

УДК 615.212:57.085.2

## **К механизму анальгетической активности высокоэффективных анальгетиков нового структурного типа: эксперименты *in vitro***

Е. А. МОРОЗОВА<sup>1</sup>, Т. А. ЗАПАРА<sup>2</sup>, А. С. РАТУШНЯК<sup>2</sup>, С. О. ВЕЧКАПОВА<sup>2</sup>, Т. Г. ТОЛСТИКОВА<sup>1</sup>, Э. Э. ШУЛЬЦ<sup>1</sup><sup>1</sup>Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН, проспект Академика Лаврентьева, 9, Новосибирск 630090 (Россия)

E-mail: morozova@nioch.nsc.ru

<sup>2</sup>Конструкторско-технологический институт вычислительной техники Сибирского отделения РАН, ул. Академика Ржанова, 6, Новосибирск 630090 (Россия)

(Поступила 25.03.14)

### **Аннотация**

Изучено влияние производных пирролидиноморфина с анальгетической активностью на мембранный потенциал изолированных нейронов моллюска, обработанных селективными антагонистами опиоидных рецепторов. Полученные результаты подтверждают показанный ранее в экспериментах *in vivo* на мышцах опиоидный механизм действия этих соединений и указывают на неселективность взаимодействия агента Т-11 со всеми типами опиоидных рецепторов, а также на предпочтительность взаимодействия агента Sh-42 с κ-рецепторами.

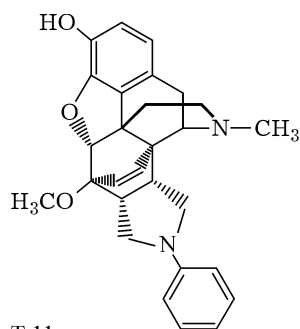
**Ключевые слова:** пирролидиноморфины, мембранный потенциал, изолированные нейроны, опиоидные рецепторы

### **ВВЕДЕНИЕ**

С развитием медицинской химии при создании лекарственных препаратов сегодня эффективно применяется химическая модификация растительных метаболитов. В ходе активного сотрудничества химиков и фармакологов было установлено, что синтетические трансформации молекул биологически активных растительных веществ способствуют усилению их природной активности, снижают нежелательные побочные эффекты и выявляют абсолютно новые полезные свойства. В этой связи нельзя не отметить неизменный интерес к веществам, полученным путем химических трансформаций тебаина, и накопленную весьма внушительную библиотеку соединений, синтезированных на его основе [1].

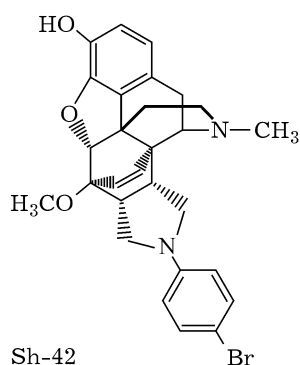
Среди них заслуживают внимания производные 6,14-эндоэтен-7,8-пирролидиноморфина – соединения, проявляющие высокую анальгетическую активность в различных тестах на висцеральную и термическую экспериментальную боль [2–4]. Из 26 исследованных соединений данной группы для дальнейшего углубленного изучения выбраны два наиболее активных агента (соединения Т-11 и Sh-42), которые отличаются лишь наличием атома брома (схема 1).

Присутствие атома брома в структуре агента Sh-42, вероятно, определило селективность его обезболивающего действия. Установлено, что это соединение проявляет эффект только в тестах на висцеральную боль – “уксусные корчи” (УК) и “ацетилхолиновые корчи” (АхК), в то время как агент Т-11 проявляет высокую анальгетическую активность



Т-11

7α,8α-[N'-(фенил)-пирролидино]-6,14-эндоэтно-6,7,8,14-тетрагидроорипавин



Sh-42

7α,8α-[N'-(4-бромфенил)-пирролидино]-6,14-эндоэтно-6,7,8,14-тетрагидроорипавин

Схема 1.

в тестах, вызванных термическим раздражением – “горячая пластина” (ГП) и “отведение хвоста” (ОХ) (табл. 1). Кроме того, обнаружено, что анальгетическая активность этих агентов в тесте УК частично (на 45 и 22 % для агентов Т-11 и Sh-42 соответственно) снимается введением налоксона за 10 мин до воспроизведения модели. Это свидетельствует о вовлечении опиоидной системы в механизм анальгезии изученных соединений [5].

Однако вопрос об участии конкретного вида опиоидных рецепторов (ОР) остается открытым. Цель данной работы – изучение взаимодействия агентов Т-11 и Sh-42 с различными типами ОР в экспериментах *in vitro*.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперименты проведены на изолированных нейронах из окологлоточных ганглиев моллюска *Lymnaea stagnalis* ( $n = 126$ ). Нейроны выделяли механической дефрагментацией ганглиев после обработки 0.3–0.5 % раствором проназы (Protease type XIV, Sigma, США). Изолированные клетки помещали на стеклянные подложки в чашке Петри, в которых содержался физиологический раствор следующего состава, мкмоль/л: NaCl 55, KCl 1.6, CaCl<sub>2</sub> 4, MgCl<sub>2</sub> 1.5, NaHCO<sub>3</sub> 10; pH 7.6–7.8. Регистрацию электрической активности проводили через 18–20 ч после выделения клеток при комнатной температуре. Использовали микроэлектродную технику исследований.

Концентрации агентов подбирали в предварительных экспериментах по их эффекту на мембранный потенциал (МП) нейронов, мкмоль/л: Т-11 – 0.86, Sh-42 – 1.4. Агенты (20 мкл) апплицировали с помощью близко расположенной к нейрону автоматической микропипетки. Антагонисты (Sigma, США) добавляли непосредственно в чашку Петри (объем 5 мл) в следующих концентрациях: антагонист μ-ОР, H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH<sub>2</sub> (СТАР) – 1 мкмоль/л; κ-ОР, nor-binaltorphimine и δ-ОР Naltrindole hydrochloride – 10 мкмоль/л. Влияние блокаторов ОР оценивали по способности клеток демонстрировать типичную реакцию на

ТАБЛИЦА 1

Анальгетическая активность агентов Т-11 и Sh-42 на различных моделях

Агенты	Количество корчей		Латентное время, с	
	Укусные корчи	Ацетилхолиновые корчи	Горячая пластина	Отведение хвоста
Т-11	0.0±0.0*	0.0±0.0*	26.5±3.1*	31.4±1.7*
Sh-42	0.0±0.0*	0.0±0.0*	12.0±1.4	9.2±0.4
Контроль	12.4±0.8	1.5±0.2	9.4±1.0	8.4±0.3

\*  $p < 0.05$  относительно контроля.

агенты T-11 и Sh-42 после их предварительной инкубации с антагонистами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Влияние агентов T-11 и Sh-42 на мембранный потенциал интактных нейронов

Результаты проведенных экспериментов показали, что аппликация тестируемых агентов T-11 и Sh-42 в концентрациях на уровне мкмоль/л вызывают прямые реакции нейронов. Эти изменения МП, обусловленные воздействием веществ, наблюдались в течение 30–40 мин. За это же время потенциал покоя (ПП) нейронов, обработанных агентами T-11 или Sh-42, переходил на новый уровень и стабилизировался (рис. 1).

Аппликация агента T-11 у всех исследованных нейронов вызывала продолжительную гиперполяризацию, которая в среднем не превышала  $(6 \pm 2)$  мВ. Далее наблюдалось частичное восстановление МП и стабилизация ПП на более отрицательном уровне по сравнению с ПП интактных нейронов (см. рис. 1). Агент T-11, проявивший высокую анальгетическую активность во всех проведенных *in vivo* тестах, оказывал гиперполяризующее

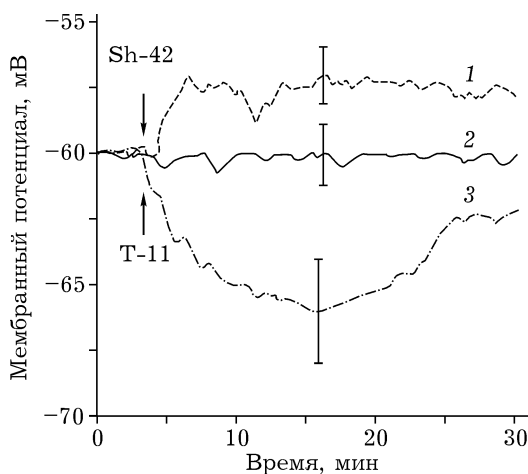


Рис. 1. Влияние агентов T-11 и Sh-42 на мембранный потенциал (МП) нейронов: 1 – изменения МП, вызванные аппликацией агента Sh-42 ( $n = 20$ ); 2 – потенциал покоя интактных нейронов ( $n = 10$ ); 3 – изменения МП, вызванные аппликацией агента T-11 ( $n = 12$ ).

воздействие на нейроны моллюсков. Анальгетическая активность известных агонистов  $\mu$ -,  $\delta$ - и  $\kappa$ -ОР для многих типов клеток связана с гиперполяризацией в результате увеличения проводимости мембраны для  $K^+$  [6–8].

Агент Sh-42 оказывал противоположное воздействие на МП нейронов. Аппликация этого агента вызывала деполяризационный сдвиг МП нейронов, имеющий двухфазный характер. Сначала развивался кратковременный (6.5–7 мин) деполяризационный сдвиг МП, в результате чего его величина приближалась к базовому уровню ПП. Затем отмечается второй подъем МП, который по амплитуде не превышает первый, но более стабилен и сохраняется на протяжении всего времени наблюдения.

Возможно, деполяризационный сдвиг МП, вызванный концентрациями Sh-42 на уровне мкмоль/л, обусловлен его мембранотропным действием. Для нейронов прудовика показано, что неселективный агонист  $\mu$ -,  $\delta$ - и  $\kappa$ -ОР трамадол, агонист  $\kappa$ - и антагонист  $\mu$ -ОР буторфанол, агонисты  $\mu$ -ОР промедол и морфин подавляют натриевые, кальциевые и калиевые ионные токи [9]. При блокаде натриевых каналов лигандами ОР мембрана клеток деполяризуется, что отражается на функционировании нейронов. По данным работ [10], мембранотропное действие опиоидных анальгетиков схоже с влиянием на нейроны местных анестетиков. Однако нельзя исключить и прямого воздействия Sh-42 на ОР. Нервная система моллюсков обладает развитой опиоидной системой, которая включает как специфические ОР, так и эндогенные пептиды, и не имеет принципиальных отличий от опиоидной системы высших животных [11]. На различных типах нейронов млекопитающих показано, что лиганды опиоидов в зависимости от концентрации и типа клеток могут оказывать двойные гипер- и деполяризующие эффекты с различной временной динамикой. Низкие концентрации агонистов  $\mu$ -,  $\delta$ - и  $\kappa$ -ОР (меньше наномоль/л) вызывают кратковременное увеличение проводимости мембраны для  $K^+$  (в пределах 1 мин), за которым следует длительное уменьшение проводимости, сопровождаемое деполяризацией. Действие более высоких концентраций (на уровне мкмоль/л), напротив, оборачивается быстрым и длительным увеличением про-

ТАБЛИЦА 2

Сохранение реакции нейронов на введение агентов Т-11 и Sh-42 на фоне преинкубации клеток с антагонистами ОР (I фаза реакции нейронов на Sh-42 быстрая, II фаза – продолжительная)

Антагонисты	Агент	
	Т-11	Sh-42
СТАР (μ-антагонист)	100 % (6 из 6)	I фаза 100 % (6 из 6) II фаза 100 % (6 из 6)
Nor-binaltorphimine (κ-антагонист)	100 % (6 из 6)	–
Naltrindole hydrochloride (δ-антагонист)	100 % (6 из 6)	–
μ-антагонист + κ-антагонист	86 % (18 из 21)	I фаза 100 % (из 12) II фаза 0 % (из 12)
μ-антагонист + κ-антагонист + δ-антагонист	86 % (18 из 21)	I фаза 100 % (из 6) II фаза 0 % (из 6)

водимости мембраны для  $K^+$  и гиперполяризацией [12]. Однако некоторые агонисты κ-ОР в концентрациях на уровне мкмоль/л вызывают деполяризацию мембраны клеток, что может быть связано с опосредованным через систему G-протеинов и внутриклеточных посредников снижением проводимости мембраны для ионов калия [13, 14]. Таким образом, по действию на МП агент Sh-42 проявляет себя аналогично агонистам κ-ОР, а выявленная селективность анальгетического действия в тестах на висцеральную боль указывает на его предпочтительное взаимодействие с κ-ОР.

#### Влияние агентов Т-11 и Sh-42 на МП нейронов, обработанных антагонистами опиоидных рецепторов

Преинкубация нейронов с селективными антагонистами различных типов ОР (μ-, δ- и κ-) показала, что ни один из этих антагонистов ОР самостоятельно не блокировал реакций нейронов, вызываемых агентом Т-11 (табл. 2). Эти данные согласуются с высокой анальгетической активностью агента Т-11, обнаруженной в тестах *in vivo*, и подтверждают предположение, что Т-11 может действовать как неселективный агонист μ-, δ- и κ-ОР (см. табл. 1). Одновременная преинкубация нейронов с антагонистами μ- и κ-ОР блокировала реакцию клеток на аппликацию агента Т-11 в 86 % случаев (18/21). Комбинация из трех антагонистов не увеличивала число клеток, которые не реагируют на аппликацию Т-11.

Эти данные могут также свидетельствовать о мембранотропном действии агента, связанным с подавлением ионной проводимости мембраны нейронов.

Аппликация агента Sh-42 вызывала двухфазный низкоамплитудный деполяризационный сдвиг МП нейрона, как установлено выше (см. рис. 1). Преинкубация нейронов с селективными антагонистами трех типов ОР показала, что ни один из этих антагонистов ОР не блокировал быструю фазу деполяризации, которая была вызвана аппликацией Sh-42. После преинкубации нейронов с норбиалторфимином (антагонистом κ-рецептора) агент Sh-42 не вызывал поздней фазы реакции – стабильного деполяризационного смещения III. Первая фаза деполяризационного смещения обусловлена мембранотропным действием агента Sh-42. Возможно, это связано с подавлением ионной проводимости мембраны нейронов (натриевой, кальциевой или калиевой). Более медленно развивающаяся стабильная деполяризация подавляется антагонистом κ-ОР, что свидетельствует о прямом воздействии Sh-42 на этот тип ОР.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, эксперименты, проведенные на изолированных нейронах моллюска, подтверждают выявленный ранее в экспериментах *in vivo* на мышцах опиоидный механизм действия высокоэффективных анальгетиков

пирролидиноморфинанового ряда. Кроме того, результаты этой работы указывают на неселективность взаимодействия агента Т-11 со всеми типами ОР и предпочтительность взаимодействия агента Sh-42 с κ-ОР.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта президиума РАН ФНМ-2012-46, интеграционного проекта СО РАН № 108 и базового проекта фундаментальных исследований РАН № 35.1.5

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Толстикова Т. Г., Болкунов А. В., Морозова Е. А., Толстиков С. Е. // *Химия уст. разв.* 2009. Т. 17, № 2. С. 115–133.
- 2 Толстикова Т. Г., Шульц Э. Э., Долгих М. П., Толстиков Г. А. // *ДАН.* 2004. Т. 394. С. 1–2.
- 3 Толстикова Т. Г., Морозова Е. А., Болкунов А. В., Долгих М. П., Бауман В. Т., Толстиков С. Е., Шульц Э. Э. // *Вопр. биол. мед. и фарм. химии.* 2007. Т. 1. С. 33–35.
- 4 Шульц Э. Э., Толстикова Т. Г., Толстиков С. Е., Дайбова В. Т., Шакиров М. М., Болкунов А. В., Долгих М. П. // *Хим.-фарм. журн.* 2007. Т. 41, № 2. С. 15–18.
- 5 Morozova E. A., Tolstikova T. G., Bolkunov A. V., Dolgikh M. P., Shul'ts E. E. // *NPC.* 2008. Vol. 3, No. 10. P. 1621–1624.
- 6 Grudt T. J., Williams J. T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. Vol. 90. P. 11429–11432.
- 7 Chieng B., Christie M. J. // *Br. J. Pharmacol.* 1994. Vol. 113. P. 121–128.
- 8 Blake A. D., Bot G., Tallent M., Law S. F., Li S., Freeman J. C., Reisine T. // *Receptors Channels.* 1997. Vol. 5. P. 231–235.
- 9 Вислобоков А. И., Савоськин А. Л. // *Эксперим. клин. фармакол.* 2000. Т. 63, № 4. С. 7–12.
- 10 Вислобоков А. И., Игнатов Ю. Д., Борисова В. А., Мельников К. Н. // *Психофармакол биол. наркол.* 2006. Т. 6. С. 1192–1196.
- 11 Leung M. K., Stefano G. B. // *Progr. Neurobiol.* 1987. Vol. 28. P. 131–159.
- 12 Fan S. F., Crain S. M. // *Brain Res.* 1995. Vol. 696. P. 97–105.
- 13 Shen K. F., Crain S. M. // *Neuropharmacol.* 1990. Vol. 29, No. 4. P. 343–349.
- 14 Baraban S. C., Lothman E. W., Lee A., Guyenet P. G. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995. Vol. 273. P. 927–933.