой кислотой. В процессе исследований метаболизма сальвинорина А *in vitro* было установлено, что следующие изоформы ферментов семейства CYP450 могут принимать участие в биотрансформации данного соединения - CYP2D6, CYP1A1, CYP2C18 и CYP2E1 [Teksin Z. S. 2009].

Синтетический селективный агонист каппа-опиоидных рецепторов U-50,488 характеризуется различными фармакокинетическими свойствами у самок и самцов при внутрижелудочном введении крысам. Так, было установлено, что в течение эксперимента у самок отмечались большие концентрации соединения U-50,488 в плазме крови, чем у самцов – площадь

под фармакокинетической кривой у крыс женского пола превышает данный показатель у мужского в три раза. Максимальная концентрация данного вещества наблюдалась через 15 минут после введения, при этом у самок ее значение превосходило таковое у самцов приблизительно в два раза. Также было показано, что при пероральном введении соединения отмечались большие значения абсолютной биодоступности у самок, чем у самцов крыс [Russell S. E. 2013]. Однако, период полувыведения соединения U-50,488 не имеет отличий у обоих полов и составляет в среднем 2,5 часа. Также концентрации вещества в головном мозге у самцов и самок носят схожий характер [Gandhi M. 2004, Russell S. E. 2013]. Причины данных различий в фармакокинетике соединения U-50,488 между полами неизвестны. Предполагалось, что они обусловлены различным по силе сродством к транспортерам в организме животных и людей. Однако, в дальнейшем было установлено, что соединение U-50,488 не является субстратом Р-гликопротеинового транспортера [Russell S. E. 2013].

Селективный агонист периферических каппа-опиодных рецепторов – азимадолин после перорального введения крысам абсорбируется из ЖКТ в среднем на 80 % [Kramer H.J. 2000, Camilleri M. 2008]. При приеме внутрь у людей максимальная концентрация препарата отмечается через 30 минут – 2 часа после введения 5 мг. Период полувыведения составляет порядка 5,5 часов [Camilleri M. 2008]. Биодоступность при данном пути введения составляет порядка 14 %, 6 % и 40 % у крыс, обезьян и людей соответственно [Bagnol D. 1997]. Следует отметить, что относительная биодоступность азимадолина у людей была немного выше при приеме с пищей, чем натощак. При исследовании распределения установлено, что значительная концентрация азимадолина отмечается в органах элиминации – печени и почках и не обнаруживается в головном мозге [Camilleri M. 2008].

Метаболизм соединения у животных аналогичен таковому у людей. Было установлено, что основной метаболит, обнаруженный в плазме, является продуктом второй фазы биотрансформации – конъюгатом азимадолина с глюкуроновой кислотой [Camilleri M. 2008]. Однако первая фаза метаболизма

также характерна для данного препарата. Так, в результате исследований было показано, что ферменты CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A4 семейства цитохромов CYP450 принимают активное участие в метаболических реакциях азимадолина. Экскреция азимадолина происходит в основном через ЖКТ в виде метаболитов.

Изучение фармакокинетических свойств соединения РУ-1205 основывалось на ранее проведенных исследованиях некоторых производных бензимидазола. (ритмидазол, эноксифол, амфедазол, соединение РУ-64, диабенол, бемитил, дибазол). По результатам исследований данных препаратов было установлено, что наиболее выражено их биотрансформация происходит под воздействием изоформ CYP3A. Предполагается, что в метаболизм также вовлечены изоформы CYP2B1 и CYP2B2. Установлено, что ни для одного из соединений не характерно взаимодействие с изоформами CYP2C. При анализе компьютерного прогноза метаболизма производных бензимидазола. было выявлено, что для препарата эноксифол характерно образование конъюгатов с глюкуроновой кислотой. По-видимому, это связано с присутствием необходимых функциональных групп (-ОН) в составе молекулы. Для соединения РУ-64 характерно гидроксирование ароматических ядер. Наиболее характерная реакция для производных бензимидазола - образование N-оксидов. Таким образом, для производных бензимидазола наиболее характерны реакции первой фазы биотрансформации [Л.А. Смирнова, 2004].

Глава 2. Материалы и методы исследования.

2.1. Материалы исследования.

Субстанция соединения РУ-1205 – 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2- α]бензимидазол, синтезирована в НИИ ФОХ Южного федерального университета под руководством старшего научного сотрудника, к.х.н. В. А. Анисимовой¹. Содержание чистого вещества не менее 99,46%. Белый кристаллический порошок, гигроскопичный. Легко растворим в кислоте муравьиной концентрированной, мало растворим в воде и в спирте этиловом 95%, практически не растворим в ацетоне и хлороформе

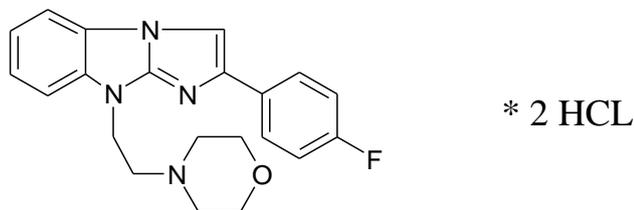


Рис. 2.1 Структурная формула соединения РУ-1205. Молекулярная масса 437,3 г/моль.

Таблетки соединения РУ-1205, покрытые оболочкой, состава - 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2- α]бензимидазол – 0,011; лактоза – 0,02; лудипресс – 0,1669; магния стеарат – 0,002 – разработаны и изготовлены в ГБУ "НИИ фармакологии имени В.В. Закусова" РАМН г. Москва под руководством д.ф.н., профессора Б. М. Пятина.² Визуально - круглые двояковыпуклые таблетки, покрытые оболочкой, белого цвета.

Инъекционная лекарственная форма соединения РУ-1205 в виде лиофилизата, состава - 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2- α]бензимидазол – 0,05г; манит - 2,65г – разработана и изготовлена в ГБУ "НИИ фармакологии имени В.В. Закусова" РАМН г. Москва под руководством д.ф.н.,

¹ Выражаем искреннюю признательность старшему научному сотруднику, к.х.н. В.А. Анисимовой за синтез и предоставление субстанции для работы.

² Выражаем искреннюю признательность заведующему лабораторией технологии лекарственных форм НИИ фармакологии РАМН г. Москвы, д.ф.н., проф. Б.М. Пятину за создание и предоставление для исследования таблетированных форм.

профессора Б. М. Пятина. Визуально - масса белого цвета, упакованная во флаконы темного стекла объемом 2 мл.

Лекарственные формы разработаны в рамках проведения ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по государственному контракту № 11411.1008700.13.090 от 13.09.2011. «доклинические исследования лекарственного средства с каппа-опиоидной агонистической активностью на основе производного имидазобензимидазола». Шифр «2.1. Имидазобензимидазол 2011»

Исследования проводились с использованием следующих реактивов и лекарственных препаратов: ацетонитрил (УФ200, Россия), калия фосфат однозамещенный, гидроксид натрия, цитрат натрия производства «Мосреаквти» (Россия) гексенал (ООО «МедПро Инк», Латвия), хлоралгидрат (ООО «МедПро Инк», Латвия), алпразолам («Органика», Новокузнецк, таблетки 0,001), мидазолам (Dormicum, «Roche», Швейцария, 0,5 % раствор в ампулах по 3 мл).

Эксперименты были выполнены на оборудовании: ВЭЖХ хроматограф LC-20 (Shimadzu, Япония), хроматографические колонки SUPELCOSIL LC-18 (Sigma, США), гомогенизатор (IKA Ultra Turbax, Германия), центрифуга (Elmi, Латвия), ультразвуковая баня (Серьга, Россия), метаболическая камера «Термопласт» (Италия), электростимулятор лабораторный ЭСЛ-2 (Россия).

Исследование фармакокинетики соединения РУ-1205 проводилось на 160 белых беспородных крысах-самцах массой 200 ± 20 г, 20 белых беспородных мышках-самцах массой 25,0-30,0 г и на 30 кроликах-самцах породы шиншилла массой 2,5-3 кг, полученных из питомника РАМТН, Москва. Животные содержались в условиях вивария на стандартной диете (гранулированный комбикорм, гранулы 5 мм, ГОСТ 51899-02), при 12-ти часовом световом режиме с соблюдением правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 1000.4-96), а также правил и Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите

позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997). На момент проведения исследований животные были здоровыми, изменений поведения, аппетита, режима сна и бодрствования обнаружено не было. За 12 ч до эксперимента животные не получали пищу без ограничения доступа к воде. Все эксперименты выполняли согласно заключению этической экспертизы (протокол № 155-2012 от 23 марта 2012 года, Региональный Независимый Этический Комитет).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Хроматографические методы количественного определения соединения РУ-1205 в органах и тканях животных.

Для количественного определения соединения РУ-1205 в биологическом материале использовали оригинальный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектором на хроматографе Shimadzu. Условия хроматографирования: аналитическая колонка SUPELCOSIL LC-18 - 100 x 4,6 мм, диаметр частиц 5 мкм. Колонку термостатировали при 50 °С. Подвижная фаза: раствор А и раствор В в соотношении 1:1. Раствор А: 50 мМ раствор однозамещенного фосфата калия рН=5,0, оттитрованный 0,5 М раствором NaOH; раствор В: ацетонитрил. Скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин. Перед хроматографированием подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой бане и фильтровали. Детектирование проводили при длине волны 205 нм. Время удерживания при данных условиях составило 8,00 – 8,80 мин.

2.2.2 Методы экстракции соединения РУ-1205 из биологического материала

Животных выводили из эксперимента методом декапитации. Кровь стабилизировали 5 % цитратом натрия. Преципитацию белков и экстракцию изучаемых соединений производили ацетонитрилом из плазмы крови, мочи, а также из 20% водных гомогенатов кала, органов и тканей крыс в соотношении

1:2. Затем образцы встряхивали 10 минут, центрифугировали в течение 10 минут при 10000 об/мин, после чего надосадочную жидкость отбирали и вводили в инжектор хроматографа с объемом петли 20 мкл.

Степень извлечения соединения РУ-1205 из биологических проб составила не менее 90 %. При этом не наблюдалось зависимости степени экстракции от концентрации соединения в пробе.

2.2.3 Схемы проведения фармакокинетических исследований

Фармакокинетические исследования выполнялись согласно методическим рекомендациям по проведению доклинических исследований фармакокинетики лекарственных средств д.м.н, профессора В.П. Жердева [под редакцией Миронова А.Н.].

Внутривенное введение. Соединение РУ-1205 вводили однократно внутривенно в хвостовую вену крыс в дозе 10 мг/кг. Забор проб крови осуществляли после декапитации животных через 5, 10, 20, 40 минут и через 1, 2, 4, 8 и 12 часов после введения, а также через 5 минут после введения изотонического раствора натрия хлорида контрольной группе животных. Зависимость концентрации соединений от времени изучалась в плазме крови, которую получали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 минут. Распределение соединения в организме крыс изучали в органе потенциального действия – головном мозге; в тканях с сильной васкуляризацией – сердце, легких и селезенке; с умеренной васкуляризацией – мышце (musculus quadriceps femoris) и слабой васкуляризацией - сальнике, а также в органах, обеспечивающих элиминацию - печени и почках. Для проведения исследований органы измельчали и гомогенизировали до образования 20% водного гомогената.

Пероральное и подкожное введение. Соединение РУ-1205 вводили однократно перорально и подкожно крысам в дозах 50 мг/кг. Забор крови осуществляли после декапитации через 30 минут и через 1, 2, 4, 8, 12 часов после введения. Распределение соединения после внутрижелудочного и

подкожного введения осуществляли в органе-мишени – головном мозге, в органах, обеспечивающих элиминацию – печени и почках, а также в жировой ткани. Для проведения исследований органы измельчали и гомогенизировали до образования 20% водного гомогената.

Кровь стабилизировали 5% раствором натрия цитрата.

Содержание соединения РУ-1205 определяли также в моче и кале. Сбор проб экскретов осуществляли в метаболических камерах через 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 и 96 часов после введения. Образцы кала измельчали с образованием 20 % водного гомогената.

Методы исследования метаболизма

Прогноз возможных метаболитов соединения РУ-1205 проводили под руководством д.б.н. П. М. Васильева с помощью программы «PALLAS 3.00» (CompuDrug Chemistry Ltd.). Для подробного изучения влияния соединения РУ-1205 на систему цитохрома P450 использовались тесты взаимодействия с гексеналом (изоформы CYP2C9, CYP2B1 и CYP2B2) [Omiecinski C.J. et al., 1999; Nebert D.W. et al., 2002], мидазолам (изоформы CYP3A1 и CYP2C) [Kotegawa T. 2000] и алпразолам (изоформы CYP3A1) [Никитин Н.А., 2002]. Для изучения влияния соединения РУ-1205 на вторую фазу биотрансформации использовался тест хлоралгидратного сна, так как хлоралгидрат является тест-субстратом глюкоронилтрансферазы. [Лакин К.М. и др., 1981].

Гексенал в виде водного раствора вводили внутрибрюшинно крысам в дозе 70 мг/кг. Хлоралгидрат вводили крысам внутрибрюшинно в виде раствора в дозе 70 мг/кг. Алпразолам вводили внутрибрюшинно мышам в виде суспензии на твине-85, в дозе 50 мг/кг, мидазолам – внутрибрюшинно мышам в дозе 80 мг/кг.

Для определения связи соединения РУ-1205 с эндогенными кислотами производили ферментативный, кислотный и щелочной гидролиз проб мочи. Полученные пробы инкубировали с β -глюкуронидазой и арилсульфатазой, выделенных от *Helix pomatia* (“Boehringer Mannheim”, Германия) в 0,1M ацетатном буфере (pH 5,0) в течение 24 часов при температуре 37°C [Thomas

V.F. et al., 1999]. Щелочной гидролиз производили добавлением 5М раствора NaOH и инкубацией при 37°C в течение 2 часов [Dix K.J. et al., 1999]. Кислотный гидролиз производили добавлением 5М раствора HCl и инкубацией при 37°C в течение 2 часов [Manini P. et al., 1999].

Изучение взаимосвязи фармакокинетики и фармакодинамики².

В качестве фармакодинамического показателя был выбран обезболивающий тест. Проведение экспериментов по исследованию уровня болевой чувствительности проводили на модели электрического раздражения хвоста [Carrol N. M., Lim P. K., 1960]. Через 30 минут после введения исследуемого вещества проводилось раздражение корня хвоста биполярными подкожными электродами при помощи электростимулятора лабораторного ЭСЛ-2 прямоугольными импульсами длительностью 10 мсек, частотой стимуляции 100 Гц при продолжительности 1 сек. При этом регистрировались величины болевых порогов, выражаемые в вольтах, и соответствующие моменту появления рефлекса «отдергивания хвоста». Об уровне анальгетического эффекта судили по изменению амплитуды напряжения, подаваемого на электроды. Соединение РУ-1205 вводили перорально в дозе 5 мг/кг и подкожно в дозе 1 мг/кг. Сравнение эффекта изучаемого вещества производилось по отношению к изменениям в контрольной группе животных (вводился физиологический раствор в аналогичном объеме). Корреляцию между фармакокинетическими и обезболивающими свойствами соединения РУ-1205 описывали в виде зависимости антиноцицептивного эффекта от концентрации вещества в плазме крови.

2.2.4 Схема проведения биофармацевтических исследований

Внутривенное введение. Введение субстанции соединения РУ-1205 и инъекционной лекарственной формы, в виде лиофилизата, осуществлялись в краевую ушную вену кроликов в одинаковой дозе 10 мг/кг. Забор проб крови

² Эксперименты выполнены совместно с аспирантом кафедры фармакологии Д. М. Штаревой.

производился через 5, 10, 20, 40 минут, 1, 2, 4, 8 и 12 часов после внутривенного введения.

Пероральное введение. Субстанцию соединения РУ-1205 и твердую лекарственную форму, в виде таблеток, покрытых оболочкой, вводили перорально в одинаковой дозе 50 мг/кг. Забор проб крови производился через 15, 30 минут, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 и 72 часа после введения.

Подкожное введение. Введение субстанции соединения РУ-1205 и инъекционной лекарственной формы, в виде лиофилизата, осуществляли подкожно кроликам в одинаковой дозе 25 мг/кг. Забор проб крови производился через 15, 30 минут, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 и 72 часа после введения.

Перед введением субстанции или лекарственных форм соединения РУ-1205 у животных брали пробы крови для выявления фоновых пиков.

При всех трех путях введения кровь, после сбора, стабилизировали 5% раствором натрия цитрата.

2.2.5. Расчеты фармакокинетических параметров

Для оценки фармакокинетических свойств изучаемых лекарственных веществ рассчитывали ряд параметров.

1. Площадь под фармакокинетической кривой “концентрация – время” (AUC) является основным фармакокинетическим параметром и характеризует биологическую доступность лекарственного средства. Данный параметр рассчитывали модельно – независимым методом статистических моментов (Пиотровский В., 1986) в программе Microsoft Excel.

$$AUC = \frac{C_1}{2} \Delta t_1 + \frac{C_1+C_2}{2} \Delta t_2 + \frac{C_2+C_3}{2} \Delta t_3 \dots + AUC_{ост},$$

где $AUC_{ост} = \frac{C_{посл}}{K_{el}}$

2. Общий (кажущийся) клиренс (cl), отражающий скорость освобождения от препарата единицы объёма биожидкости, как отношение дозы (D) к AUC:

$$cl = \frac{D}{AUC} \text{ (мл/час)}.$$

3. Константа элиминации (K_{el}), характеризующая снижение концентрации препарата на конечном (моноэкспоненциальном) участке фармакокинетической кривой:

$$K_{el} = \frac{\ln \frac{C_{\max}}{C_{\text{посл}}}}{T_{\text{посл}} - T_{\max}} \text{ (час}^{-1}\text{)}, \text{ где}$$

C_{\max} и T_{\max} – максимальная концентрация и время ее достижения, $C_{\text{посл}}$ и $T_{\text{посл}}$ – последнее значение концентрации и время её определения.

4. Общий (кажущийся) объём распределения (V_d), под которым понимают такой объём, при распределении в котором, препарат имел бы ту же концентрацию, что и в плазме крови, как отношение клиренса (cl) к константе элиминации (K_{el}):

$$V_d = \frac{cl}{K_{el}} \text{ (мл)}.$$

5. Период полувыведения ($T_{1/2}$), отражающий время, в течении которого концентрация ЛВ в крови снижается вдвое:

$$T_{1/2} = \frac{0,693}{K_{el}} \text{ (час)}.$$

6. Среднее время удерживания, характеризующее среднее время пребывания в организме молекулы препарата (MRT):

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC} \text{ (час)}, \text{ где}$$

AUMC – площадь под кривой “произведение времени на концентрацию лекарственного вещества-время”.

Для оценки интенсивности проникновения вещества в ткани использовалось вычисление тканевой доступности (f_t), определяемой отношением значения AUC в ткани к соответствующей величине AUC в крови.

Абсолютная биодоступность рассчитывалась как отношение AUC при пероральном и подкожном введении к AUC при внутривенном введении лекарственного вещества крысам.

Относительная биодоступность рассчитывалась как отношение AUC субстанции к AUC лекарственной формы при соответствующем введении лекарственного вещества кроликам.

2.2.6 Методы статистической обработки

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием парного t-критерия Стьюдента, критерия Манна-Уитни (Newman-Keulstest) с использованием табличного редактора Microsoft Excel и пакета прикладных программ «GraphPad Prism 5.00» с предварительной проверкой выборки на нормальность распределения.

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА СОЕДИНЕНИЯ РУ-1205

Неотъемлемой частью изучения фармакологических свойств новых биологически активных соединений является исследование их фармакокинетических параметров [Е.В. Иванникова, В.П. Жердев и др. 2013]. Известно, что скорость фармакокинетических процессов во многом определяет эффект лекарственного средства [В.И. Сергиенко, Р. Джелифф и др. 2005]. Все эти процессы взаимосвязаны и взаимозависимы [Н.Н. Каркищенко 2001]. Знание фармакокинетических свойств фармакологического средства дает возможность обосновать выбор путей и методов его введения, определить ткани, в которые оно проникает наиболее интенсивно, установить его основные пути элиминации. Фармакокинетические данные, полученные в эксперименте на животных, необходимы для установления зависимости «концентрация–эффект», что может быть использовано для прогнозирования действия фармакологического средства у человека. Кроме того, по результатам экспериментального изучения фармакокинетики фармакологического средства возможно предсказать концентрацию препарата в крови и таким образом, выбрать ориентировочную схему дозирования, которая может быть затем уточнена в ходе клинических исследований [А.А. Фирсов, В.П. Жердев и др., 2012].

3.1 Валидационные параметры методов ВЭЖХ, используемых для определения соединения РУ-1205

Используя разработанный метод количественного определения (см. глава 2) были получены хроматограммы стандартных водных и плазменных растворов соединения РУ-1205 (Рис. 3.1, 3.2).

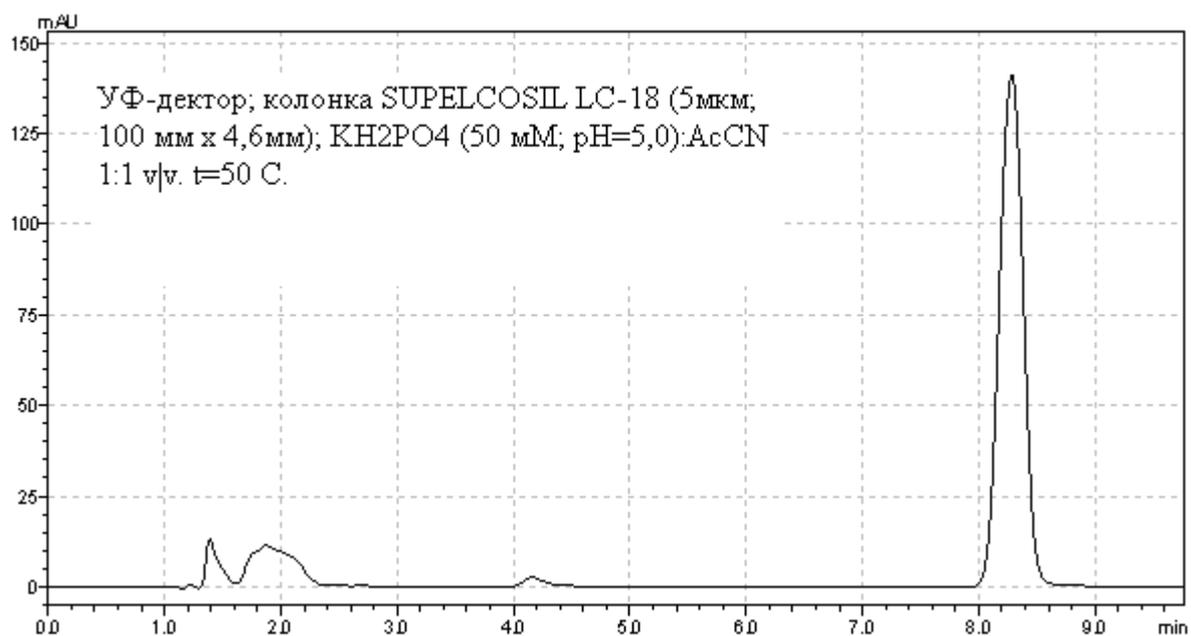


Рис. 3.1 Хроматограмма соединения РУ-1205 в водном растворе. Концентрация соединения РУ-1205 - 5 мкг/мл, время удерживания – 8,00 – 8,83 мин.

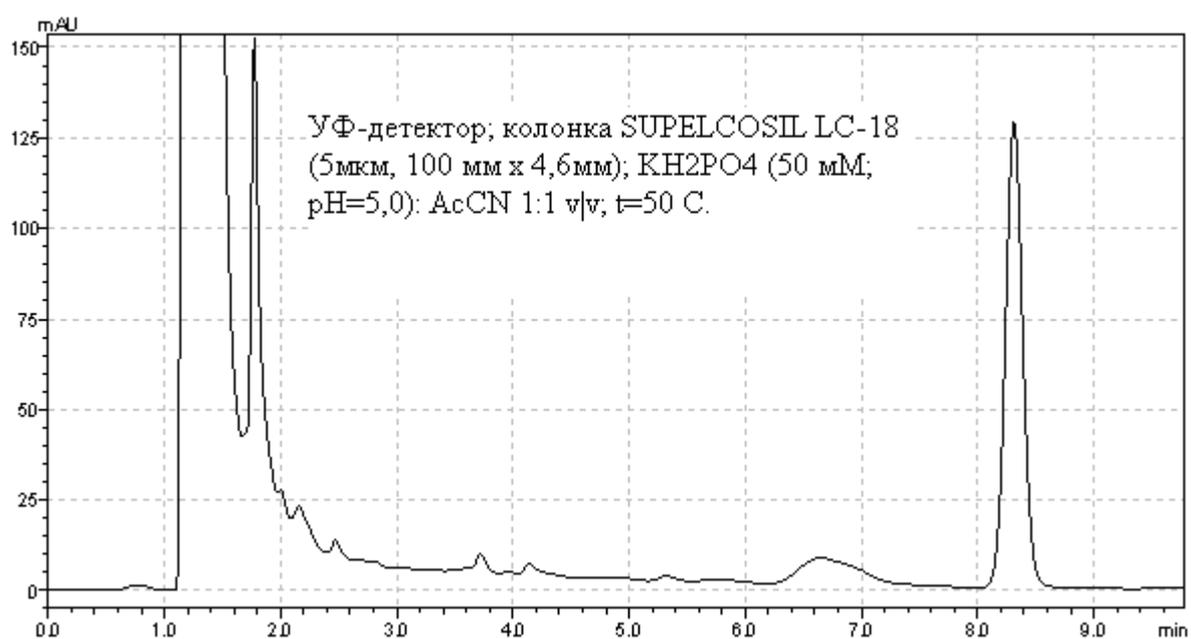


Рис. 3.2 Хроматограмма соединения РУ-1205 в плазме крови крыс. Концентрация соединения РУ-1205 - 5 мкг/мл, время удерживания – 8,00 – 8,83 мин.

Для количественного определения вещества использовали метод абсолютной калибровки. Зависимость площадей пиков от концентрации соединения РУ-1205 анализировалась методом регрессионного анализа в диапазоне концентраций от 0,5 до 25 мкг/мл. По каждому значению концентрации проводилось 5 параллельных измерений. В результате было установлено, что калибровочные кривые носят линейный характер, с коэффициентом аппроксимации (R^2) равным 0,99 (рис. 3.3).

Валидация метода проводилась согласно «Guideline on bioanalytical method validation» (ЕМЕА, 2012). По полученным результатам измерений были рассчитаны точность и прецизионность (средняя ошибка измерения). Данные представлены в таблице 3.1.

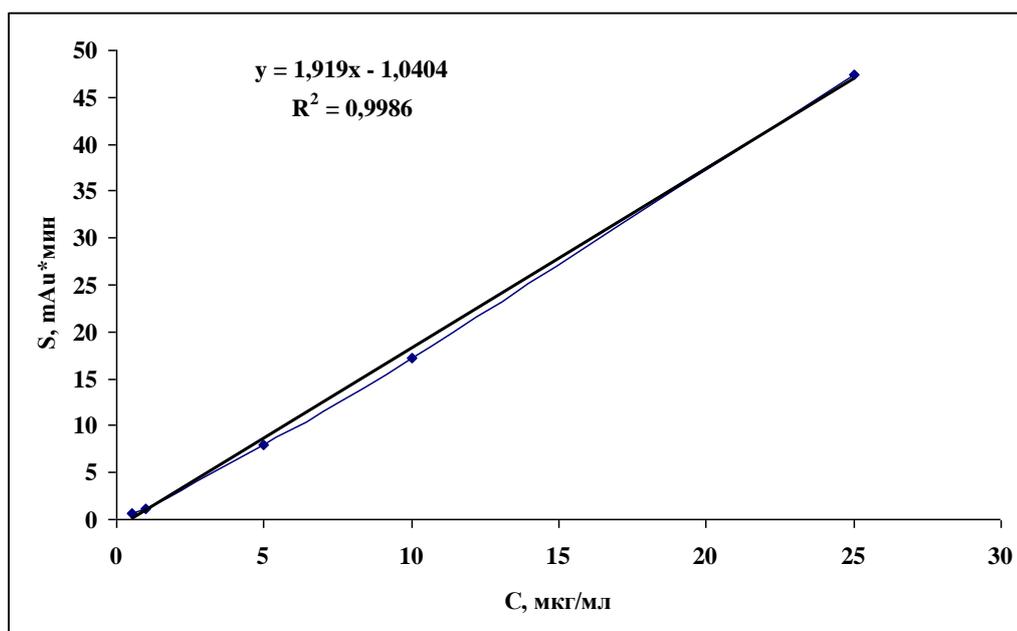


Рис. 3.3 Зависимость площади под хроматографическим пиком от концентрации соединения РУ-1205.

Обозначения: по оси абсцисс – концентрация соединения РУ-1205, мкг/мл; по оси ординат – площадь под хроматографическим пиком, mAU*мин.

Таблица 3.1

Валидационные характеристики метода ВЭЖХ количественного определения соединения РУ-1205

Номинальная концентрация, мкг/мл	Расчетная концентрация, мкг/мл	Точность, Δ %	Прецизионность, %
0,5	0,67±0,07	34	79,74
1	1,15±0,10	15	14,13
5	4,72±0,41	-5,6	5,69
10	9,48±1,18	-5,2	5,17
25	25,24±0,15	0,96	1,01

Были определены внутрисуточные процентные колебания (повторяемость метода), которые не превышали 20% в изучаемых диапазонах концентраций. Междневные процентные колебания (воспроизводимость метода) для изучаемого соединения не превышали в основном 15% (Таблица 3.2).

При повторном проведении анализа, после 72 часов хранения стандартных растворов соединения при комнатной температуре, а также при изучении влияния процессов замораживания и таяния, средние абсолютные процентные колебания находились в тех же пределах, показывая стабильность исследуемого вещества.

Таблица 3.2.

Основные аналитические параметры метода ВЭЖХ количественного определения соединения РУ-1205.

Параметр	Значение
Внутрисуточные колебания (Повторяемость)	≤ 20%
Междневные колебания (воспроизводимость)	≤ 15%
Точность (ср. по концентрациям)	87,85 %
Порог количественного определения	500 нг/мл
Предел обнаружения	200 нг/мл
Средняя ошибка измерения	11,86 %

3.2 Линейность фармакокинетических свойств соединения РУ-1205

При проведении исследований было выявлено, что основным параметр, характеризующий степень биологической доступности препарата, площадь под фармакокинетической кривой, увеличивается с увеличением дозы линейно. Значения максимальной концентрации также имеют статистически значимые отличия в зависимости от дозы. При внутривенном введении крысам изучаемого соединения в дозах 1, 10 и 50 мг/кг коэффициент аппроксимации имеет значение 0,98 (Рис. 3.4).

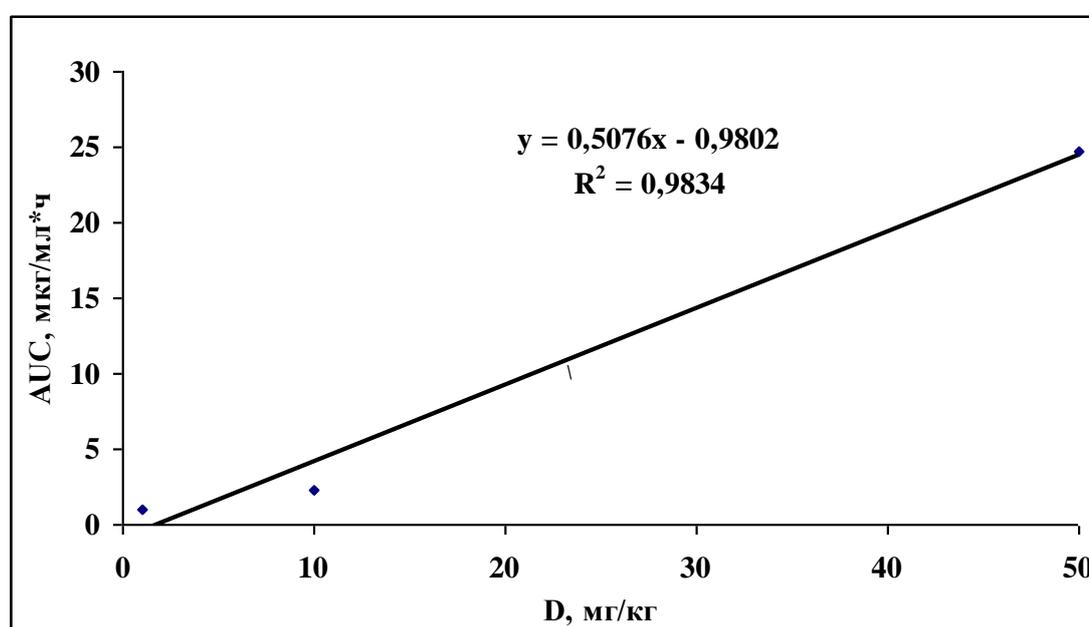


Рис. 3.4 Зависимость значения площади под фармакокинетической кривой соединения РУ-1205 от величин доз при внутривенном введении крысам.

Обозначения: по оси абсцисс – доза соединения РУ-1205, мг/кг; по оси ординат – площадь под фармакокинетической кривой, мг/кг*ч.

3.3. Фармакокинетические свойства соединения РУ-1205 при внутривенном введении.

3.3.1 Фармакокинетика в плазме крови крыс.

В результате проведенного исследования были получены усредненные фармакокинетические профили зависимости концентрации препарата в плазме крови крыс от времени (Рис. 3.5). Так, было выявлено, что при внутривенном

введении соединение циркулирует в плазме крови на протяжении 12 ч. Кривая носит моноэкспоненциальный характер. В начальный момент времени наблюдается максимальное значение концентрации, затем происходит резкое снижение ее уровня.

Основные фармакокинетические параметры, рассчитанные по зависимости концентрации соединения в плазме крыс от времени показывают низкие значения периода полувыведения и среднего времени удерживания в организме одной молекулы препарата. Кажущийся объем распределения превышает реальный объем организма крыс более чем в 7 раз, что предполагает неравномерное распределение соединения в тканях. Из полученных данных видно, что исследуемое вещество подвергается длительному процессу элиминации, о чем свидетельствует значение периода полувыведения, а также среднее время удерживания (табл. 3.3).

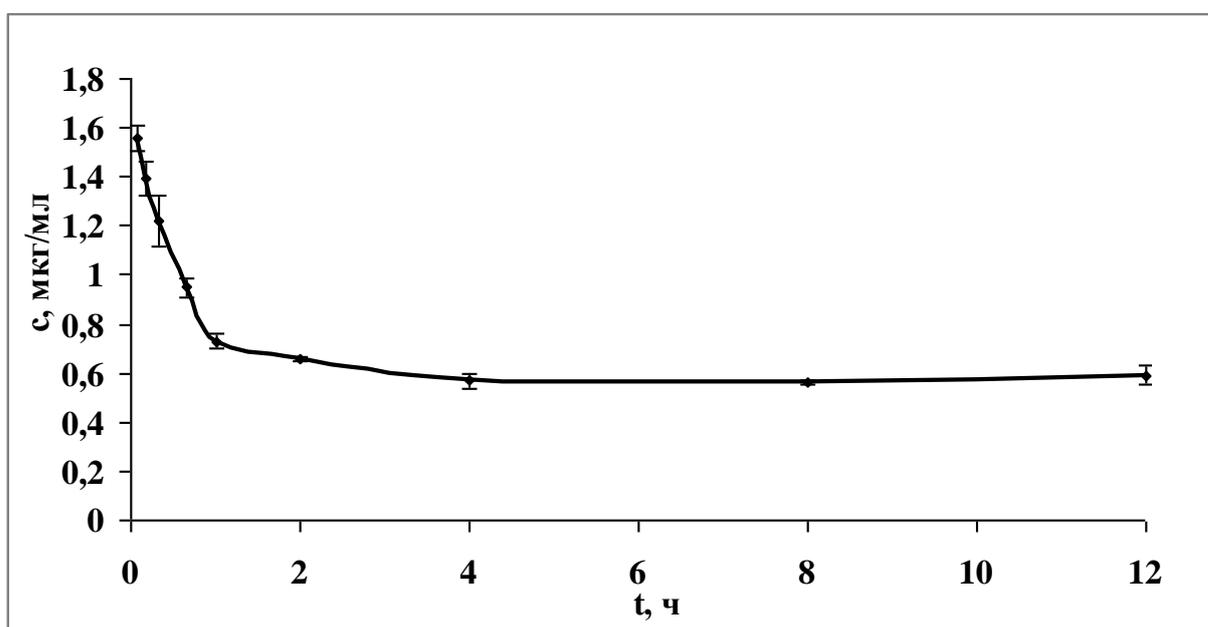


Рис. 3.5 Содержание соединения РУ-1205 в плазме крови крыс после внутривенного введения в дозе 10 мг/кг (n=5; $\bar{x} \pm SD$).

Обозначения: по оси абсцисс – время, ч; по оси ординат – концентрация соединения РУ-1205, мкг/мл.

Таблица 3.3

Фармакокинетические параметры соединения РУ - 1205 в плазме крови крыс при внутривенном введении в дозе 10 мг/кг

Параметры	Величины
AUC (мкг*час/мл)	14,76
Kel (час ⁻¹)	0,08
T _{1/2} (час)	8,49
MRT (час)	7,14
Cl (л/(час/кг))	0,87
Vd (л/кг)	8,30

3.3.2 Распределение в органах и тканях крыс.

Фармакокинетические параметры распределения соединения РУ-1205 в органах и тканях крыс представлены в таблице 3.4. Препарат хорошо и быстро проникает через гематоэнцефалический барьер. В мозге, органе потенциального действия, соединение РУ - 1205 появляется через 5 минут после введения в максимальной концентрации 11,07 мкг/г, затем постепенно снижается, определяясь до 14 часа исследования. Высокие показатели периода полувыведения и среднего времени удерживания свидетельствуют о низкой скорости снижения концентрации соединения в головном мозге.

В сальнике отмечается сходная тенденция, с большой тропностью к этим тканям. Однако максимальная концентрация соединения РУ-1205 в жировой ткани наблюдается через 40 минут. Время циркуляции 12 часов. Значения среднего времени удерживания и длительности периода полувыведения не превышают таковые в плазме крови.

В легких, селезенке и сердце вещество определяется в относительно меньших количествах. В данных органах максимальная концентрация отмечается через 5 минут после введения. При этом значения среднего времени удерживания и периода полувыведения значительно ниже таковых в плазме. В легких и сердце соединение РУ-1205 циркулирует на протяжении 4 часов, в селезенке на протяжении 8 часов.

Соединение РУ-1205 определяется в высоких концентрациях в почках и печени - органах элиминации. В обоих органах вещество определяется на

протяжении 12 и 14 часов соответственно для почек и печени. Однако тканевая доступность в почках практически в два раза ниже, чем в печени. Максимальная концентрация вещества в печени превышает таковую в почках практически в 4 раза. В результате анализа полученных фармакокинетических параметров можно сделать вывод, что в данных органах протекают интенсивные процессы элиминации изучаемого соединения.

Для мышечной ткани характерна низкая тканевая доступность. В данном органе вещество циркулирует на протяжении 1 часа.

Таким образом, соединение РУ-1205 обнаруживается во всех исследуемых органах и тканях, причем в распределении препарата прослеживается значительная гетерогенность. Соединение имеет наибольшую тропность к головному мозгу, печени, и жировой ткани, что, по-видимому, определяется его высокой липофильностью. Значительные количества вещества определяются в селезенке, почках, сердце и легких. В меньшей степени соединение накапливается в мышечной ткани.

Таблица 3.4

Фармакокинетические параметры распределения соединения РУ-1205 в органах и тканях при внутривенном введении крысам в дозе 10мг/кг.

Орган	AUC, мг*час/л	ft	Kd	T _{max} , час	C _{max} , мкг/г
Головной мозг	88,17	5,97	3,18	0,083	11,07
Печень	84,07	5,69	2,89	1,00	8,95
Сальник	72,31	4,89	3,47	0,66	8,11
Селезенка	43,45	2,94	4,72	0,083	9,46
Легкие	40,30	2,72	6,28	0,083	6,29
Почки	49,25	3,33	2,30	0,083	2,08
Сердце	27,66	1,87	3,30	0,083	5,06
Мышцы	7,53	0,51	2,72	0,33	3,74

3.3.3. Экскреция соединения РУ-1205

При изучении экскреции было выявлено, что соединение определяется в моче уже на второй час исследования, выделение достигает максимального

уровня к 24 часу и определяется в моче до 72 часов (Рис 3.6). При этом более 90 процентов экскретируемого соединения выделяется в первые 48 часов после введения. В результате полученных данных было установлено, что с мочой выделилось всего около 0,5 % неизменной субстанции от общего количества введенного препарата. Почечный клиренс составил 0,003 л/час, внепочечный значительно превышает ренальный и составляет 0,67 л/час. В кале соединение обнаруживается только через 12 часов после введения. Кумулятивно при данном пути экскреции вывелось порядка 0,2 % неизменного вещества. При хроматографических условиях, разработанных для соединения РУ-1205, на хроматограммах не было обнаружено дополнительных пиков. Несмотря на высокую интенсивность процессов элиминации соединения РУ-1205, суммарный вклад процессов экскреции неизменной субстанции составляет только 0,7 % от введенной дозы, что может свидетельствовать о выраженной способности вещества подвергаться процессам биотрансформации в организме крыс.

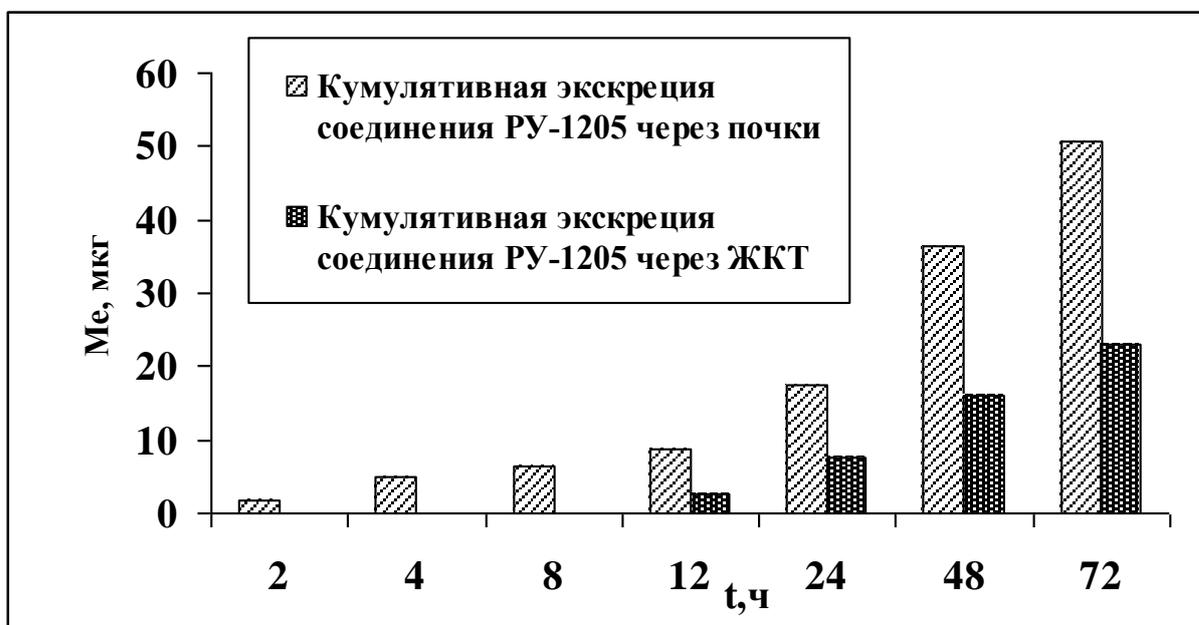


Рис. 3.6 Кумулятивная экскреция почками и через ЖКТ соединения РУ-1205 при внутривенном введении крысам в дозе 10 мг/кг.

Обозначения: по оси абсцисс – время, ч; по оси ординат – количество соединения РУ-1205, мкг.

3.4. Фармакокинетические свойства соединения РУ-1205 при пероральном введении.

3.4.1 Фармакокинетика в плазме крови крыс.

В результате проведенного исследования были получены усредненные фармакокинетические профили зависимости концентрации изучаемого вещества в плазме крови крыс от времени (Рис. 3.7). Было обнаружено, что кривая имеет фазу повышения концентрации или фазу всасывания, в течение которой происходит достижение максимальной концентрации в плазме крови. Вторая часть фармакокинетической кривой, характеризующая элиминацию соединения РУ-1205, носит монноэкспоненциальный характер. При введении внутрь исследуемое вещество быстро всасывается из ЖКТ, пик концентрации наблюдается через 1 ч после введения. При этом максимальная концентрации при пероральном введении уступает таковому показателю при внутривенном, несмотря на то, что при введении внутрижелудочно вводилась пятикратно превышающая доза. Соединение РУ-1205 определяется в плазме крови на протяжении 12 ч. Элиминация занимает длительное время, о чем свидетельствует значение периода полувыведения и показатель среднего времени удерживания одной молекулы (табл. 3.5). Кажущийся объем распределения превышает реальный объем организма крыс в 37,7 раз, что свидетельствует о депонировании и неравномерности распределения в органах и тканях. Величина абсолютной биодоступности при пероральном введении составила 37,34 %.

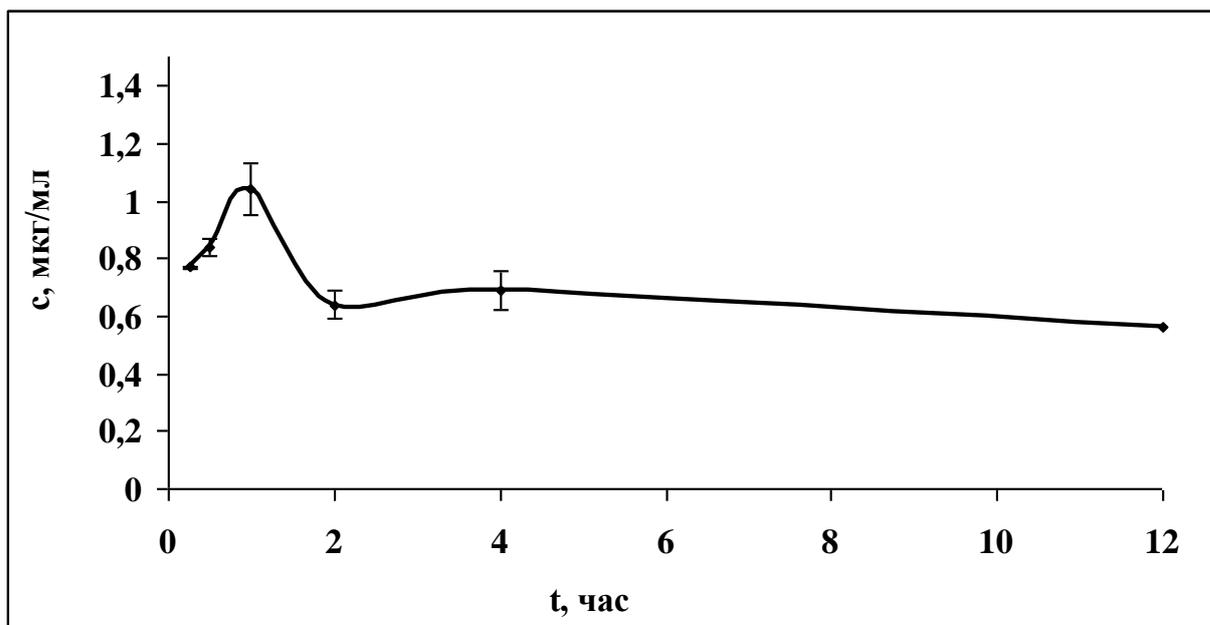


Рис. 3.7 Содержание соединения РУ-1205 в плазме крови крыс после перорального введения в дозе 50 мг/кг (n=5; $\bar{x} \pm SD$).

Обозначения: по оси абсцисс – время, ч; по оси ординат – концентрация соединения РУ-1205, мкг/мл.

Таблица 3.5

Фармакокинетические параметры соединения РУ-1205 в плазме крови крыс при пероральном введении в дозе 50 мг/кг

Параметры	Величины
AUC (мкг/мл/час)	27,56
Kel (час)	0,04
T _{1/2} (час)	17,76
MRT (час)	7,85
C _{max} (мкг/мл)	1,04
T _{max} (час)	1,00
Vd (л/кг)	43,88
Cl (л/час/кг)	1,81
F _{абс} , %	37,34

3.4.2 Распределение в органах и тканях крыс.

Фармакокинетические параметры распределения соединения РУ-1205 в органах и тканях крыс при пероральном введении субстанции соединения РУ-1205 представлены в таблице 3.6. В результате проведенного исследования было установлено, что изучаемое вещество проникает через

гематоэнцефалический барьер в концентрациях ниже пороговых [А.А. Спасов, 2013]. В органах элиминации – печени и почках, соединение определяется в течение 12 и 8 часов соответственно. Значение параметра тканевой доступности практически не отличается от такового при внутривенном введении.

В сальнике отмечается содержание РУ-1205 на протяжении 2 часов, при этом максимальная концентрация наблюдается через 1 час после введения и составляет 9,23 мкг/мл.

Таким образом, при пероральном введении соединение РУ-1205 обладает наибольшей тропностью к почкам. Фармакокинетические параметры исследуемого вещества при данном пути введения несколько отличаются от внутривенного. В частности, при приеме внутрь наибольшая концентрация наблюдается в почках, чем в печени. В сальнике максимальная концентрация не отличается при обоих путях введения, однако при пероральном введении по времени исследуемое соединение циркулирует в 5 раз меньше.

Таблица 3.6

Фармакокинетические параметры распределения соединения РУ-1205 в органах и тканях при пероральном введении крысам в дозе 50 мг/кг.

орган	AUC, мг*час/л	ft	Kd	T _{max} , час	C _{max} , мкг/г
Головной мозг	-	-	-	-	-
Печень	59,43	2,80	3,42	0,50	9,66
Почки	82,94	3,92	4,17	1,00	2,95
Сальник	26,65	1,26	10,32	1,00	9,23

3.4.3. Экскреция соединения РУ-1205

При изучении экскреции было выявлено, что соединение определяется в моче уже на второй час исследования, выделение достигает максимального уровня к 48 часу и определяется в моче до 96 часов (Рис 3.8). При этом более 90 процентов экскретируемого соединения выделяется в первые 60 часов

после введения. В результате полученных данных было установлено, что с мочой выделилось всего около 0,52 % неизменной субстанции от общего количества введенного препарата. Почечный клиренс составил 0,003 л/час, внепочечный значительно превышает ренальный и составляет 2,36 л/час. В кале соединение обнаруживается только через 12 часов после введения. Кумулятивно при данном пути экскреции вывелось порядка 0,02 % неизменного вещества. При хроматографических условиях, разработанных для соединения РУ-1205, на хроматограммах не было обнаружено дополнительных пиков. Несмотря на высокую интенсивность процессов элиминации соединения РУ-1205, суммарный вклад процессов экскреции неизменной субстанции составляет только 0,61 % от введенной дозы, что может свидетельствовать о выраженной способности вещества подвергаться процессам биотрансформации в организме крыс.

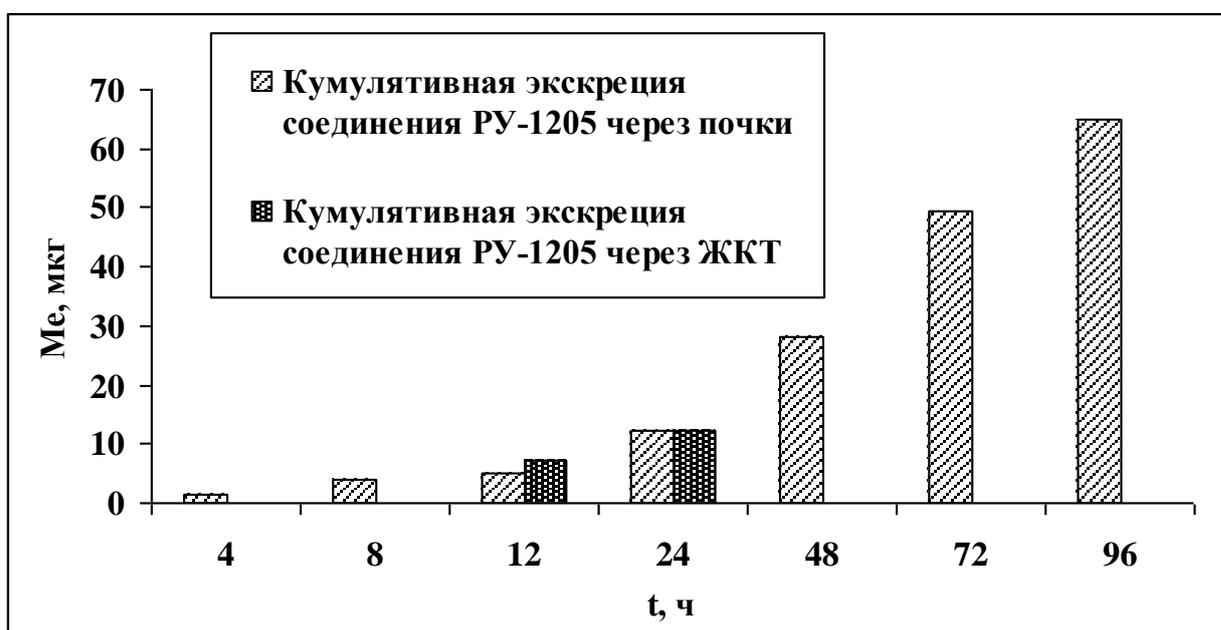


Рис. 3.8 Кумулятивная экскреция почками и через ЖКТ соединения РУ-1205 при пероральном введении крысам в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: по оси абсцисс – время, ч; по оси ординат – количество соединения РУ-1205, мкг.

3.5. Фармакокинетические свойства соединения РУ-1205 при подкожном введении.

3.5.1 Фармакокинетика в плазме крови крыс.

В результате проведенного исследования были получены усредненные фармакокинетические профили зависимости концентрации препарата в плазме крови крыс от времени (Рис. 3.9). При данном пути введения на графике отмечается фаза всасывания из места введения. Максимальная концентрация наблюдается через 30 минут после инъекции и составляет 13,54 мкг/мл. После этого концентрация быстро снижается, причем снижение носит моноэкспоненциальный характер, предполагая первоначальную быструю фазу распределения, сменяющуюся более медленной фазой элиминации и выходом на плато. Соединение определяется в плазме до 12 часа исследования. Основные фармакокинетические параметры, рассчитанные по зависимости концентрации соединения в плазме крови крыс от времени представлены в таблице 3.7. Площадь под фармакокинетической кривой при подкожном введении незначительно превосходит данный параметр при внутривенно введении. Однако период полувыведения и среднее время удерживания в организме крыс в два раза ниже при введении под кожу, что свидетельствует о более быстрой элиминации соединения. Кажущийся объем распределения превышает реальный объем организма крыс в несколько раз, что свидетельствует о депонировании и неравномерности распределения в органах и тканях. Величина абсолютной биодоступности при подкожном введении составила 49,02 %.

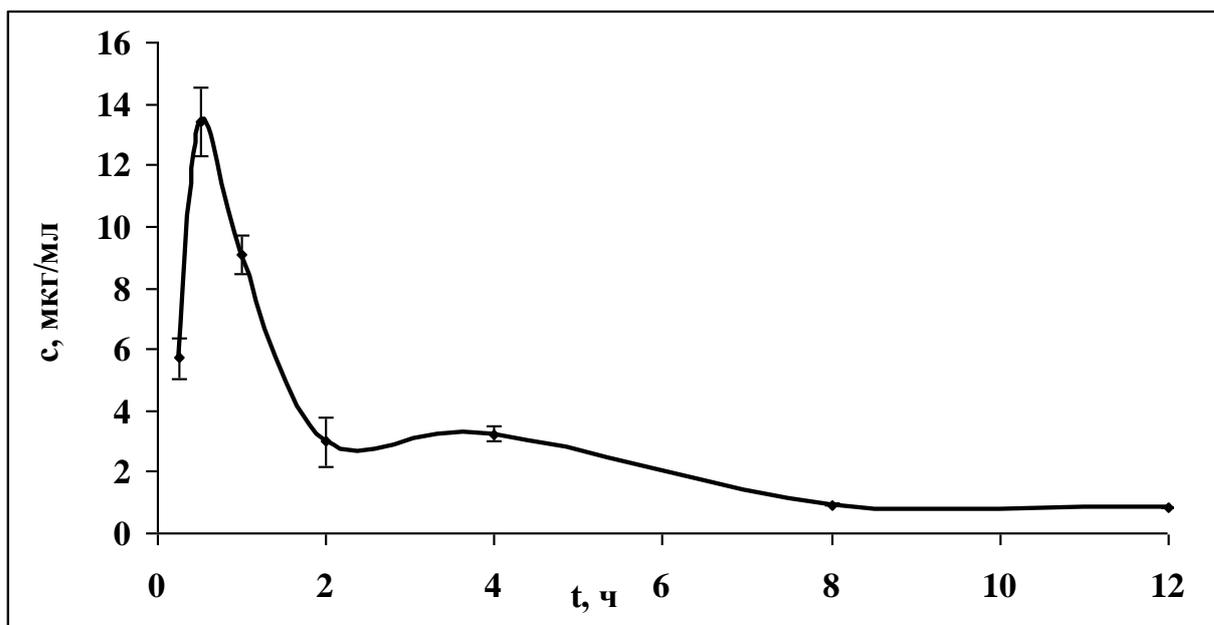


Рис. 3.9 Содержание соединения РУ-1205 в плазме крови крыс после подкожного введения в дозе 50 мг/кг (n=5; $\bar{x} \pm SD$).

Обозначения: по оси абсцисс – время, ч; по оси ординат – концентрация соединения РУ-1205, мкг/мл.

Таблица 3.7

Фармакокинетические параметры соединения РУ-1205 в плазме крови крыс при подкожном введении в дозе 50 мг/кг

Параметры	Значение
AUC (мкг/мл/час)	36,18
K_{el} (час)	0,24
$T_{1/2}$ (час)	3,36
MRT (час)	3,14
C_{max} (мкг/мл)	10,20
T_{max} (час)	0,50
Vd (л/кг)	5,71
Cl (л/час/кг)	1,38
F_{abs} , %	49,02

3.5.2 Распределение в органах и тканях крыс.

Фармакокинетические параметры распределения соединения РУ-1205 в органах и тканях крыс при подкожном введении субстанции соединения РУ-1205 представлены в таблице 3.8. В результате проведенного исследования было установлено, что изучаемое вещество обнаруживается в головном мозге –

органе потенциального действия – в высоких концентрациях. Исследуемое вещество обнаруживается в головном мозге на протяжении 12 часов.

В печени и почках соединение определяется также в течение 12 часов. Значение параметра тканевой доступности несколько уступает данному параметру при внутривенном введении.

Площадь под фармакокинетической кривой исследуемого вещества в органах и тканях крыс при данном пути введения примерно в два раза превышает данный показатель в плазме крови, а для головного мозга характерно отличие практически в три раза. Также было отмечено, что более высокие концентрации исследуемого вещества наблюдаются в печени, чем в почках.

Таблица 3.8

Фармакокинетические параметры распределения соединения РУ-1205 в органах и тканях при подкожном введении крысам в дозе 50 мг/кг.

орган	AUC, мг*час/л	ft	Kd	T _{max} , час	C _{max} , мкг/г
Головной мозг	70,14	1,93	2,48	4,00	3,08
Печень	92,09	2,54	2,14	2,00	6,38
Почки	51,58	1,42	2,09	0,50	6,02

3.5.3. Экскреция соединения РУ-1205

При изучении экскреции было выявлено, что соединение определяется в моче уже на второй час исследования, выделение достигает максимального уровня к 40 часу и определяется в моче до 72 часов (Рис 3.10). При этом более 90 процентов экскретируемого соединения выделяется в первые 48 часов после введения. В результате полученных данных было установлено, что с мочой выделилось всего около 0,4 % неизменной субстанции от общего количества введенного препарата. Почечный клиренс составил 0,001 л/час, внепочечный значительно превышает ренальный и составляет 1,38 л/час. В кале соединение обнаруживается через 12 часов после введения. Кумулятивно при данном пути экскреции вывелось порядка 0,18 % неизменного вещества. При

хроматографических условиях, разработанных для соединения РУ-1205, на хроматограммах не было обнаружено дополнительных пиков. Несмотря на высокую интенсивность процессов элиминации соединения РУ-1205, суммарный вклад процессов экскреции неизмененной субстанции составляет только 0,68 % от введенной дозы, что может свидетельствовать о выраженной способности вещества подвергаться процессам биотрансформации в организме крыс.

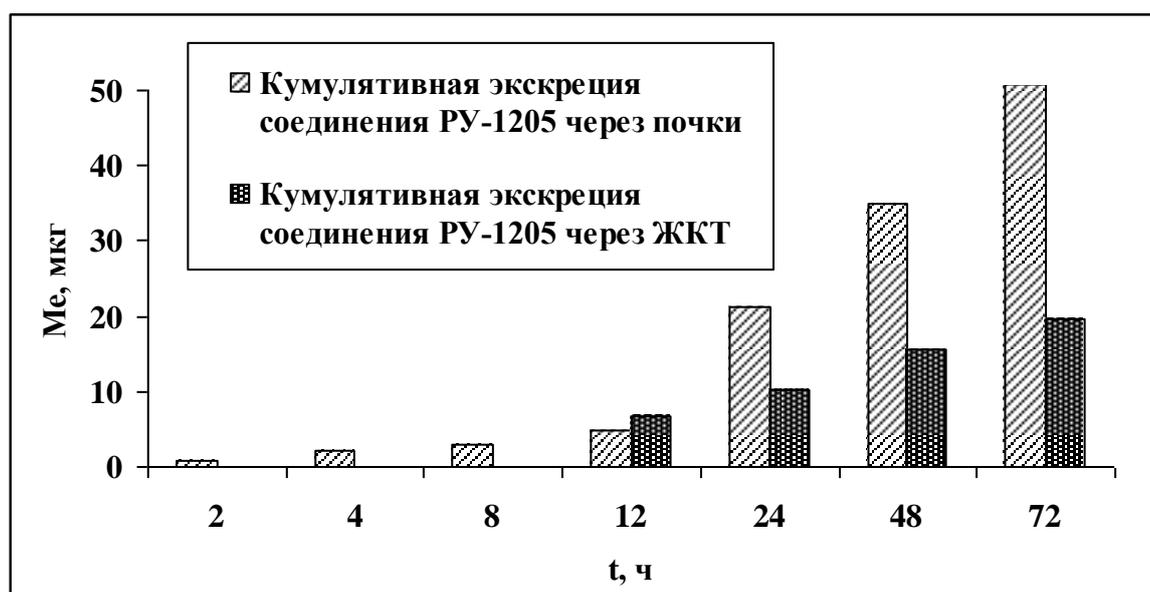


Рис. 3.10 Кумулятивная экскреция соединения РУ-1205 через почки и ЖКТ при подкожном введении крысам в дозе 50 мг/кг.

Обозначения: по оси абсцисс – время, ч; по оси ординат – количество соединения РУ-1205, мкг.

3.6 Зависимость фармакодинамических свойств от фармакокинетики соединения РУ-1205

3.6.1 Зависимость фармакодинамических свойств от фармакокинетики при пероральном введении.

При исследовании обезболивающих свойств соединения РУ-1205 было выявлено, что анальгетический эффект отмечается уже через 15 минут после введения, затем увеличивается и достигает максимума через 4 часа после введения, после чего плавно снижается и выходит на плато (Рис. 3.11). При этом продолжительность антиноцицептивного действия наблюдалась в течение

12 часов. Максимальная концентрация исследуемого вещества в плазме крови отмечалась через 1 час после введения. При этом отмечались стадии всасывания и элиминации с последующим выходом концентрации на плато.

При сопоставлении фармакокинетических и обезболивающих свойств было обнаружено, что разница в максимальном эффекте и пике концентрации составляет 3 часа. Столь значительную разницу можно объяснить особенностями прохождения соединения РУ-1205 через гематоэнцефалический и печеночный барьер. Следует отметить, что при данном пути введения изучаемое соединение проникает в головной мозг в концентрациях ниже пороговых. Накопленные данные позволяют сделать вывод о том, что при метаболизме соединения РУ-1205, возможно, образуются активные метаболиты, обладающие анальгетическими свойствами.

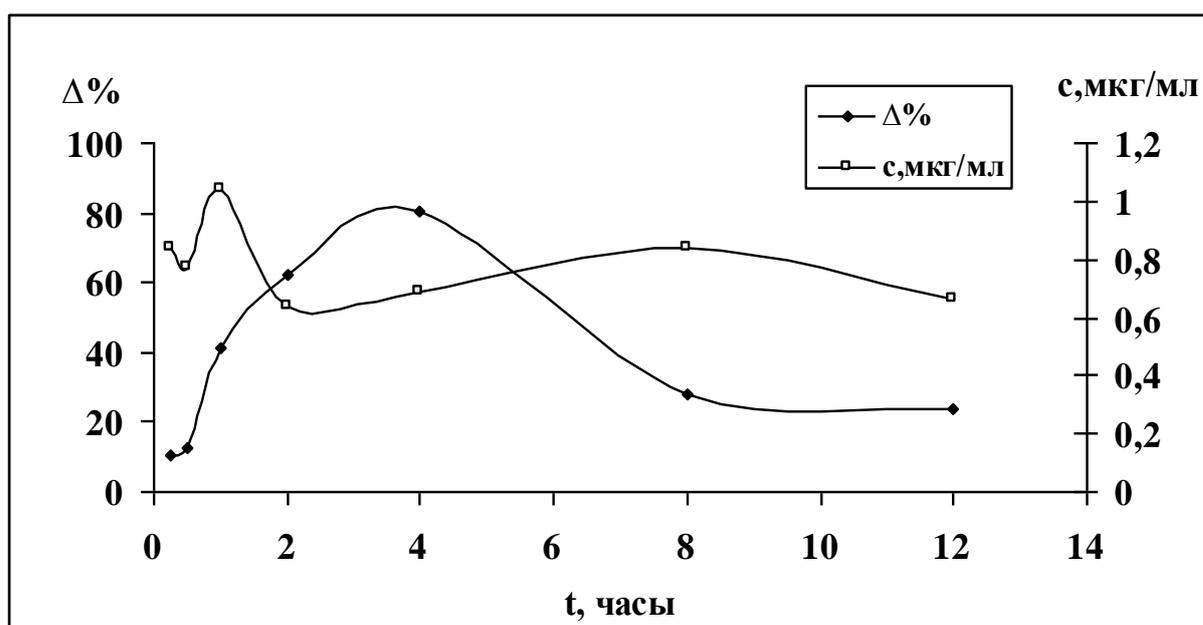


Рис. 3.11 Зависимость порога болевой чувствительности (в % по отношению к контролю) от содержания соединения в плазме крови и времени после перорального введения крысам.

Обозначения: по оси абсцисс – время (часы), по левой оси ординат – изменение порога болевой чувствительности ($\Delta\%$ по отношению к контролю), по правой оси ординат – концентрация соединения в плазме крови (мкг/мл).

3.6.2 Зависимость фармакодинамических свойств от фармакокинетики при подкожном введении.

При подкожном введении соединение РУ-1205 на модели электрического раздражения проявляло выраженную анальгетическую активность с максимальным эффектом через 2 часа после введения. Антиноцицептивный эффект сохранял статистически значимые величины по отношению к контрольной группе животных до 4 часов экспериментального исследования.

При данном пути введения соединение РУ-1205 циркулирует в плазме крови на протяжении 12 ч. Максимальная концентрация наблюдается через 30 мин после введения, после чего происходит резкое снижение ее значения. Начиная со второго часа исследования, концентрация соединения РУ-1205 находится в состоянии равновесия.

При изучении взаимосвязи фармакокинетических и обезболивающих свойств отмечается разница во времени достижения пика концентрации и максимального антиноцицептивного эффекта соединения РУ-1205, что можно объяснить особенностями прохождения через гематоэнцефалический барьер. Также было отмечено, что через 8 часов исследования наблюдается повторное незначительное увеличение анальгетического эффекта, в то время как концентрация находится в состоянии равновесия (рис.3.12). Данные результаты свидетельствуют о возможном наличии активных метаболитов.

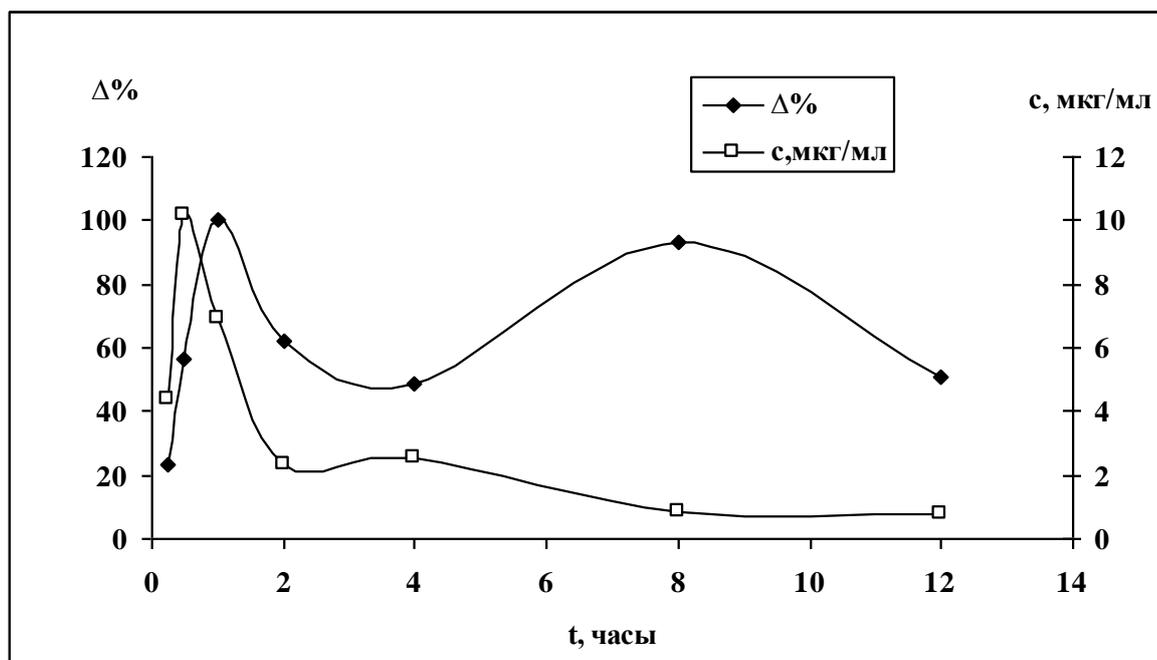


Рис. 3.12 Зависимость порога болевой чувствительности (в % по отношению к контролю) от содержания соединения в плазме крови и времени после подкожного введения крысам.

Обозначения: по оси абсцисс – время (часы), по левой оси ординат – изменение порога болевой чувствительности ($\Delta\%$ по отношению к контролю), по правой оси ординат – концентрация соединения в плазме крови (мкг/мл).

3.7 Метаболизм соединения РУ-1205

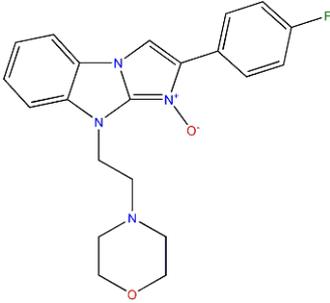
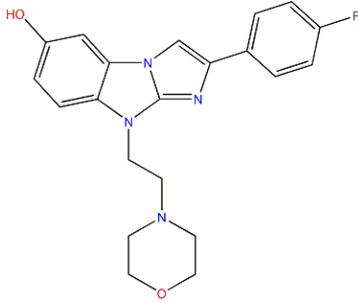
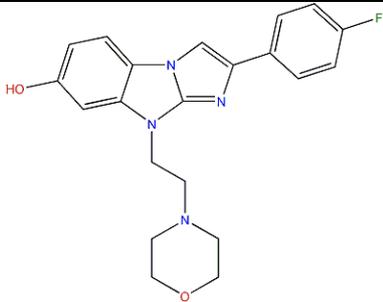
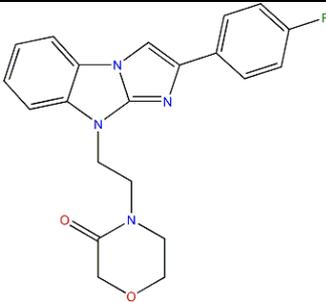
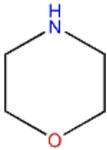
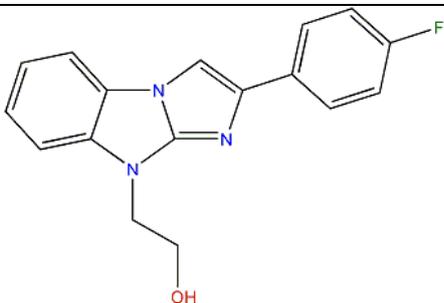
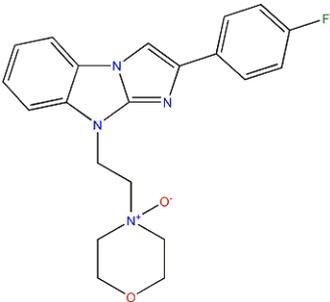
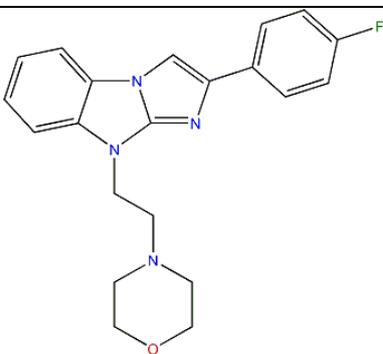
3.7.1 Определение путей метаболизма соединения РУ-1205 *in silico*

При проведении компьютерного прогноза возможных химических структур метаболитов соединения РУ-1205 было определено, что образуются в основном продукты окислительных реакций – метаболиты 1, 4, и 7. Для изучаемого вещества характерны также реакции гидроксилирования – метаболиты 2, 3 и 6. У метаболита № 6 отмечен отрыв морфолинового цикла. Следует отметить, что во всех образующихся соединениях сохраняется фторфенильный радикал, участвующий в развитии обезболивающего эффекта. Для всех метаболитов, кроме № 6 и № 5 характерно сохранение морфолинового радикала, который также участвует в развитии анальгетической реакции.

Таким образом, было отмечено, что соединение РУ-1205 подвергается в основном реакциям окисления и в частности - гидроксилирования.

Таблица 3.10

Возможные метаболиты соединения РУ-1205, полученные по результатам прогноза в программе «PALLAS 3.00».

Метаболит 1	Метаболит 2
	
Метаболит 3	Метаболит 4
	
Метаболит 5	Метаболит 6
	
Метаболит 7	Базовая структура РУ-1205
	

3.7.2 Ферментативный, щелочной и кислотный гидролиз

При всех трех путях введения после проведения ферментативного, щелочного и кислотного гидролизом мочи и кала на хроматограммах, при разработанных хроматографических условиях, не было обнаружено дополнительных пиков.

3.7.3 Взаимодействие соединения РУ-1205 с тест-субстратами некоторых изоформ СYP450

При исследовании продолжительности сна под влиянием специфических тест-субстратов некоторых изоформ системы СYP450 было выявлено, что статистически значимо изменяются мидазоламный, алпразоламный и гексеналовый типы снов (табл. 3.9). При этом первый из них соединение РУ-1205 укорачивает, а последующие – пролонгирует. Однако, наиболее существенное изменение снотворного эффекта тест-субстратов наблюдается при фармакологическом взаимодействии изучаемого вещества с алпразоламом и гексеналом. В тесте с хлоралгидратом, который подвергается активному конъюгированию с глюкуроновой кислотой во вторую фазу метаболизма, не было обнаружено статистически значимых изменений времени сна. Необходимо также отметить, что изоформы СYP2B1 и СYP2B2 отвечают главным образом за гидроксилирование ксенобиотиков, а СYP3A1 и СYP2C9 – за их окисление [Кукес В.Г., 2012].

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что соединение РУ-1205 подвергается активному метаболизму под воздействием микросомальных ферментов печени. При этом, скорее всего, образуются окисленные и гидроксилированные метаболиты. Реакциям метаболизма второй фазы – конъюгирования – изучаемое фармакологическое вещество, вероятно, не подвергается. Полученные в ходе экспериментов *in vitro* данные подтверждаются также результатами компьютерного прогноза.

Таблица 3.9

Изменение продолжительности сна крыс, вызванного специфическими тест-субстратами системы CYP450, на фоне предварительного перорального введения соединения РУ-1205 в дозе 1 мг/кг

Тест-субстрат	I фаза (изофермент системы CYP450)	Изменение продолжительности сна крыс		
		Контроль, мин (M±m)	Опыт, мин (M±m)	Δ %
Мидазолам	CYP3A1, CYP2C	101,11±6,28	72,04±8,67*	-28,74 %
Алпразолам	CYP3A1	108,88±13,21	175,13±8,93*	60,85 %
Гексенал	CYP2C9, CYP2B1 и CYP2B2	56,44±2,23	77,5±4,24*	37,29 %
	II фаза			
Хлоралгидрат	Глюкоронилтрансфераза	71,48±7,14	59,59±4,45	-21,87 %

* - статистически значимо по отношению к контролю ($p \leq 0,05$) по t-критерию Стьюдента.

3.8 Заключение

Разработанный метод количественного определения соединения РУ-1205 в биологических пробах является валидированным, селективным и чувствительным, что позволяет эффективно использовать его для проведения фармакокинетических исследований.

В диапазоне доз от 1 до 50 мг/кг фармакокинетика изучаемого вещества является линейной, что подтверждается данными регрессионного анализа. Коэффициент аппроксимации составляет 0,98.

При внутривенном введении соединение обнаруживается в плазме крови через 5 минут после введения и циркулирует в ней на протяжении 12 часов исследования. Распределяется по всем изученным органам и тканям организма крыс, обладая наибольшей тропностью к головному мозгу – органу мишени, печени и почкам, а также к жировой ткани. В данных органах отмечаются более высокие концентрации, чем в плазме крови. Меньшие количества обнаруживаются в высокоvascularизированных тканях – сердце, легких и селезенке. Наименьшие количества отмечаются в мышечной ткани. Экскретируется в основном почками на протяжении 72 часов. Суммарное

количество неизмененного вещества, выведенного из организма составило порядка 0,7 % от введенной дозы.

При пероральном введении исследуемое вещество подвергается процессам абсорбции, выходу на максимальное значение, стадией элиминации и дальнейшим состоянием равновесия. Максимальное значение концентрации соединения РУ-1205 через 1 час после введения. Изучаемое вещества циркулирует в плазме крови на протяжении 12 часов. При этом в крови отмечаются низкие концентрации неизмененного вещества, относительно введенной дозы, что подтверждает возможное прохождение соединения через печеночный барьер. Абсолютная биодоступность субстанции соединения РУ-1205 составляет 37,34 %. Распределяется в органы элиминации – печень и почки, а также в жировую ткань. Необходимо отметить, что при пероральном пути введения соединение РУ-1205 проникает через гематоэнцефалический барьер в концентрации меньшей, чем порог определения. Экскретируется преимущественно почками на протяжении 96 часов. Суммарно при данном пути введения выводится 0,61 % от введенной дозы.

При подкожном введении для соединения РУ-1205 в плазме крови крыс характерны также процессы всасывания из места введения, достижение максимальной концентрации через 30 минут после инъекции и носит моноэкспоненциальный характер снижения концентрации. Абсолютная биодоступность субстанции соединения РУ-1205 составляет 49,02 %. Распределяется в головной мозг, печень и почки с высокой степенью тропности к данным органам. Экскретируется преимущественно почками. Суммарно неизмененного вещества при данном пути введения выводится 0,68%.

В результате анализа данных зависимости фармакокинетических свойств соединения РУ-1205 от обезболивающего эффекта при пероральном и подкожном путях введения установлено, что время достижения максимального значения и пиковой концентрации в плазме крови существенно отличаются. Необходимо отметить, что при подкожном введении на 8 часу исследования наблюдается вторая волна анальгетического эффекта без возрастания

концентрации в плазме крови. При внутривенном введении отмечается, что значительный антиноцицептивный эффект наблюдается даже при отсутствии неизмененного соединения в центральной нервной системе.

В процессе изучения возможных метаболитов соединения РУ-1205 было задействовано три метода. При прогнозе метаболизма изучаемого вещества *in silico* были выявлены 7 возможных метаболитов, которые являются продуктами реакций окисления и, в частности – гидроксирования. При этом было отмечено, что у 6 молекул в химической структуре сохранены фрагменты, возможно, участвующие в развитии анальгетического действия.

На втором этапе исследования метаболизма соединения РУ-1205 была предпринята попытка получить базовую химическую структуру изучаемого вещества при проведении ферментативного, кислотного или щелочного гидролиза в экскретах крыс. Однако при дальнейшем хроматографическом исследовании на хроматограммах не было выявлено пиков, характеризующих исходную структуру.

При конкурентном взаимодействии соединения РУ-1205 со специфическими тест-субстратами изоформ Р450 было выявлено, что продуктами реакций биотрансформации соединения РУ-1205 также служат окисленные формы метаболитов. Наиболее вероятно образование гидроксированных производных.

Накопленный материал позволяет заключить, что исследуемое соединение подвергается активным процессам биотрансформации в организме животных. Данный вывод подтверждается низкими значениями концентрации неизмененного вещества, относительно введенной дозы, в плазме крови, также низким содержанием исходной субстанции в экскретах крыс. Результаты анализа зависимости фармакокинетических свойств от фармакодинамики подтверждают наличие возможной биотрансформации соединения РУ-1205, в том числе с образованием активных метаболитов. Результаты анализа метаболизма *in silico* и *in vivo* изучаемого вещества показали, что с большой вероятностью происходит образование окисленных продуктов реакции.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1205 В ВИДЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ.

Одним из важных этапов фармакокинетического изучения нового фармакологически активного соединения является исследование его относительной биодоступности. Основной целью таких исследований является получение доказательств идентичности фармакокинетических свойств лекарственных форм изучаемого вещества по отношению к субстанции [А.А. Фисенко, В.П. Жердев и др., 2013]. Важно отметить, что определение относительной биодоступности имеет большое значение при выборе оптимальной лекарственной формы. Такие процессы как всасывание, распределение, метаболизм и выведение лекарственного соединения подвержены влиянию множества факторов. Скорость всасывания зависит от лекарственной формы препарата, концентрации действующего вещества, рН среды, в которой происходит растворение вещества, перистальтики кишечника и состояния площади поверхности всасывания [Иванникова Е.В., Жердев В.П. и др., 2013].

4.1 Относительная биодоступность твердых лекарственных форм соединения РУ-1205

4.1.1. Относительная биодоступность таблеток, покрытых оболочкой, соединения РУ-1205

Фармакокинетическая кривая соединения РУ-1205 в виде твердой лекарственной формы представлена в сравнении с фармакокинетической кривой, полученной при введении субстанции (Рис. 4.1). Основные фармакокинетические параметры лекарственной формы и субстанции соединения РУ-1205 при пероральном введении кроликам приведены в таблице 4.1.

При пероральном введении субстанции РУ-1205, соединение быстро всасывается. Фармакокинетическая кривая вещества носит биэкспоненциальный характер. Максимальная концентрация наблюдается к 15

минуте после введения. Затем происходит резкое снижение содержания вещества в плазме, наблюдается фаза распределения, следующий за ней выход на плато. Соединение циркулирует в плазме крови на протяжении 12 часов.

При введении соединения РУ-1205 в виде таблеток, покрытых оболочкой, всасывание вещества происходит медленнее и достигает максимальной концентрации ко 2 часу. После чего содержание исследуемого соединения в плазме крови кроликов плавно уменьшается и к 12 часу эксперимента составляет 0,5 мкг/мл. Фармакокинетическая кривая носит моноэкспоненциальный характер.

При сравнении основных фармакокинетических параметров было установлено, что статистически значимо отличаются среднее время удерживания одной молекулы в организме кроликов и кажущийся объем распределения. Остальные показатели не имеют статистически значимых отличий. Следует отметить, что при введении соединения РУ-1205 в виде субстанции и лекарственной формы время достижения максимальной концентрации отличается на 1 час 45 минут, в то время как само значение максимальной концентрации не отличается.

Относительная биодоступность при введении таблеток, покрытых оболочкой, составила $105,3 \pm 11,70\%$.

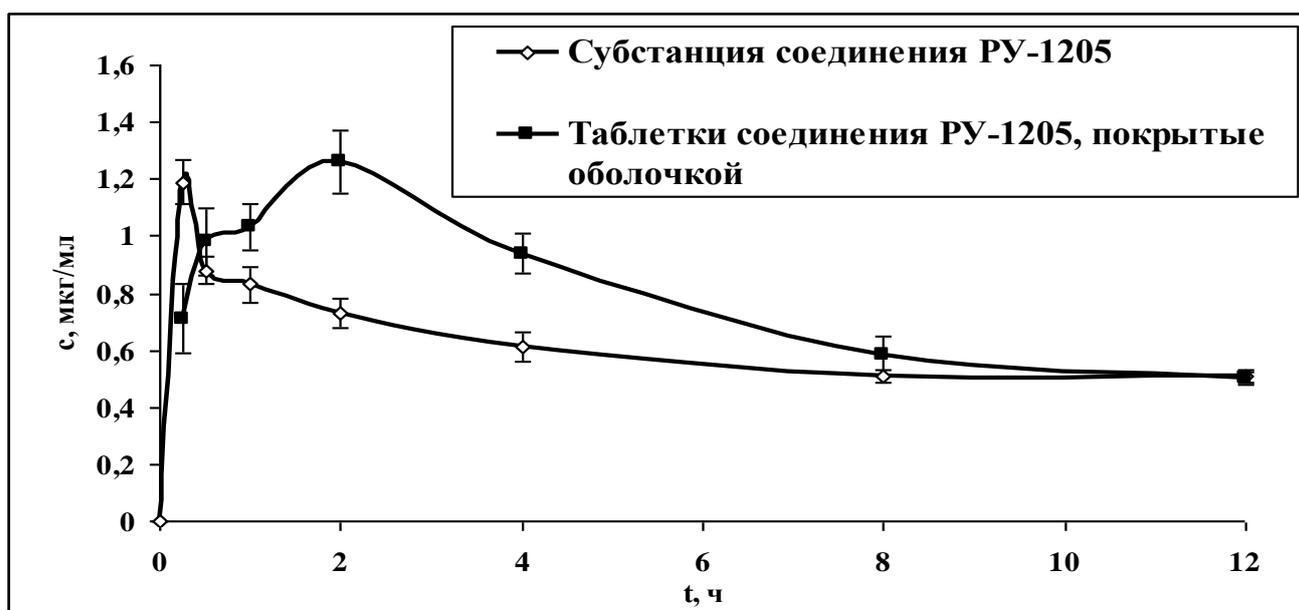


Рис. 4.1 Содержание соединения PY-1205 в плазме крови кроликов при пероральном введении таблеток, покрытых оболочкой, в сравнении с субстанцией в дозе 50 мг/кг (n=5; $\bar{x} \pm SD$).

Обозначения: по оси абсцисс – время (час); по оси ординат – концентрация, мкг/мл

Таблица 4.1

Фармакокинетические параметры таблеток соединения PY-1205 в сравнении с субстанцией после однократного введения внутрь кроликам в дозе 50 мг/кг ($M \pm m$).

Фармакокинетический параметр	Субстанция	Таблетки, покрытые оболочкой
AUC (мкг/мл)*ч	14,7±1,20	15,6±1,40
T1/2, час	10,0±1,25	7,6±2,40
Kel	0,07±0,007	0,09±0,025
MRT, час	7,3±0,30	6,0±0,95*
Cl, л/час/кг	3,4±0,30	3,2±0,30
Vd, л/кг	49,2±2,30	34,8±7,5*
F _{отн} , %	-	105,3±11,70

* - статистически значимо по отношению к группе животных, которым вводили субстанцию соединения PY-1205 ($p \leq 0,05$) по t-критерию Стьюдента.

4.1.2 Относительная биодоступность капсул соединения PY-1205

Фармакокинетическая кривая соединения PY-1205 в виде твердой лекарственной формы – капсул - представлена в сравнении с фармакокинетической кривой, полученной при введении субстанции (Рис. 4.2).

Основные фармакокинетические параметры лекарственной формы и субстанции соединения РУ-1205 при пероральном введении кроликам приведены в таблице 4.2.

При пероральном введении субстанции РУ-1205, соединение быстро всасывается. Фармакокинетическая кривая вещества носит биэкспоненциальный характер. Максимальная концентрация наблюдается к 15 минуте после введения. Затем происходит резкое снижение содержания вещества в плазме, наблюдается фаза распределения, следующий за ней выход на плато. Соединение циркулирует в плазме крови на протяжении 12 часов.

При введении соединения РУ-1205 в виде капсул всасывание вещества происходит медленнее и достигает максимальной концентрации ко 2 часу. После чего содержание исследуемого соединения в плазме крови кроликов плавно уменьшается и к 12 часу эксперимента составляет 0,6 мкг/мл. Фармакокинетическая кривая носит моноэкспоненциальный характер.

При сравнении основных фармакокинетических параметров было установлено, что все изученные показатели не имеют статистически значимых отличий. Также следует отметить, что при введении соединения РУ-1205 в виде субстанции и лекарственной формы время достижения максимальной концентрации отличается на 1 час 45 минут. Значение максимальной концентрации также отличается в 1,2 раза.

Относительная биодоступность при введении капсул составила $109,53 \pm 6,76$ %.

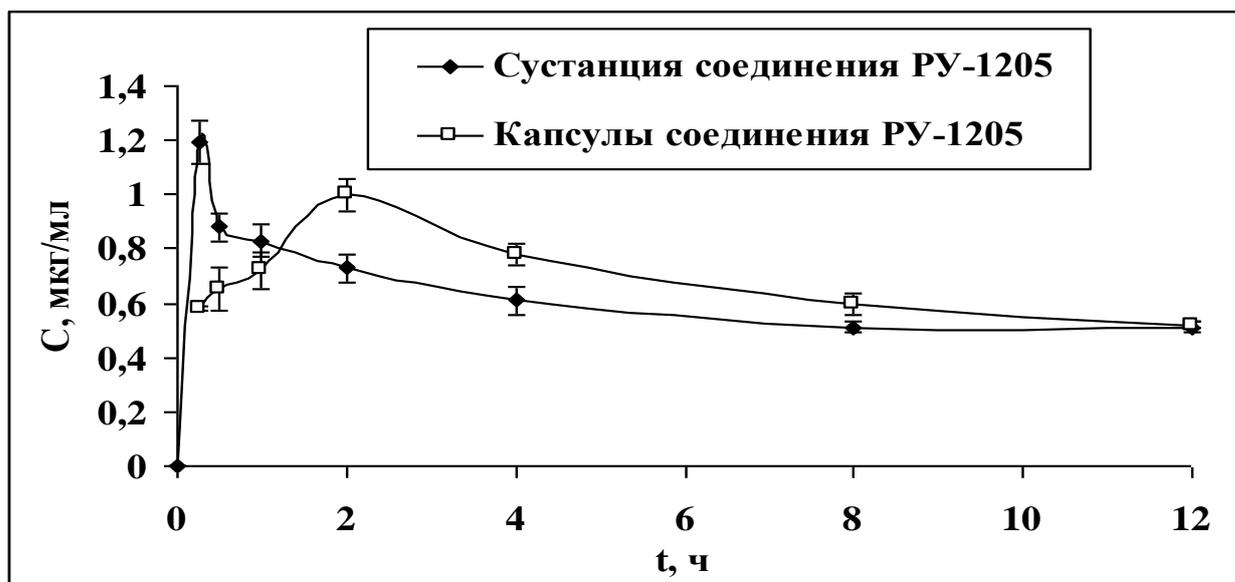


Рис. 4.2 Содержание соединения РУ-1205 в плазме крови кроликов при пероральном введении капсул в сравнении с субстанцией в дозе 50 мг/кг (n=5; $\bar{x} \pm SD$).

Обозначения: по оси абсцисс – время (час); по оси ординат – концентрация, мкг/мл

Таблица 4.2

Фармакокинетические параметры капсул соединения РУ-1205 в сравнении с субстанцией после однократного перорального введения кроликам в дозе 50 мг/кг ($M \pm m$).

Фармакокинетический параметр	Субстанция	Капсулы
AUC (мкг/мл)*ч	14,69±1,20	16,09±1,28
T1/2, час	10,04±1,25	10,60±1,44
Kel	0,07±0,007	0,06±0,008
MRT, час	7,30±0,33	7,27±0,39
Cl, л/час/кг	3,41±0,26	3,11±0,24
Vd, л/кг	49,20±2,28	47,37±,70
F _{отн} , %	-	109,53±6,76

* - статистически значимо по отношению к группе животных, которым вводили субстанцию соединения РУ-1205 ($p \leq 0,05$) по t-критерию Стьюдента.

4.1.3 Межвидовые различия фармакокинетических свойств соединения РУ-1205 при пероральном введении

При пероральном введении кроликам и крысам наблюдаются существенные различия в фармакокинетических параметрах. Максимальная

концентрация в плазме крови крыс отмечается через 1 час после введения, в то время как у кроликов – через 15 минут (Рис. 4.3). Значение пика концентрации практически не отличается. При анализе фармакокинетических параметров установлено, что из организма крыс соединение элиминирует дольше, о чем свидетельствуют параметры периода полувыведения и среднего времени удерживания. Абсолютная биодоступность субстанции соединения у кроликов в 1,5 раза выше, чем у крыс (табл. 4.3). Таким образом, фармакокинетические свойства соединения РУ-1205 у крыс и кроликов не имеет существенных отличий, а разница в скорости наступления C_{max} , вероятно связана с более высокой метаболической активностью в организме крыс [Harashima H., 1996].

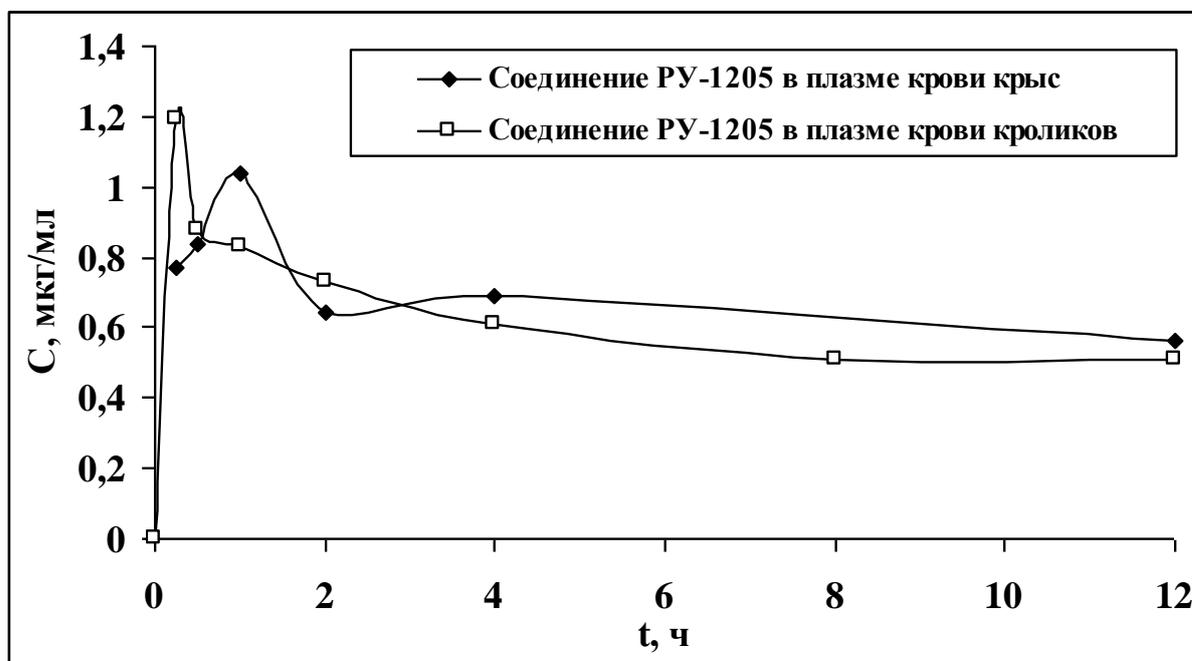


Рис. 4.3 Содержание соединения РУ-1205 в плазме крови крыс и кроликов после перорального введения в дозе 50 мг/кг ($n=5$; $x \pm SD$).

Обозначения: по оси абсцисс – время, ч; по оси ординат – концентрация соединения РУ-1205, мкг/мл.

Таблица 4.3

Фармакокинетические свойства субстанции соединения РУ-1205 при пероральном пути введения крысам и кроликам.

Параметры	Внутривенное введение	
	Крысы	Кролики
AUC (мкг*час/мл)	27,56	15,65
Kel (час ⁻¹)	0,04	0,09
T _{1/2} (час)	17,76	7,65
MRT (час)	7,85	5,97
Cl (л/(час/кг))	1,81	3,2
Vd (л/кг)	43,88	34,78
F _{абс} , %	37,34	52,71

4.2 Относительная биодоступность инъекционной лекарственной формы соединения РУ-1205

4.2.1 Относительная биодоступность инъекционной лекарственной формы соединения РУ-1205 при внутривенном пути введения

Фармакокинетическая кривая соединения РУ-1205 в виде лиофилизата представлена в сравнении с фармакокинетической кривой, полученной при введении субстанции (Рис. 4.4). Основные фармакокинетические параметры лекарственной формы и субстанции соединения РУ-1205 при внутривенном введении кроликам приведены в таблице 4.4.

При внутривенном введении субстанции соединения РУ-1205 максимальная концентрация наблюдается через 5 минут после введения. Затем происходит резкое снижение концентрации и выход на плато. Фармакокинетическая кривая вещества носит биэкспоненциальный характер. Соединение циркулирует в плазме крови на протяжении 12 часов.

При внутривенном введении соединения РУ-1205 в виде лиофилизата максимальная концентрация наблюдается также через 5 минут от начала эксперимента. После чего содержание исследуемого соединения в плазме крови кроликов резко уменьшается и к 12 часу эксперимента составляет 0,5 мкг/мл. Фармакокинетическая кривая носит моноэкспоненциальный характер.

При сравнении основных фармакокинетических параметров было установлено, что статистически значимо отличаются период полувыведения и среднее время удерживания одной молекулы в организме кроликов. Остальные показатели не имеют статистически значимых отличий. Накопленный материал позволяет заключить, что при введении соединения РУ-1205 в виде субстанции и лекарственной формы время достижения максимальной концентрации не отличается, в то время как само значение максимальной концентрации имеет разницу в 1,3 раза.

Относительная биодоступность при внутривенном введении лиофилизата составила $98,72 \pm 8,72$ %.

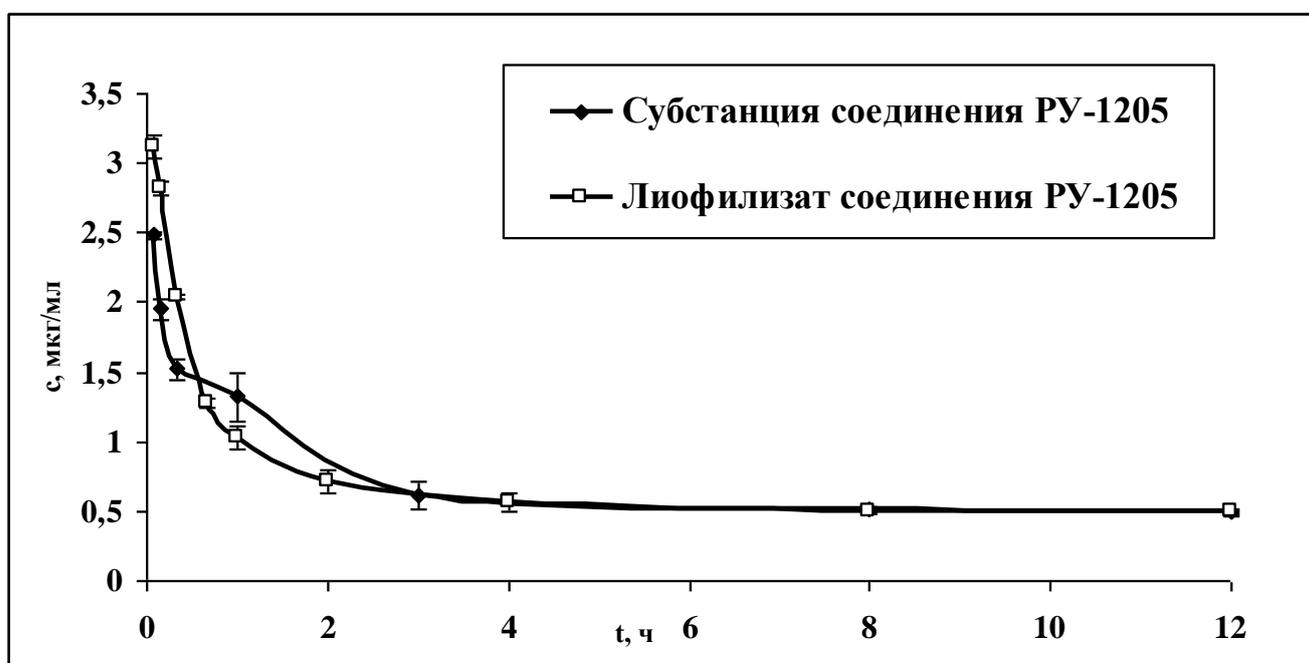


Рис. 4.4 Содержание соединения РУ-1205 в плазме крови кроликов при внутривенном введении лиофилизата в сравнении с субстанцией (n=5; $\bar{x} \pm SD$).

Обозначения: по оси абсцисс – время (час); по оси ординат – концентрация мкг/мл

Таблица 4.4

Фармакокинетические параметры лиофилизата соединения РУ-1205 в сравнении с субстанцией после однократного внутривенного введения кроликам в дозе 10 мг/кг ($M \pm m$).

Фармакокинетический параметр	Субстанция	Лиофилизат
AUC (мкг/мл)*ч	11,93±0,47	11,65±0,65
T _{1/2} , час	5,12±0,10	4,55±0,06*
Kel	0,13±0,0013	0,15±0,002
MRT, час	5,2±0,13	7,01±0,24*
Cl, л/час/кг	0,83±0,03	0,85±0,45
Vd, л/кг	5,2±0,16	5,65±0,33
F _{отн} , %	-	98,72±8,72

* - статистически значимо по отношению к группе животных, которым вводили субстанцию соединения РУ-1205 ($p \leq 0,05$) по t-критерию Стьюдента.

4.2.2 Межвидовые различия фармакокинетических свойств соединения РУ-1205 при внутривенном введении

При внутривенном введении соединения РУ-1205 кроликам и крысам было установлено, что фармакокинетические параметры носят сходный характер (Табл. 4.5). У обоих видов животных отмечается несущественная разница в значении площади под фармакокинетической кривой. Однако, несмотря на практически равные значения данного параметра, максимальная концентрация в плазме крови кроликов превосходит тот же параметр у крыс (Рис. 4.5). Кроме того, для фармакокинетической кривой соединения РУ-1205 в плазме крови кроликов отмечается биэкспоненциальный характер, а для крыс – моноэкспоненциальный. Наиболее выражены различия также в периоде полувыведения – у крыс он практически вдвое превосходит таковой у кроликов. Вероятно, межвидовые отличия соединения РУ-1205 при внутривенном введении связаны с различной скоростью инъекции раствора изучаемого вещества.

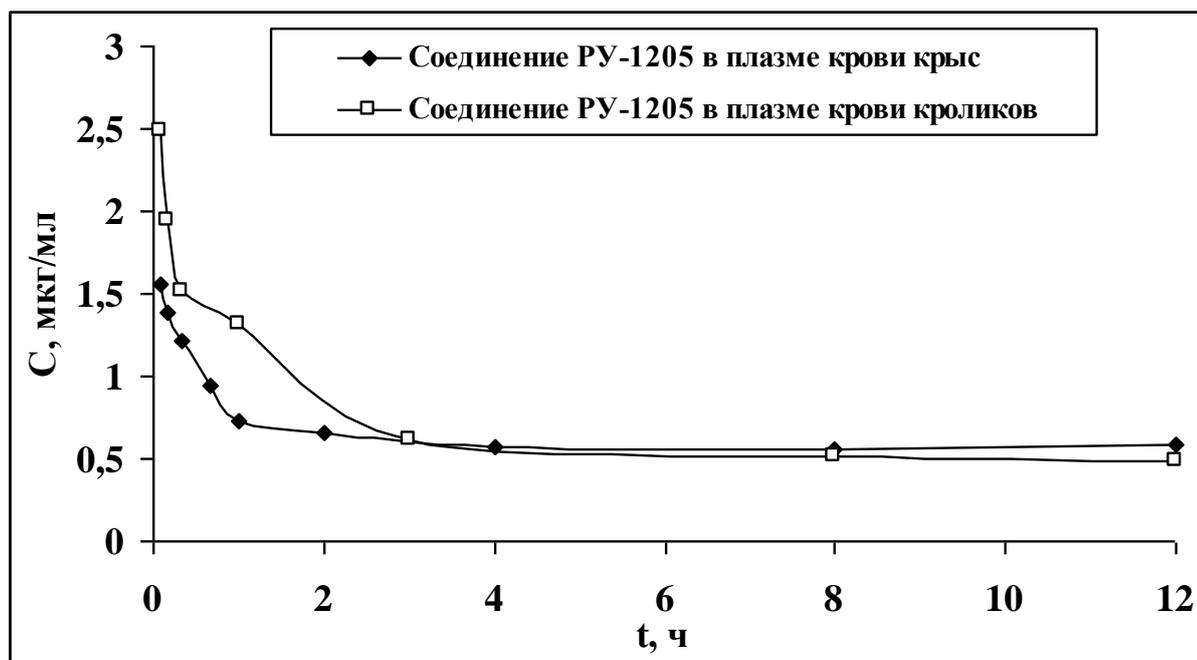


Рис. 4.5 Содержание соединения РУ-1205 в плазме крови крыс и кроликов после внутривенного введения в дозе 10 мг/кг (n=5; $\bar{x} \pm SD$).

Обозначения: по оси абсцисс – время, ч; по оси ординат – концентрация соединения РУ-1205, мкг/мл.

Таблица 4.5

Фармакокинетические свойства субстанции соединения РУ-1205 при внутривенном пути введения крысам и кроликам.

Параметры	Внутривенное введение	
	Крысы	Кролики
AUC (мкг*час/мл)	14,76	11,93
Kel (час ⁻¹)	0,08	0,13
T _{1/2} (час)	8,49	5,02
MRT (час)	7,14	5,1
Cl (л/(час/кг))	0,87	0,83
Vd (л/кг)	8,30	6,2

4.2.3 Относительная биодоступность инъекционной лекарственной формы соединения РУ-1205 при подкожном пути введения

Фармакокинетическая кривая действующего компонента при введении лиофилизата представлена в сравнении с фармакокинетической кривой, полученной при введении субстанции (Рис. 4.6). В проведенных исследованиях определены основные фармакокинетические параметры

инъекционной лекарственной формы и субстанции соединения РУ-1205 при подкожном введении кроликам (Таблице 4.6).

При подкожном введении субстанции РУ-1205 соединение быстро всасывается. Фармакокинетическая кривая носит моноэкспоненциальный характер. Максимальная концентрация наблюдается через 15 минут после введения. Снижение содержания исследуемого вещества происходит через 2 часа, а далее до 12 часов уровень вещества практически не изменяется и колеблется от 0,66 до 0,62 мкг/мл.

При введении инъекционной лекарственной формы соединение также быстро всасывается и достигает максимальной концентрации через 15 минут, которая в 1,8 раза превышает таковую при введении субстанции. После чего содержание исследуемого вещества в плазме крови кроликов резко уменьшается и к 12 часу эксперимента составляет 0,48 мкг/мл. Фармакокинетическая кривая носит моноэкспоненциальный характер.

При сравнении фармакокинетических параметров было установлено, что статистически значимо отличаются все изученные показатели. В состав инъекционной лекарственной формы входит солюбилизатор манит. При подкожной инъекции изучаемое соединение в композиции с вспомогательным веществом характеризуется более высокой степенью всасываемости в начальный момент времени, чем при введении индивидуально. Наряду с этим, лиофилизат соединения РУ-1205 обладает более высокой скоростью элиминации из организма кроликов, о чем свидетельствуют показатели периода полувыведения и среднего времени удерживания. Относительная биодоступность лиофилизата при подкожном введении составила $81,94 \pm 10,12$ %.

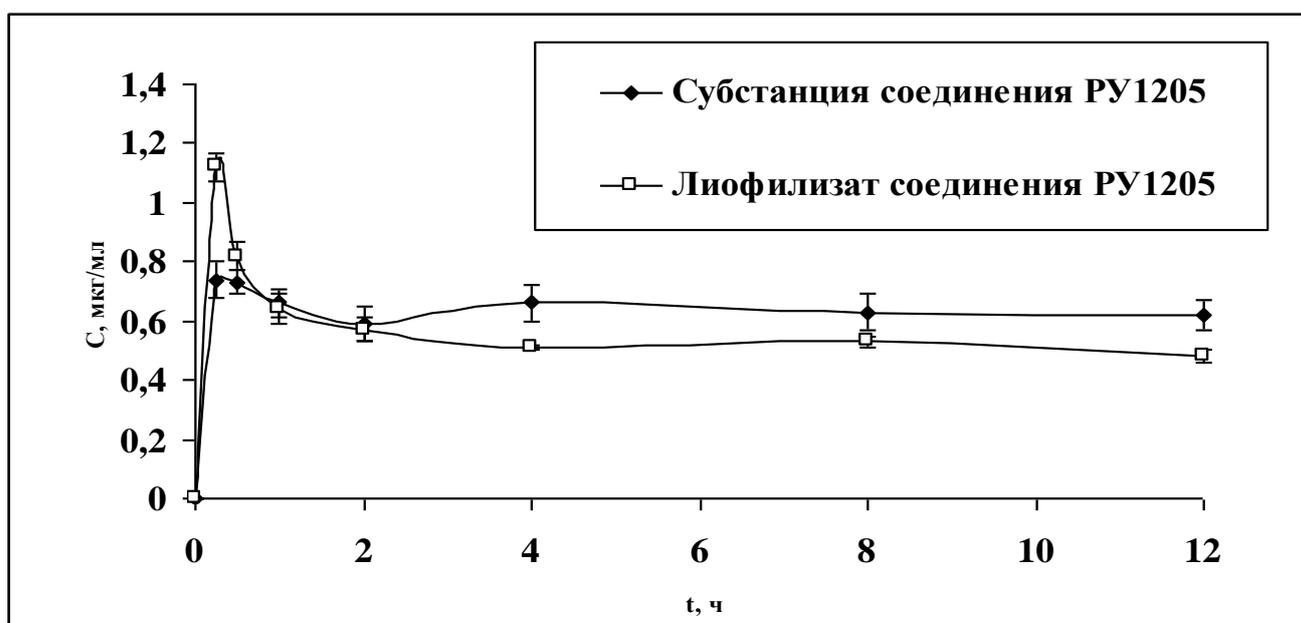


Рис. 4.6 Содержание соединения РУ-1205 в плазме крови кроликов при подкожном введении лиофилизата в сравнении с субстанцией в дозе 50 мг/кг (n=5; $\bar{x} \pm SD$). Обозначения: по оси абсцисс – время (час); по оси ординат – концентрация мкг/мл

Таблица 4.6

Фармакокинетические параметры лиофилизата соединения РУ-1205 в сравнении с субстанцией после однократного подкожного введения кроликам в дозе 25 мг/кг ($M \pm m$).

Фармакокинетический параметр	Субстанция	Лиофилизат
AUC (мкг/мл)*ч	17,18±0,60	14,035±1,29*
T1/2, час	15,09±0,72	10,31±1,12*
Kel	0,04±0,002	0,065±0,004*
MRT, час	8,38±0,26	7,55±0,34*
Cl, л/час/кг	1,46±0,03	1,78±0,17*
Vd, л/кг	31,94±1,69	26,51±0,68*
$F_{отн}, \%$	-	81,94±10,12

* - статистически значимо по отношению к группе животных, которым вводили субстанцию соединения РУ-1205 ($p \leq 0,05$) по t-критерию Стьюдента.

4.3 Заключение

В результате исследований было установлено, что твердые лекарственные формы отличаются от субстанции временем достижения максимальной концентрации. Однако при введении таблеток, покрытых оболочкой, значение C_{max} не отличается от такового при введении субстанции. При введении капсул

тот же параметр меньше в 1,2 раза, чем при введении субстанции. Анализ основных фармакокинетических параметров таблеток и субстанции показал, что при введении лекарственной формы статистически значимо отличаются среднее время удерживания одной молекулы в организме и кажущийся объем распределения. При введении капсул фармакокинетические показатели не имеют статистически значимых отличий от таковых при введении субстанции. Входящие в состав пероральных лекарственных форм вспомогательные вещества не оказывают существенного влияния на фармакокинетические процессы соединения РУ-1205. Распадаемость, растворение и всасывание в желудочно-кишечном тракте таблеток и капсул соединения РУ-1205 объясняет разницу во времени наступления максимальной концентрации. Относительная биодоступность твердых лекарственных форм характеризуется высокими значениями, превышающими 100 %.

При внутривенном введении инъекционной лекарственной формы в виде лиофилизата установлено, что максимальная концентрация достигается через пять минут после введения, как и при введении субстанции. Однако наблюдается разница в значении максимальной концентрации – при внутривенном введении лиофилизата соединения РУ-1205 C_{\max} в 1,3 раза превышает данное значение у субстанции. При анализе фармакокинетических параметров выявлено, что статистически значимо отличаются период полувыведения и среднее время удерживания. При подкожном введении инъекционной лекарственной формы и субстанции было показано, что время достижения максимальной концентрации совпадает в обоих случаях. Однако при подкожном введении изучаемого веществ в виде лиофилизата C_{\max} превышает данный параметр при введении субстанции в 1,8 раза. Все фармакокинетические параметры при введении лекарственной формы статистически значимо отличаются от соответствующих при введении субстанции. Входящий в состав лекарственной формы вспомогательный компонент манит увеличивает растворимость соединения РУ-1205 и повышает всасываемость в месте введения при подкожной инъекции. Под воздействием

солюбилизатора также увеличивается скорость элиминации изучаемого соединения. Относительная биодоступность инъекционной лекарственной формы составляет порядка 100 %.

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В клинической практике опиоидные анальгетики являются наиболее эффективными препаратами для лечения болевого синдрома [Katz N. 2005]. Однако, в результате исследований было обнаружено, что 40% больных в послеоперационном периоде сообщали о неполном облегчении боли при приеме наркотических анальгетиков, а половина пациентов с неизлечимыми заболеваниями имели умеренную или сильную боль во время последних дней жизни [Brennan F. 2007]. Недостаточная анальгезия при использовании наркотических обезболивающих средств часто происходит из-за намеренного применения заниженных доз. Это связано с возможным развитием наркомании или из-за присутствия типичных побочных эффектов, характерных для данных препаратов [Kaye A.M. 2013].

Известно, что опиоидные антиноцицептивные средства оказывают анальгетическое действие через активацию μ , κ и/или δ рецепторов, которые распределены по центральной и периферической нервной системе. Наиболее часто в клинической практике используют наркотические анальгетики, которые неселективно действуют на опиоидные рецепторы [Savage S.R. 2008], что приводит к развитию ряда серьезных побочных эффектов – психическая и физическая зависимость, тошнота, рвота, головокружение, седативный эффект, когнитивные дисфункции, зуд, потливость, запор и респираторная депрессия [Петров В.И. 2009, Звартау Э.Э. 2007, Игнатов Ю.Д. 2001, Lahmaiah M. et al 2012].

На основе имеющихся литературных данных можно заключить, что при длительном использовании наркотических анальгетиков развивается толерантность к обезболивающему эффекту, это в итоге приводит к необходимости повышать дозу применяемого препарата [Savage S.R. 2008]. В связи с этим, большое значение имеет разработка опиоидных обезболивающих средств, не вызывающих зависимость и другие побочные эффекты, которые развиваются при активации μ -рецепторов [Prisinzano T.E. 2008]. Подобные препараты создаются на основе веществ, обладающих κ -агонистической

активностью [Guzman D.S. 2011]. Наряду с данными литературы [А.А. Спасов, 2011, Н.Е. Кузьмина и др., 2006] результаты предварительных исследований также свидетельствуют о каппа-опиоидной агонистической активности производных полициклических систем на основе бензимидазола [О.Ю. Гречко, 2012].

На базе ВолгГМУ совместно с НИИ ФОХ Южного федерального университета было выявлено оригинальное соединение, конденсированное производное морфолиноэтилимидазобензимидазола, под лабораторным шифром РУ-1205 [Патент № № 2 413 512 С1 от 29.07.2009 г]. Установлено, что по фармакологической активности оно проявляет анальгетические свойства. Эффект соединения связан с активацией каппа-опиоидных рецепторов. Изучаемое вещество оказывает выраженное обезболивающее действие на спинальном, супраспинальном и периферическом уровнях [Спасов А.А. 2013].

Необходимо отметить, что для оценки фармакодинамических параметров новых лекарственных препаратов, принципиально важно знать их фармакокинетические свойства, такие как всасывание, распределение по органам и тканям, метаболизм и выведение [Каркищенко Н.Н. 2001]. Изучение этих процессов состоит из нескольких этапов: разработка биоаналитического метода, проведение фармакокинетических исследований и собственно расчет фармакокинетических параметров [В. П. Жердев, А. А. Литвин, 2005]. Для изучаемого вещества был разработан метод количественного определения в биологических пробах, который характеризуется достаточной селективностью. Экстракцию соединения РУ-1205 и одновременную преципитацию белков осуществляли ацетонитрилом. При этом степень экстракции составила порядка 90% от исходного количества. Для количественного определения изучаемого вещества в биологических пробах использовался метод ВЭЖХ с УФ-детектированием, на колонке SUPELCOSIL LC-18 при длине волны 205 нм. Температура хроматографирования 50 °С. Чувствительность метода – 500 нг/мл, повторяемость – 20%, воспроизводимость – 15% средняя ошибка измерения – 11,86 %.

В результате проведенного исследования были изучены фармакокинетические свойства соединения РУ-1205 у крыс. При внутривенном введении в дозе 10 мг/кг соединение достаточно долго циркулирует в организме животных. Так, изучаемое вещество наблюдается в плазме крови на протяжении 12 часов, что свидетельствует о длительных процессах элиминации соединения РУ-1205. Это подтверждается рассчитанными высокими показателями периода полувыведения (8,49 ч) и среднего времени удерживания одной молекулы в организме крыс (7,14 ч). Изучаемое вещество распределяется по всем изученным органам и тканям организма животных. Показатель кажущегося объема распределения (8,30 л/кг) превышает реальный объем жидкости в организме крыс (0,67 л/кг) приблизительно в 12 раз. Необходимо отметить, что преобладающие значения кажущегося объема распределения над реальным объемом жидкости в организме животных, свидетельствуют о выраженной способности изучаемых соединений проникать в органы и ткани (Davies B. et al., 1993). Большие количества исследуемого вещества обнаруживаются в головном мозге – органе мишени, в печени и почках – органах элиминации, а также в сальнике. Соединение РУ-1205 обладает меньшей тропностью к высоковазкуляризованным тканям – сердцу, легким и селезенке. Наименьшие количества отмечаются в мышечной ткани. Соединение РУ-1205 при данном пути введения экскретируется на протяжении 72 часов.

При пероральном введении в дозе 50 мг/кг максимальное значение концентрации соединения РУ-1205 наблюдается через 1 час после введения – время необходимое для проникновения через стенку ЖКТ и прохождения через печеночный барьер. Изучаемое вещество циркулирует в плазме крови на протяжении 12 часов. Отмечается, что абсолютная биодоступность субстанции соединения РУ-1205 при пероральном введении составляет 37 %. Для сравнения, применяемый в клинике агонист каппа-опиоидных рецепторов буторфанола тартрат, в эксперименте на животных имеет низкое значение биодоступности при пероральном введении, составляющее менее 10 %,. В связи

с этим данный препарат используется, только в виде инъекционных и интраназальных лекарственных форм [D.S. Guzman].

Соединение РУ-1205 при введении внутрь распределяется в органы элиминации – печень и почки, а также в жировую ткань. Следует отметить, что в разработанных условиях количественного определения соединения РУ-1205 в тканях головного мозга при внутривенном введении обнаружено не было. Однако, при данном пути введения изучаемого вещества отмечается развитие центрального антиноцицептивного эффекта [А.А. Спасов, 2013]. Экскретируется соединение РУ-1205 при пероральном введении на протяжении 96 часов.

При подкожном введении для соединения РУ-1205 в плазме крови крыс характерен интенсивный процесс всасывания из места инъекции. Максимальная концентрация изучаемого вещества в плазме достигается через 30 минут после введения. Абсолютная биодоступность субстанции соединения РУ-1205 при подкожном введении составляет 49 %. При данном пути введения изучаемое вещество в значительных количествах отмечается в головном мозге, печени и почках. Экскреция соединения РУ-1205 происходит на протяжении 72 часов.

Необходимо отметить, что при всех трех изученных путях введения, соединение РУ-1205 наблюдается в плазме крови крыс в низких концентрациях, относительно введенной дозы. Установлено, что выведение соединения РУ-1205 происходит на протяжении 72-96 часов в зависимости от пути введения. Было отмечено, что неизменная субстанция обнаруживается в экскретах суммарно в количествах равных порядка 0,7 % от введенной дозы при каждом пути введения. Также было обнаружено, что большее количество изучаемого вещества наблюдается в моче, чем в фекалиях. Однако было выявлено, что внепочечный (метаболический) клиренс соединения РУ-1205 значительно превышает почечный. Известно, что преобладание метаболического клиренса над ренальным свидетельствует об активном метаболизме изучаемого вещества [А.А. Упницкий, 2000].

При исследовании зависимости фармакокинетических свойств соединения РУ-1205 от обезболивающего эффекта при пероральном и подкожном путях введения установлено, что время достижения максимального значения и пиковой концентрации изучаемого вещества в плазме крови существенно отличаются. Установлено, что при подкожном введении на 8 часу исследования наблюдается вторая волна антиноцицептивного эффекта без возрастания концентрации соединения РУ-1205 в плазме крови. При внутрижелудочном введении отмечается обезболивающий эффект, несмотря на то, что при разработанных хроматографических условиях соединение РУ-1205 при данном пути введения в головном мозге обнаружено не было. Необходимо отметить, что в проведенных ранее исследованиях установлено вероятное проникновение изучаемого вещества через гематоэнцефалический барьер. Так, было выявлено, что в анальгетических тестах, характеризующих центральный механизм действия соединения РУ-1205, наблюдалось развитие антиноцицептивного эффекта, ингибируемого специфическим блокатором каппа-опиоидных рецепторов – норбиналторфимином и неспецифическим блокатором опиоидных рецепторов - налоксоном [А.А. Спасов и др., 2013].

На основании полученных данных можно предположить, что соединение РУ-1205 подвергается активным процессам биотрансформации в организме животных. При анализе корреляционной зависимости между фармакокинетическими и обезболивающими свойствами изучаемого вещества установлено, что разница во времени достижения максимального анальгетического эффекта и пиковой концентрации отличается на 3 часа при пероральном введении и на 15 минут при подкожном. Подобные расхождения можно объяснить временем, необходимым для преодоления изучаемым веществом гематоэнцефалического барьера. Кроме того, при подкожной инъекции на 8 часу исследования наблюдается повторное незначительное увеличение антиноцицептивного эффекта без повышения концентрации соединения РУ-1205 в плазме крови, что свидетельствует о возможном наличии активных продуктов метаболизма.

На следующем этапе проводилось исследование возможного метаболизма соединения РУ-1205, включающее три стадии. На первой выполнялся компьютерный прогноз метаболитов *in silico*, с помощью которого были получены наиболее вероятные химические структуры продуктов биотрансформации соединения РУ-1205. На следующем этапе изучался ферментативный, кислотный и щелочной гидролиз изучаемого вещества с целью определения продуктов второй фазы метаболизма. И на заключительном этапе проводилось исследование взаимодействия соединения РУ-1205 со специфическими тест-субстратами цитохромов семейства CYP450. Используемые субстраты описаны в ранее проводимых исследованиях по изучению метаболизма соединений производных бензимидазола [Л.А. Смирнова, 2004].

При прогнозе метаболизма изучаемого вещества *in silico* в программе «PALLAS 3.00» были выявлены 7 возможных метаболитов, которые являются продуктами реакций окисления и, в частности – гидроксирования. При этом было отмечено, что у 6 молекул в химической структуре сохранены фрагменты, возможно участвующие в развитии анальгетического действия – морфолиноэтильный у 9 атома азота и фторфенильный – у второго атома углерода. Также при компьютерном анализе было установлено, что в процессе метаболизма возможен отрыв морфолинового цикла (Рис. 5.1).

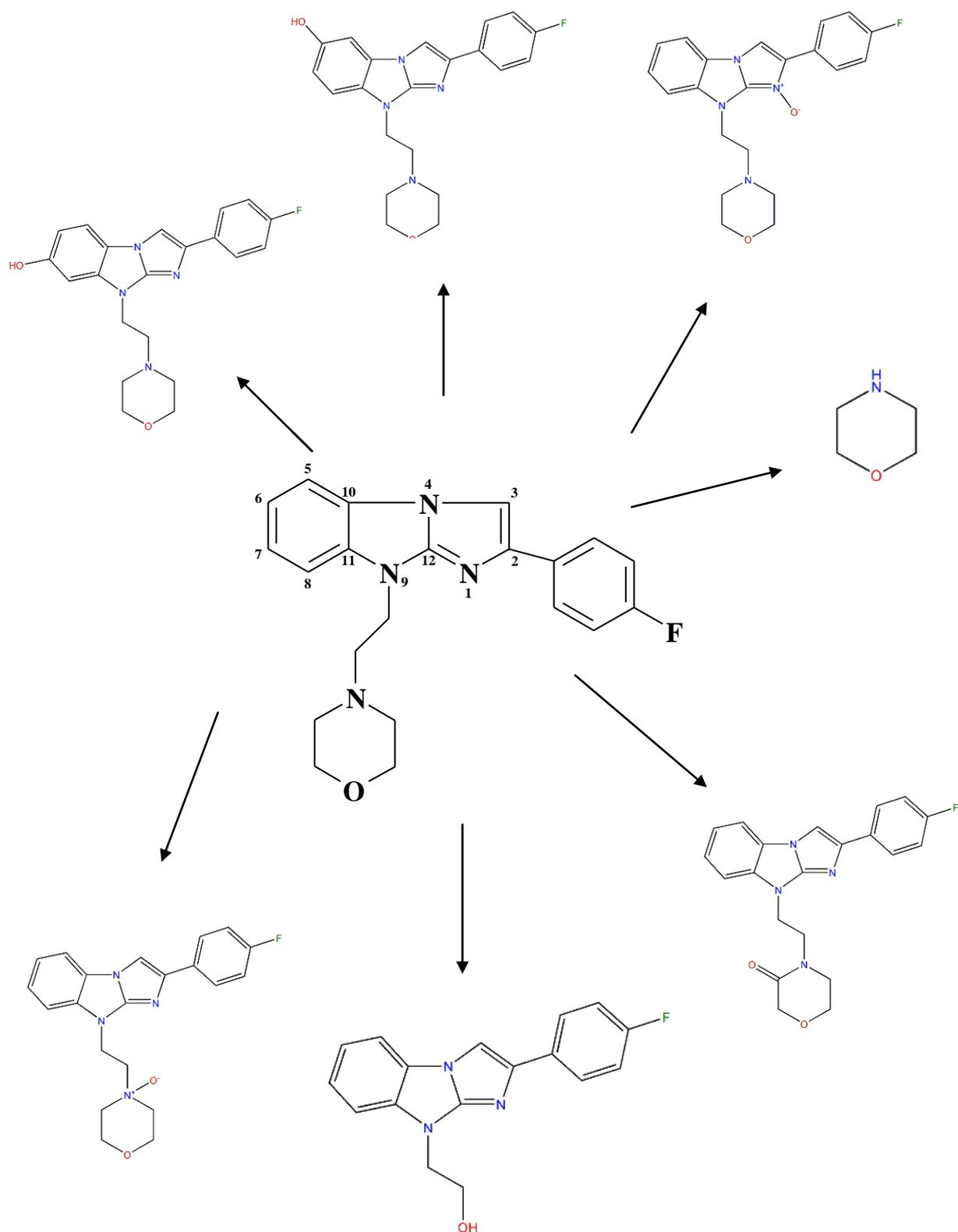


Рис. 5.1 Возможные метаболиты соединения РУ-1205, полученные в программе «PALLAS 3.00».

На втором этапе изучалась возможность соединения РУ-1205 в процессе биотрансформации образовывать конъюгаты с эндогенными кислотами. С этой целью был проведен ферментативный, кислотный и щелочной гидролиз в экскретах крыс. Полученные пробы инкубировали с β -глюкуронидазой и арилсульфатазой. Также проводился щелочной и кислотный гидролиз с добавлением 5М раствора NaOH (Dix K.J. et al., 1999) и 5М раствора HCl (Manini P. et al., 1999) соответственно. Однако при дальнейшем количественном исследовании биопроб на хроматограммах не было выявлено пиков, характеризующих исходную структуру соединения РУ-1205. Необходимо отметить, что по результатам компьютерного прогноза также не было выявлено продуктов второй фазы биотрансформации. На основании чего можно предположить малую вероятность синтетических реакций в процессах элиминации соединения РУ-1205.

На заключительном этапе исследования метаболизма соединения РУ-1205 изучалась продолжительность сна под влиянием специфических тест-субстратов некоторых изоформ системы CYP450. Так, было выявлено, что под влиянием соединения РУ-1205 статистически значимо пролонгируется гексеналовый (CYP2C9, CYP2B1 и CYP2B2) и алпразоламовый (CYP3A1) сны на 37,29 % и 60,85 % соответственно. Однако при совместном введении изучаемого вещества с мидазоламом (CYP3A1, CYP2C) наблюдается снижение продолжительности сна на 28,74 %. При конкурентном взаимодействии соединения РУ-1205 со специфическими тест-субстратами изоформ P450 было выявлено, что изучаемое вещество, вероятнее всего, метаболизируется за счет цитохрома CYP3A1 (окисление ксенобиотиков). Семейство цитохромов CYP2B (гидроксилирование ксенобиотиков) участвует в метаболизме с меньшей вероятностью. И незначительное изменение продолжительности мидазоламового сна свидетельствует о невовлеченности в процесс метаболизма цитохромов семейства CYP2C (окисление ксенобиотиков). Также несущественное изменение

хлоралгидратного сна доказывает отсутствие глюкоронилконъюгированных метаболитов.

Таким образом, на основании исследования метаболизма соединения РУ-1205 можно предположить, что биотрансформация протекает в основном по реакциям первой фазы с образованием окисленных форм исходной молекулы. При этом установлено, что наиболее вероятно метаболизм исследуемого вещества происходит в основном под влиянием цитохрома семейства СYP3A1. Также отмечено, что соединение РУ-1205 по-видимому не подвергается метаболизму во второй фазе и не происходит образование конъюгатов.

В заключительной серии исследований проводили изучение фармакокинетических свойств соединения РУ-1205 в виде лекарственных форм. Так, было установлено, что при введении изучаемого вещества в виде таблеток и капсул отличается время достижения максимальной концентрации в сравнении с субстанцией. Однако при введении таблеток значение C_{max} не отличается от такового у субстанции. На основании анализа фармакокинетических параметров таблеток и субстанции было показано, что при введении лекарственной формы статистически значимо отличаются среднее время удерживания одной молекулы в организме и кажущийся объем распределения. Вероятнее всего, вспомогательные компоненты – лактоза, лудипресс и магния стеарат, входящие в состав таблеток, улучшают растворение соединения РУ-1205 в организме кроликов и, в результате, изучаемое вещество подвергается более интенсивным процессам элиминации. При введении соединения РУ-1205 в виде капсул максимальная концентрация ниже в 1,2 раза, чем у субстанции. При этом фармакокинетические показатели не имеют статистически значимых отличий от таковых при введении субстанции. Установлено, что входящие в состав пероральных лекарственных форм вспомогательные компоненты не оказывают существенного влияния на фармакокинетические процессы соединения РУ-1205. Разницу во времени достижения максимальной концентрации можно объяснить распадаемостью,

растворением и всасыванием в желудочно-кишечном тракте таблеток и капсул соединения РУ-1205 [Пятин, Б.М, 2013].

При внутривенном введении лиофилизата выявлено, что максимальная концентрация изучаемого вещества наступает через пять минут после введения, как и при инъекции субстанции. Однако наблюдается разница в значении максимальной концентрации – при внутривенном введении C_{max} в 1,3 раза превышает данное значение у субстанции. При анализе фармакокинетических параметров установлено, что статистически значимо отличаются период полувыведения и среднее время удерживания одной молекулы соединения РУ-1205 в организме кроликов. При подкожном введении инъекционной лекарственной формы и субстанции изучаемого вещества было показано, что время достижения максимальной концентрации соединения РУ-1205 в плазме крови кроликов совпадает в обоих случаях. Но при подкожном введении лиофилизата соединения РУ-1205 C_{max} превышает данный параметр при введении субстанции в 1,8 раза. Все фармакокинетические параметры при введении лекарственной формы статистически значимо отличаются от соответствующих при введении субстанции. Входящий в состав лекарственной формы вспомогательный компонент манит, являющийся коррегентом изотоничности [Hora M.S., Rana R.K., 1992], а также солюбилизатором [Пятин .Б.М., 2013] повышает растворимость соединения РУ-1205 и увеличивает всасываемость в месте инъекции при подкожном введении. Под воздействием солюбилизатора также увеличивается скорость элиминации изучаемого соединения как в случае внутривенного, так и в случае подкожного пути введения.

Для соединения РУ-1205 наблюдаются различия в фармакокинетических свойствах у крыс и кроликов. Вероятно, это связано с индивидуальной активностью метаболических систем у разных видов живых организмов [Toutain P.L. 2010].

Таким образом, в результате проведенного исследования были изучены основные фармакокинетические параметры соединения РУ-1205 при

внутривеном, пероральном и подкожном путях введения. Изучены процессы распределения изучаемого соединения по органам и тканям организма крыс, а также его элиминация. Были определены величины абсолютной биодоступности. Проведен анализ фармакокинетических и обезболивающих свойств соединения РУ-1205, спрогнозированы возможные пути метаболизма. Исследованы фармакокинетические свойства пероральных и инъекционных лекарственных форм соединения РУ-1205.

На основании полученных фармакокинетических параметров возможно дать рекомендации для применения данных лекарственных форм в медицинской практике. На основании экспериментальных данных есть возможность спрогнозировать фармакокинетические лекарственные взаимодействия через цитохромы СYP3A1, СYP2B1 и СYP2B2. Также с помощью выявленных фармакокинетических параметров соединения РУ-1205 возможно планирование оптимальной фармакотерапии.

Выводы

1. Разработан метод количественного определения соединения 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола под лабораторным шифром РУ-1205 в биологическом материале с использованием ВЭЖХ. Изучаемое вещество определялось на УФ-детекторе при длине волны 205 нм, на колонке SUPELCOSIL LC-18 (100x4,6x5 мм). Температура хроматографирования 50 °С. Мобильная фаза: ацетонитрил:КН₂РО₄ (рН=5,0) 1:1 (v:v). Скорость потока мобильной фазы – 1 мл/мин. Чувствительность метода составила - 0,5 мкг/мл. Средняя ошибка измерения – 11,85 %. Воспроизводимость и повторяемость метода 15 % и 20 % соответственно;

2. При внутривенном введении (в дозе 10 мг/кг) соединение РУ-1205 циркулирует в плазме крови крыс на протяжении 12 часов. С_{max} наблюдается через 5 минут после введения и составляет 1,58 мкг/мл.

3. При пероральном введении (в дозе 50 мг/кг) изучаемое вещество циркулирует в плазме крови крыс на протяжении 12 часов. Максимальная концентрация наблюдается через 1 час после начала эксперимента и составляет 1,04 мкг/мл. Величина абсолютной биодоступности при данном пути введения у крыс составляет 37,34 %.

4. При подкожном введении (в дозе 50 мг/кг) соединение РУ-1205 циркулирует в плазме крови крыс на протяжении 12 часов. Максимальная концентрация наблюдается через 30 минут после введения и составляет 10,20 мкг/мл. Величина абсолютной биодоступности при подкожной инъекции составляет 49,02 %.

5. Изучаемое соединение интенсивно распределяется в органы и ткани крыс: головной мозг > печень > сальник > селезенка > легкие > почки > сердце > мышцы;

6. Соединение РУ-1205 элиминирует из организма животных на протяжении 3 - 4 суток в зависимости от пути и дозы введения. Экскреция происходит в большей степени через почки, чем через ЖКТ. При этом

неизмененного вещества суммарно выделяется порядка 0,7 % от введенной дозы;

7. Время достижения максимальной концентрации соединения РУ-1205 в крови крыс опережает время наступления максимального обезболивающего эффекта при пероральном введении на 3 часа и при подкожном – на 30 минут;

8. В результате компьютерного анализа *in silico* с помощью программы «PALLAS 3.00» было выявлено, что в процессе метаболизма возможно образование 7 метаболитов. Продуктами биотрансформации в основном являются окисленные и, в частности, гидроксильированные метаболиты. При совместном введении соединения РУ-1205 со специфическими тест-субстратами цитохромов семейства CYP450 наблюдается пролонгация гексеналового и алпразоламового сна на 60,85 % и 37,29 % соответственно и укорачивается на 28,74 % сон, вызванный мидазоламом. Однако, не отмечалось статистически значимого изменения продолжительности хлоралгидратного сна, что свидетельствует о возможном отсутствии конъюгированных метаболитов соединения РУ-1205. Эти данные также подтверждаются ранее проведенным компьютерным прогнозом метаболизма и результатами ферментативного, кислотного и щелочного гидролиза экскретов крыс, при котором на хроматограммах не было обнаружено пиков, характеризующих базовую структуру соединения РУ-1205.

9. Относительная биодоступность для лекарственных форм соединения РУ-1205 составила: для таблеток, покрытых оболочкой - $105,3 \pm 11,70$ %; для капсул - $109,53 \pm 6,76$ %; для лифилизата при внутривенном введении - $98,72 \pm 8,72$ %; для лиофилизата при подкожном введении - $81,94 \pm 10,12$ %.

Список литературы

1. Гречко О.Ю. Виртуальный скрининг и целенаправленный поиск соединений с высокой каппа-опиоидной активностью. / Гречко О.Ю., Васильев П.М., Черников М.В., Анисимова В.А. // Материалы III Съезда фармакологов России «Фармакология – практическому здравоохранению». - Санкт-Петербург, Психофармакол. биол. наркол. – 2007. № 7(4.1). - С. 1666;
2. Елисеева, Н.В. Поиск и изучение фармакологических свойств новых агонистов каппа-опиоидных рецепторов среди производных бензимидазола: дисс. ...канд. мед. наук 14.03.03 / Елисеева Н.В. – Волгоград, 2010. – 182 с.;
3. Звартау, М.В. Опиоидные анальгетики: пути совершенствования терапии болевых синдромов Текст. / М.В. Звартау, Э.Э. Пчелинцев, А.Н. Кубынин // Анестезиология. 2007.- Т.5. — С. 417;
4. Иванникова, Е.В. Исследование фармакокинетики и биодоступности в создании новых лекарственных средств пептидной структуры и их оптимальных лекарственных форм / Е.В. Иванникова, В.П. Жердев, С.С. Бойко, Е.В. Блынская и др. // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2013. – 2. – С. 1-17;
5. Игнатов, Ю.Д. Современные аспекты терапии боли: опиаты / Ю.Д. Игнатов, А.А. Зайцев // Качественная клиническая практика – 2001. - № 2. – С. 2–13;
6. Каркищенко, Н.Н. Фармакокинетика / Н.Н. Каркищенко, В.В. Хоронько, С.А. Сергеева, В.Н. Каркищенко – Ростов-на-Дону.: «Феникс», 2001. – 384 с.;
7. Кузьмина Н.Е. Общая модель опиатного фармакофора. Области опиатного фармакофора, обуславливающие агонистические свойства лигандов опиатных рецепторов. / Кузьмина Н.Е., Осипова Е.С., Кузьмин В.С., Ситников В.Б. // Изв. АН. Сер. хим. – 2006. №40. - С. 20-32;

8. Кукес, В.Г. Клиническая фармакология и фармакотерапия: учебник. - 3-е изд., перераб. и доп. / под ред. В. Г. Кукеса, А. К. Стародубцева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – С. 594-613;
9. Лакин, К.М. Биотрансформация лекарственных веществ / К.М. Лакин, Ю.Ф. Крылов. – М.: Медицина, 1981. – С. 68-73;
10. Лебедева, Р. Н. Фармакотерапия острой боли / Р. Н. Лебедева, В. В. Никода // М.: Аир-Арт. – 1998. – Т. 185;
11. Никитин, Н.А. Поиск модуляторов монооксигеназной системы печени в ряду производных бензимидазола и ксантина: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / Н.А. Никитин. – Уфа, 2002. – 20 с.;
12. Осипова, Н. А. Хронический болевой синдром в онкологии / Н. А. Осипова, Г. А. Новиков, Б. М. Прохоров // М. Медицина. – 1998. - С. 178;
13. Петров, В.И. Эффективность лорноксикама и кеторолака в профилактике и лечении послеоперационного болевого синдрома у пациентов нейрохирургического профиля / В.И. Петров, А.В. Сабанов, В.Г. Медведев [и др.] // Хирургия. – 2009. - № 2. – С.64-70;
14. Пчелинцев, М. Комбинированные препараты, содержащие опиаты и антагонисты опиатных рецепторов, в повышении безопасности терапии интенсивной боли / М. Пчелинцев // Врач. – 2012. - № 11. – С 38-42;
15. Пятин, Б.М. Разработка фармакопейных статей и регламентов на таблетки и инъекционную форму вещества с каппа-опиоидной агонистической активностью на основе производного имидазобензимидазола; наработка лекарственных форм для доклинических исследований; определение срока годности хранения лекарственных форм вещества / Б.М. Пятин // Отчет о научно-исследовательской работе. – Москва. – 2013. – 53 с.;
16. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А. Н. Миронов (ред.) - М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.;
17. Сергиенко, В. И. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение / В. И. Сергиенко, Р. Джеллифф, И. Б. Бондарева // – М. : Изд-во РАМН, 2003;

18. Смирнова, Л.А. Фармакокинетика производных бензимидазола как основа для создания новых лекарственных препаратов и оптимальных схем фармакотерапии дисс. ...док. биол. наук 14.03.25 / Смирнова Л.А. – Волгоград, 2004. – 338 с.;

19. Смирнова, Л.А. Разработка количественного определения производных бензимидазола методом ВЭЖХ для фармакокинетических исследований / Л.А. Смирнова, О.В. Островский, В.А. Анисимова // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии: Тез. Всерос. науч. конф. – С-Пб., 1999 – 199 с.;

20. Спасов А. А. Анальгетические свойства производного морфолиноэтилимидазобензимидазола / А.А. Спасов, О.Ю. Гречко, Д.М. Штарева, В.А. Анисимова // Эскпир. и клин. фармакол., - 2013 – 76(9). – С. 15-18;

21. Упницкий А.А. Клиническая фармакология бисопролола и его роль в лечении сердечно-сосудистых заболеваний / А.А. Упницкий // Международный журнал медицинской практики. - 2000. - 9. - С.35-40;

22. Шабашева, И.Г. Фармакокинетика антиаритмического препарата ритмидазол / И.Г. Шабашева, Л.А. Смирнова, А.А. Спасов, В.И. Петров // Человек и лекарство: Тез. Докл IV Росс. нац. конгр. – М., 1997. – С. 225;

23. Aldrich, V. J. Peptide Kappa Opioid Receptor Ligands: Potential for Drug Development / V. J. Aldrich, J. P. McLaughlin // The AAPS Journal. – 2009. - 11(2). - P. 312 – 322;

24. American Society of Addiction Medicine (ASAM), 2001. Definitions related to the use of opioids for the treatment of pain: A consensus document from the American Academy of Pain Medicine, the American Pain Society, and the American Society of Addiction Medicine. Glenview, IL: American Academy of Pain Medicine;

25. Babu, K. M. Opioid receptors and legal highs: Salvia divinorum and Kratom / K.M. Babu, C.R. McCurdy, E.W. Boyer // Clinical Toxicology. – 2008. – 46(2). – P. 146-152;

26. Bagnol D. et al. Cellular localization and distribution of the cloned mu and kappa opioid receptors in rat gastrointestinal tract / D. Bagnol, A. Mansour, H. Akil, S.J. Watson // *Neuroscience*. – 1997. – 81(2). – P. 579-591;
27. Baker, L. E. Comparison of the discriminative stimulus effects of salvinorin A and its derivatives to U69, 593 and U50, 488 in rats / L.E. Baker, J.J. Panos, B.A. Killinger, M.M. Peet // *Psychopharmacology*. – 2009. – 203(2). – P. 203-211;
28. Barber, A. Novel developments with selective, non-peptidic kappa-opioid receptor agonists / A. Barber, R. Gottschlich // *Exp. Opin. Investig. Drugs*. - 1997. – 6. – P.1351–1368;
29. Bethesda, M.D: AHFS Drug Information / M.D. Bethesda // American Society of Health-System Pharmacists Inc. – 2007;
30. Bileviciute-Ljungar, I. Anti-inflammatory effects of contralateral administration of the kappa-opioid agonist U-50,488H in rats with unilaterally induced adjuvant arthritis / I. Bileviciute-Ljungar, T. Saxne, M. Spetea // *Rheumatology (Oxford)* - 2006. – 45. - P. 295–302;
31. Boulton, D.W. Validation and application of a sensitive assay for butorphanol in human plasma by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection / D.W. Boulton, G.F. Duncan, N.N. Vachharajani // *Journal of Chromatography B*. – 2002. – 775(1). – P. 57-62;
32. Brennan, F. Pain Management: A Fundamental Human / F. Brennan, B.C. Daniel, M. Cousins // *Anesth Analg*. - 2007 - 1(105). - P. 205-21;
33. Butelman, E. R. Butorphanol: characterization of agonist and antagonist effects in rhesus monkeys / E. R. Butelman, G. Winger, G. Zernig, J.H. Woods // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1995. – 272(2). – C. 845-853;
34. Butelman E. R. Systemic effects of E-2078, a stabilized dynorphin A (1–8) analog, in rhesus monkeys / E.R. Butelman, J.A. Vivian, J. Yu, M.J. Kreek // *Psychopharmacology*. – 1999. – 143(2). – P. 190-196;

35. Butelman E. R. Effects of E-2078, a stable dynorphin A (1–8) analog, on sedation and serum prolactin levels in rhesus monkeys / E. R. Butelman, T. J. Harris, M. J. Kreek // *Psychopharmacology*. – 1999. – 147(1). – P. 73-80;
36. Butelman, E.R. The plant-derived hallucinogen, salvinorin A, produces κ -opioid agonist-like discriminative effects in rhesus monkeys / E.R. Butelman, T.J. Harris, M. J. Kreek // *Psychopharmacology*. – 2004. – 172(2). – P. 220-224;
37. Butelman, E. R. Unconditioned behavioral effects of the powerful κ -opioid hallucinogen salvinorin A in nonhuman primates: fast onset and entry into cerebrospinal fluid / E.R. Butelman, T.E. Prisinzano, H. Deng, S. Rus // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2009. – 328(2). – P. 588-597;
38. Callahan M. J. Irritable bowel syndrome neuropharmacology: a review of approved and investigational compounds / M.J. Callahan // *Journal of clinical gastroenterology*. – 2002. – 35(1). – P. S58-S67;
39. Camilleri M. Novel pharmacology: asimadoline, a κ -opioid agonist, and visceral sensation / M. Camilleri // *Neurogastroenterology & Motility*. – 2008. – 20(9). – P. 971-979;
40. Carlezon, W. A. Depressive-like effects of the κ -opioid receptor agonist salvinorin A on behavior and neurochemistry in rats / W.A. Carlezon, C. Béguin, J.A. DiNieri // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2006. – 311(1). – P. 440-447;
41. Carlezon, W.A. Jr., Kappa-opioid ligands in the study and treatment of mood disorders / W.A. Jr . Carlezon, C . Béguin , A.T. Knoll , B.M.Cohen // *Pharmacol Ther*. – 2009. - 3(123). – P. 334-43;
42. Carrol, N.M. Observations of neuropharmacology of morphine – like analgesia / N.M. Carrol, P.K. Lim / *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther*. – 1960. – 125. – P. 383-403;
43. Caudill-Slosberg, M.A. Office visits and analgesic prescriptions for musculoskeletal pain in US: 1980 vs. 2000 / M.A. Caudill-Slosberg, L.M. Schwartz, S. Woloshin // *Pain*. - 2004. - 109. – P. 514-519;

44. Centers for Disease Control and Prevention. Adult use of prescription opioid pain medications – Utah, 2008 / MMWR Morb Mortal Wkly Rep. - 2010. - 59. – P. 153-157;
45. Craft, R. M. Sex differences in opioid antinociception: κ and ‘mixed action’ agonists / R. M. Craft, S. A. Bernal // Drug and alcohol dependence. – 2001. - 63(3). – P. 215-228;
46. Cryan, J.F. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs / J.F. Cryan, A. Markou, I. Lucki // Trends in pharmacological sciences. – 2002. – 5(23). – P. 238-245;
47. DeHaven-Hudkins, D.L. Peripherally restricted opioid agonists as novel analgesic agents / D.L. DeHaven-Hudkins, R.E. Dolle // Curr. Pharm. Des. - 2004. – 10. – P.743–757;
48. Delvaux M. Pharmacology and clinical experience with fedotozine / M. Delvaux //Expert opinion on investigational drugs. – 2001. – 10(1). – P. 97-110;
49. Devine, D. P. Differential involvement of ventral tegmental mu, delta and kappa opioid receptors in modulation of basal mesolimbic dopamine release: in vivo microdialysis studies / D.P. Devine, P. Leone, D. Pocock, R.A. Wise //Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 1993. – 266(3). – P. 1236-1246;
50. DeWire, S.M. A G protein-biased ligand at the μ -opioid receptor is potently analgesic with reduced gastrointestinal and respiratory dysfunction compared with morphine / S.M. DeWire, D.S. Yamashita, D.H. Rominger, G. Liu // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2013. - 3(344). – P. 708-717;
51. Dix, K.J. Comparative metabolism and disposition of gemfibrozil in male and female Sprague-Dawley rats and Syrian Golden hamsters / K.J. Dix, D.P. Coleman, A.R. Jeffcoat // Drug Metab. Dispos. – 1999. – Vol. 27, №1. – P.138-146;
52. Gandhi, M. Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics / M. Gandhi, F. Aweeka, R.M. Greenblatt // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2004. – 44. – P. 499-523;

53. Gaver, R.C. Disposition of parenteral butorphanol in man / R.C. Gaver, M. Vasiljev, H. Wong, I. Monkovic // Drug metabolism and disposition. – 1980. – 8(4). – P. 230-235;
54. Gear, R.W. Gender difference in analgesic response to the kappa-opioid pentazocine / R.W. Gear, N.C. Gordon, P.H. Heller, S. Paul // Neuroscience letters. – 1996. – 205(3). – P. 207-209;
55. Gear, R.W. Kappa-opioids produce significantly greater analgesia in women than in men / R.W. Gear, C. Miaskowski, N.C. Gordon, S.M. Paul // Nature medicine. – 1996. – 2(11). – P. 1248-1250;
56. Gear, R.W. The kappa opioid nalbuphine produces gender-and dose-dependent analgesia and antianalgesia in patients with postoperative pain / R.W. Gear, C. Miaskowski, N.C. Gordon, S.M. Paul // Pain. – 1999. – 83(2). – P. 339-345;
57. Gottlieb, H. B. Differential cardiovascular and renal responses produced by microinjection of the κ -opioid U-50488H [(trans-3, 4-Dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidiny) cyclohexyl]-benzene-acetamide) methane sulfonate] into subregions of the paraventricular nucleus / H.B. Gottlieb, K.J. Varner, V.A. Kenigs, A.M. Cabral // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2005. – 312(2). – P. 678-685;
58. Guzman, D. S. Evaluation of thermal antinociceptive effects and pharmacokinetics after intramuscular administration of butorphanol tartrate to American kestrels (*Falco sparverius*) / D. S. Guzman, T. L. Drazenovich, B. KuKanich, G. H. Olsen // American journal of veterinary research. – 2014. – 75(1). – C. 11-18;
59. Harashima, H. Species difference in the disposition of liposomes among mice, rats, and rabbits: allometric relationship and species dependent hepatic uptake mechanism / H. Harashima, S. Komatsu, S. Kojima, C. Yanagi // Pharmaceutical research. – 1996. – 13(7). – P. 1049-1054;
60. Horan, P. J. Comparative pharmacological and biochemical studies between butorphanol and morphine / P. J. Horan, I. K. Ho // Pharmacology Biochemistry and Behavior. – 1989. – 34(4). – P. 847-854;

61. Hora, M. S. Lyophilized formulations of recombinant tumor necrosis factor / M.S Hora, R.K. Rana, F.W. Smith // *Pharmaceutical research*. – 1992. – 9(1). – P.. 33-36.
62. Hoskin, P. J. Opioid agonist-antagonist drugs in acute and chronic pain states / P.J. Hoskin, G.W. Hanks // *Drugs*. – 1991. – 41(3). – P. 326-344;
63. Ide, S. Antinociception, but not thermal, mechanical, or somatic chemical antinociception, in μ -opioid receptor knockout mice / M. Minami, G.R. Uh, M. Satoh // *Molecular Pain*. – 2011. – 7(23). – P. 1-11;
64. Inan, S. Kappa opioid agonists suppress chloroquineinduced scratching in mice / S. Inan, A. Cowan // *Eur. J. Pharmacol.* - 2004. – 502. – P.233–237;
65. Inan, S. Nalfurafine, a kappa opioid receptor agonist, inhibits scratching behavior secondary to cholestasis induced by chronic ethynylestradiol injections in rats / S. Inan, A. Cowan // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 2006. – 1(85). – P. 39-43;
66. Inan, S. Comparison of the diuretic effects of chemically diverse kappa opioid agonists in rats: nalfurafine, U50, 488H, and salvinorin A / S. Inan, D.YW. Lee, L.Y. Liu-Chen, A. Cowan // *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. – 2009. – 379(3). – P. 263-270;
67. Inui, S. Nalfurafine hydrochloride for the treatment of pruritus / S. Inui // *Expert opinion on pharmacotherapy*. – 2012. – 13(10). – P. 1507-1513;
68. Katz, N. Opioids for neuropathic pain / N. Katz, C. Benoit // *Current pain and headache reports*. – 2005. – 9(3). – P. 153-160;
69. Kaye, A.M. Basic Concepts in Opioid Prescribing and Current Concepts of Opioid-Mediated Effects on Driving / A.M. Kaye, A.D. Kaye, E.C. Lofton // *Ochsner J.* - 2013 - 4(13). - P. 525-532;
70. Kivell, B. Kappa opioids and the modulation of pain / B. Kivell, T. E. Prisinzano // *Psychopharmacology*. – 2010. – 210(2). – P. 109-119;
71. Kotegawa, T. In vitro, pharmacokinetic, and pharmacodynamic interactions of ketoconazole and midazolam in the rat / T. Kotegawa, B.E.

Laurijssens, L.L. von Moltke, M.M. Cotreau et al. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2002. – T. 302. – №. 3. – P. 1228-1237;

72. Kramer, H. J. Influence of asimadoline, a new κ -opioid receptor agonist, on tubular water absorption and vasopressin secretion in man / H.J. Kramer, W. Uhl, B. Ladstetter // *British journal of clinical pharmacology*. – 2000. – 50(3). – P. 227-235;

73. Leander, J. D. Kappa agonist-induced diuresis: evidence for stereoselectivity, strain differences, independence of hydration variables and a result of decreased plasma vasopressin levels / J. D. Leander, J. C. Hart, R. L. Zerbe // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1987. – 242(1). – P. 33-39;

74. Lovell K. M. Synthesis of neoclerodane diterpenes and their pharmacological effects / K.M. Lovell, K.M. Prevatt-Smith, A. Lozama // *Chemistry of Opioids*. – Springer Berlin Heidelberg, - 2011. – P. 141-185;

75. Mague S. D. Antidepressant-like effects of κ -opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats / S.D. Mague, A.M. Pliakas, M.S. Todtenkopf // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2003. – 305(1). – P. 323-330;

76. Maisonneuve, I. M. U50, 488, a κ opioid receptor agonist, attenuates cocaine-induced increases in extracellular dopamine in the nucleus accumbens of rats / I. M. Maisonneuve, Archer S., Glick S. D. // *Neuroscience letters*. – 1994. – 181(1). – P. 57-60;

77. Manchikanti, L. American Society of Interventional Pain Physicians (ASIPP) Guidelines for Responsible Opioid Prescribing in Chronic Non-Cancer Pain: Part I – Evidence Assessment / Abdi S., Atluri S. et al. // *Pain Physician* – 2012. - 3(15). - P. 1-65;

78. Manini P., Andreoli R., Mutti A. et al. Determination of free and glucuronated hexane metabolites without prior hydrolysis by liquid- and gas-chromatography coupled with mass spectrometry. // *Toxicology Letters* – 1999. - №108. – P.225-231;

79. Margolis, E. B. κ -Opioid agonists directly inhibit midbrain dopaminergic neurons / E.B. Margolis, G.O. Hjelmstad, A. Bonci // *The Journal of neuroscience*. – 2003. – 23(31). – P. 9981-9986;
80. McCarthy, L. Opioids, opioid receptors, and the immune response / L. McCarthy, M. Wetzel, J.K. Sliker, T.K. Eisenstein et al. // *Drug Alcohol Depend.* – 2001. – 62. – P.111–123;
81. McLaughlin J. P. Prior activation of kappa opioid receptors by U50, 488 mimics repeated forced swim stress to potentiate cocaine place preference conditioning / J.P. McLaughlin, B.B. Land, S. Li, J.E. Pintar // *Neuropsychopharmacology*. – 2005. – №. 31(4). – P. 787-794;
82. Mello, N.K. Interactions between kappa opioid agonists and cocaine: preclinical studies / N. K. Mello, S. S. Negus // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2000. – 909(1) – P. 104-132;
83. Mogil, J.S. Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype / J.S. Mogil, EJ Chesler, S.G. Wilson, J.M. Juraska et al // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 2000. – 24(3). – P. 375-389;
84. Mogil, J.S. The melanocortin-1 receptor gene mediates female-specific mechanisms of analgesia in mice and humans / J. S. Mogil, Wilson S.G., Chesler E.J., Rankin A.L., et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – 100(8). – P. 4867-4872;
85. Morani, A. S. Effect of kappa-opioid receptor agonists U69593, U50488H, spiradoline and salvinorin A on cocaine-induced drug-seeking in rats / A.S. Morani, B. Kivell, T.E. Prisinzano, S. Schenk // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 2009. – №. 94(2). – P. 244-249;
86. Munro T. A. Standard protecting groups create potent and selective κ opioids: Salvinorin B alkoxymethyl ethers / T.A. Munro, K.K. Duncan, W. Xu, Y. Wang // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2008. – 16(3). – P. 1279-1286;

87. Munro T. A. Long-acting κ opioid antagonists nor-BNI, GNTI and JDTic: pharmacokinetics in mice and lipophilicity / Munro T. A., L. M. Berry, A. Van't Veer, C. Béguin et al. // *BMC pharmacology*. – 2012. – 12(1). – P. 5;
88. Nakazawa T. Spinal kappa receptor-mediated analgesia of E-2078, a systemically active dynorphin analog, in mice / T. Nakazawa, Y. Furuya, T. Kaneko, K. Yamatsu // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1991. – 256(1). – P. 76-81;
89. Nebert, D.W. Clinical importance of the cytochromes P450 / D.W. Nebert, D.W. Russel // *The Lancet*. – 2002. – 360(12). – P. 1155 – 1162;
90. Negus, S. S. Effects of the kappa opioid agonist U50, 488 and the kappa opioid antagonist nor-binaltorphimine on choice between cocaine and food in rhesus monkeys / S. S. Negus // *Psychopharmacology*. – 2004. – 176(2). – P. 204-213;
91. Negus, S. S. et al. Effects of kappa opioids in an assay of pain-depressed intracranial self-stimulation in rats / S.S. Negus, E.M. Morrissey, M. Rosenberg, K. Cheng // *Psychopharmacology*. – 2010. – 210(2). – P. 149-159;
92. Nemoto T. The effect of 17-N substituents on the activity of the opioid κ receptor in nalfurafine derivatives / T. Nemoto, N. Yamamoto, N. Wada, Y. Harada // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2013. – 23(1). – P. 268-272;
93. Omiecinski C.J., Concise review of the cytochrome P450s and their roles in toxicology / C.J. Omiecinski, R.P. Rimmel, V.P. Hosagrahara // *Tox. Sci.* – 1999. - №48. – P.151-156;
94. Patel, P.P. Opioid Side Effects / P.P. Patel, S.C. Bagheri // *Clinical Review of Oral and Maxillofacial Surgery-Pageburst E-Book on Kno2*: – P. 48;
95. Peterson, P.K. Kappa-opioid receptor agonist suppression of HIV-1 expression in CD4+ lymphocytes / P.K. Peterson, G. Gekker, J.R. Lokensgard, J.M. Bidlack et al. // *Biochem. Pharmacol.* - 2001. – 61. – P.1145–1151;
96. Pfeiffer A. Psychotomimesis mediated by κ opiate receptors / A. Pfeiffer, V. Brantl, A. Herz, H.M. Emrich // *Science*. - 1986. – 233. – P.774–776;

97. Pittman, K. A. Pharmacokinetics of pentazocine in the rhesus monkey / K.A. Pittman, G.A. Portmann // *Journal of pharmaceutical sciences*. – 1974. – 63(1). – P. 84-88;
98. Pliakas, A. M. Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens / A.M. Pliakas, R.R. Carlson, R.L. Neve // *The Journal of Neuroscience*. – 2001. – 21(18). – P. 7397-7403;
99. Prevatt-Smith K. M. New therapeutic potential for psychoactive natural products / K.M. Prevatt-Smith, T.E. Prisinzano // *Natural product reports*. – 2010. – 27(1). – P. 23-31;
100. Prisinzano, T.E. Psychopharmacology of the hallucinogenic sage *Salvia divinorum* / T.E. Prisinzano // *Life sciences*. – 2005. – T. 78(5). – P. 527-531;
101. Prisinzano, T. E. Salvinorin A analogs as probes in opioid pharmacology / T. E. Prisinzano, R. B. Rothman // *Chem. Rev.* – 2008. – 108(5). – P. 1732-1743;
102. Ranganathan, M. Dose-related behavioral, subjective, endocrine, and psychophysiological effects of the κ opioid agonist salvinorin A in humans / M. Ranganathan, A. Schnakenberg, P.D. Skosnik // *Biological psychiatry*. – 2012. – 72(10). – P. 871-879;
103. Reid, K.J. Epidemiology of chronic non-cancer pain in Europe: Narrative review of prevalence, pain treatments and pain impact / K.J. Reid, J. Harker, M.M. Bala, C. Truyers et al. // *Curr Med Res Opin.* - 2011. – 27. – P. 449-462;
104. Richards N., McMahon S. B. Targeting novel peripheral mediators for the treatment of chronic pain / N. Richards, S. B. McMahon // *British journal of anaesthesia*. – 2013. – 111(1). – P. 46-51;
105. Riviere, P.J. Peripheral kappa-opioid agonists for visceral pain / P.J. Riviere // *Br. J. Pharmacol.* - 2004. – 141. – P.1331–1334;
106. Russell, S. E. Sex Differences in Sensitivity to the Depressive-like Effects of the Kappa Opioid Receptor Agonist U-50488 in Rats / S. E. Russell, A. B. Rachlin, K. L. Smith, J. Muschamp // *Biological psychiatry*. – 2013. – P. 1-10;

107. Savage, S.R. Challenges in using opioids to treat pain in persons with substance use disorders / S.R. Savage, K.L. Kirsh, S.D. Passik. // *Addict Sci Clin Pract.* – 2008. - 2(4). – P. 4-25;

108. Schrock, S.D. Labor analgesia / S.D. Schrock, C. Harraway-Smith // *American Family Physician.* – 2012. – 85(5). – P. 447 – 454;

109. Sheffler D. J., Roth B. L. Salvinorin A: the ‘magic mint’hallucinogen finds a molecular target in the kappa opioid receptor / D.J. Sheffler, B.L. Roth // *Trends in Pharmacological Sciences.* – 2003. – 24(3). – P. 107-109;

110. Schmidt, M. D. Pharmacokinetics of the plant-derived κ -opioid hallucinogen salvinorin A in nonhuman primates / M.D. Schmidt, M.S. Schmidt, E.R. Butelman // *Synapse.* – 2005. – 58(3). – P. 208-210;

111. Shyu, W. C. The absolute bioavailability of transnasal butorphanol in patients experiencing rhinitis / W.C. Shyu, K.A. Pittman, D.S. Robinson // *European journal of clinical pharmacology.* – 1993. – 45(6) –P. 559-562;

112. Simonson B. Pharmacology and anti- addiction effects of the novel kappa opioid receptor agonist Mesyl Sal B, a potent and long- acting analogue of salvinorin A / B. Simonson, A.S. Morani, A.W.M. Ewald // *British journal of pharmacology.* – 2014;

113. Smith, H. S. Opioids and neuropathic pain / H.S. Smith // *Pain physician.* – 2012. – 3(15) – P. ES93-ES110;

114. Su X. Sodium channel blocking actions of the k-opioid receptor agonist U-50,488 contribute to its visceral antinociceptive effects. /Su X., Joshi S.K., Kardos S., Gebhart G.F. // *J. Neurophysiol.* -2002. № 87. - P. 1271-1279;

115. Szmuszkovicz, J. Benzeneacetamide amines: structurally novel non-mu. Opioids / J. Szmuszkovicz, P. F. Von Voigtlander // *Journal of medicinal chemistry.* – 1982. - 10(25). – P. 1125-1126;

116. Takahiro N. Physical dependence liability of dynorphin A analogs in rodents / N. Takahiro, K. Takeru, Y. Hiroshi, T. Shinro // *European journal of pharmacology.* – 1991. – 201(2). – P. 185-189;

117. Tegeder, I. Pharmacokinetics of opioids in liver disease / I. Tegeder, J. Lötsch, G. Geisslinger // *Clinical pharmacokinetics*. – 1999. – 37(1). – P. 17-40;
118. Teksin Z. S. Evaluation of the transport, in vitro metabolism and pharmacokinetics of Salvinorin A, a potent hallucinogen / S Teksin, IJ Lee, NN Nemieboka, AA Othman // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2009. – 2(72). – P. 471-477;
119. Thomas, F.T. Isolation and identification of novel metabolites of gemfibrozil in rat urine / F.T. Thomas, J.P. Burgess, D.P. Coleman // *Drug Metab. Dispos.* – 1999. – Vol. 27, №1. – P.147- 157;
120. Todtenkopf, M. S. Effects of κ -opioid receptor ligands on intracranial self-stimulation in rats / M.S. Todtenkopf, J.F. Marcus, P.S. Portoghese // *Psychopharmacology*. – 2004. – 4(172). – C. 463-470;
121. Tortella, F.C. Kappa opioids: therapeutic considerations in epilepsy and CNS injury / F.C. Tortella, M.A. Decoster // *Clin. Neuropharmacol.* - 1994. – 17. – P.403–4164;
122. Toutain, P.L. Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics / P.L. Toutain, Ferran A., Bousquet-Mélou A. // *Comparative and Veterinary Pharmacology*. – Springer Berlin Heidelberg, 2010. – P. 19-48;
123. Vachharajani, N. N. The pharmacokinetics of butorphanol and its metabolites at steady state following nasal administration in humans / N.N. Vachharajani, W. Shyu // *Biopharmaceutics & drug disposition*. – 1997. – 18(3). – P. 191-202;
124. Von Voigtlander, P. F. U-50,488, a selective kappa opioid agonist: comparison to other reputed kappa agonists / P. F. Von Voigtlander, R. A. Lewis // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 1982. – 6 (4). – P. 467-470;
125. Wadenberg, M.L. A review of the properties of spiradoline: a potent and selective kappa-opioid receptor agonist / M.L. Wadenberg // *CNS Dr. Rev.* - 2003. – 2(9). – P.187-201;

126. Walker, J.S. Anti-inflammatory effects of opioids / J.S. Walker // *Adv Exp Med. Biol.* – 2003. – 521. – P. 148–160;

127. Wang Y. et al. Comparison of pharmacological activities of three distinct κ ligands (salvinorin A, TRK-820 and 3FLB) on κ opioid receptors in vitro and their antipruritic and antinociceptive activities in vivo / Y. Wang, K. Tang, S. Inan, D. Siebert // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* – 2005. – 312(1). – P. 220-230;

128. Wee, S. Inhibition of kappa opioid receptors attenuated increased cocaine intake in rats with extended access to cocaine / S. Wee, L. Orto, S. Ghirmai, J.R. Cashman // *Psychopharmacology.* – 2009. – 205(4). – P. 565-575;

129. Werkheiser, J. L. Nalfurafine, the kappa opioid agonist, inhibits icilin-induced wet-dog shakes in rats and antagonizes glutamate release in the dorsal striatum / J. L. Werkheiser, S. M. Rawls, A. Cowan // *Neuropharmacology.* – 2007. – 52(3). – P. 925-930;

130. WHO Expert Committee on Drug Dependence. WHO Expert Committee on Drug Dependence: thirty-third report. – World Health Organization, - 2003. – T. 33;

131. WHO Expert Committee on Drug Dependence. WHO Expert Committee on Drug Dependence // World Health Organization technical report series. – 2006. – 942. – P. 1 -26;

132. Woods, J. H. Substitution and primary dependence studies in animals / J. H. Woods, D. E. Gmerek // *Drug and alcohol dependence.* – 1985. – 14(3). – P. 233-247;

133. Yeh, S.Y. The pharmacokinetics of pentazocine and tripeleennamine / S.Y. Yeh, G.D. Todd, R.E. Johnson // *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* – 1986. – 39(6). – P. 669-676;

134. Yoshino H. Synthesis and structure-activity relationships of dynorphin A-(1-8) amide analogs / H. Yoshino, T. Nakazawa, Y. Arakawa // *Journal of medicinal chemistry.* – 1990. – 33(1). – P. 206-212;

135. Zhang Y. Effects of the plant-derived hallucinogen salvinorin A on basal dopamine levels in the caudate putamen and in a conditioned place aversion assay in mice: agonist actions at kappa opioid receptors / Y. Zhang, E.R. Butelman, S.D. Schlussman, A. Ho // *Psychopharmacology*. – 2005. – 179(3). – P. 551-558.