

УДК 615.212.7



Электрофизиологическое исследование каппа-опиоидного анальгетика РУ-1205 с применением методов машинного обучения

К.Ю. Калитин^{1,2}, О.Ю. Муха¹, А.А. Спасов^{1,2}¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

² Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования

«Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

400087, Россия, г. Волгоград, ул. Новороссийская, д. 39

E-mail: olay.myha14@gmail.com

Получена 14.09.2023

После рецензирования 12.12.2023

Принята к печати 27.12.2023

Исследование посвящено изучению нового каппа-опиоидного агониста РУ-1205, который проявляет анальгетическое действие, при этом не вызывает дисфорических или авersiveных эффектов. Предполагается, что это может быть обусловлено функциональной селективностью, либо наличием дополнительного механизма действия, который связан с блокированием р38 митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК).

Цель. Экспериментальное выявление механизмов действия соединения РУ-1205, связанных с ингибированием МАРК р38 и функциональной селективностью в отношении каппа-опиоидных рецепторов.

Материалы и методы. Крысам массой 260–280 г ($n=62$) имплантировали хронические корковые и глубокие электроды, выполняли регистрацию LFP-активности после интрацеребровентрикулярного введения веществ с хорошо изученными фармакологическими свойствами (селективный каппа-опиоидный агонист U-50488 100 мкг и блокатор МАРК р38 SB203580 1 мкг), а также изучаемого соединения РУ-1205 350 мкг. Рассчитывали взвешенный индекс фазовой задержки (WPLI), после чего применяли методы машинного обучения с целью снижения размерности и получения интегративных характеристик коннективности (метод главных компонент), затем выполняли классификацию сигналов (модели на основе гауссовских процессов). С помощью метода локальной фиксации потенциала в конфигурации “whole-cell” исследовали спайковую активность пирамидных нейронов базолатеральной миндалины. Нейроны идентифицировали по их свойствам аккомодации. После локальной перфузии исследуемых соединений были получены 3 кривые доза-эффект для: (1) U-50488 в концентрациях от 0,001 до 10 мкМ; (2) комбинации U-50488 (0,001–10 мкМ) и РУ-1205 (10 мкМ); и (3) комбинации U-50488 (0,01–10 мкМ) и РУ-1205 (100 мкМ).

Результаты. Разработанные модели позволили с высокой вероятностью классифицировать соединение РУ-1205 как «неингибитор» МАРК р38. Полученные результаты находят подтверждение в экспериментах «Patch Clamp» на живых срезах мозга, где было продемонстрировано, что U-50488 статистически значимо увеличивает спайковую активность пирамидных нейронов базолатеральной миндалины ($p < 0,05$), при этом РУ-1205 взаимодействует с U-50488, конкурентно подавляя его действие на спайковую активность нейронов.

Заключение. Таким образом, это позволяет предполагать, что соединение РУ-1205 проявляет функциональную каппа-агонистическую активность и не оказывает значимого влияния на МАРК р38. Исследование демонстрирует возможность интеграции электрофизиологических измерений и передовых методов анализа данных для глубокого понимания нейронных механизмов фармакологического действия, а также подчеркивает перспективность дальнейших исследований в данном направлении.

Ключевые слова: каппа-опиоидные анальгетики; электрофизиология; коннективность мозга; патч-зажим; методы машинного обучения; р38 МАРК

Список сокращений: ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ЦНС – центральная нервная система; ACSF – искусственная спинномозговая жидкость; BLA – базолатеральная миндалина; LFP – локальный полевой потенциал; р38 МАРК – р38 митоген-активируемая протеинкиназа; WPLI – взвешенный индекс фазовой задержки.

Для цитирования: К.Ю. Калитин, О.Ю. Муха, А.А. Спасов. Электрофизиологическое исследование каппа-опиоидного анальгетика РУ-1205 с применением методов машинного обучения. *Фармация и фармакология*. 2023;11(5):432–442. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-5-432-442

© К.Ю. Калитин, О.Ю. Муха, А.А. Спасов, 2023

For citation: K.Yu. Kalitin, O.Yu. Mukha, A.A. Spasov. Electrophysiological effects of kappa-opioid analgesic, RU-1205, using machine learning methods. *Pharmacy & Pharmacology*. 2023;11(5):432–442. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-5-432-442

Electrophysiological effects of kappa-opioid analgesic, RU-1205, using machine learning methods

K.Yu. Kalitin^{1,2}, O.Yu. Mukha¹, A.A. Spasov^{1,2}

¹ Volgograd State Medical University,
1, Pavshih Borcov Sq., Volgograd, Russia, 400131

² Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production of Volgograd State Medical University,
39, Novorossiyskaya Str., Volgograd, Russia, 400087

E-mail: olay.myha14@gmail.com

Received 14 Sep 2023

After peer review 12 Dec 2023

Accepted 27 Dec 2023

The study is focused to the investigation of a new kappa-opioid agonist RU-1205, which exhibits an analgesic effect without causing dysphoric or aversive actions. It is assumed that this effects may be due to its functional selectivity, or the presence of an additional mechanism of action that involves blocking p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK).

The aim of the study was an experimental identification of RU-1205 mechanisms of action associated with the inhibition of MAPK p38 and functional selectivity for kappa opioid receptors.

Materials and methods. The LFP activity was recorded in the male rats weighing 260–280 g ($n=62$) and implanted with chronic cortical and deep electrodes, after the intracerebroventricular administration of the well-studied reference substances: the selective kappa-opioid agonist U-50488 100 μ g; the MAPK p38 blocker SB203580 1 μ g; and the investigational compound RU-1205 at 350 μ g. The weighted phase lag index (WPLI) was calculated. Subsequently, machine learning methods were employed to reduce the dimensionality and extract connectivity features using the principal component analysis method, then a signal classification was performed (models based on Gaussian processes). Using the local patch-clamp technique in the “whole-cell” configuration, the spike activity of pyramidal neurons in the basolateral amygdala was studied. Neurons were identified by their accommodation properties. After local perfusion of the test compounds, 3 dose-response curves were obtained for: (1) U-50488 at concentrations ranging from 0.001 to 10 μ M; (2) combinations of U-50488 (0.001–10 μ M) and RU-1205 (10 μ M); and (3) the combinations of U-50488 (0.01–10 μ M) and RU-1205 (100 μ M).

Results. The developed models made it possible to classify the compound RU-1205 as a “non-inhibitor” of MAPK p38 with a high probability. The results obtained were confirmed in patch-clamp experiments on acute brain slices where it was demonstrated that U-50488 statistically significantly increases the spike activity of pyramidal neurons of the basolateral amygdala ($p < 0.05$), and RU-1205 interacts with U-50488, competitively suppressing its effect on the spike activity of neurons.

Conclusion. The findings suggest that compound RU-1205 displays properties consistent with a functional kappa agonist activity and does not have a significant effect on MAPK p38. The study demonstrates the possibility of integrating electrophysiological measurements and advanced data analysis methods for a deep understanding of drug action and underscores the potential for further research in this area.

Keywords: kappa-opioid analgesics; electrophysiology; brain connectivity; patch-clamp; machine learning methods; p38 MAPK

Abbreviations: BBB – blood-brain barrier; CNS – central nervous system; ACSF – artificial cerebrospinal fluid; BLA – basolateral amygdala; LFP – local field potential; p38 MAPK – p38 mitogen-activated protein kinase; WPLI – weighted phase lag index.

ВВЕДЕНИЕ

Среди наиболее распространенных медицинских проблем болевой синдром занимает ведущее место [1]. Независимо от локализации боли, а также ее характера (острый или хронический), наиболее доступным методом борьбы с ней остается применение анальгетиков [2].

Большая часть наркотических анальгетиков, используемых в клинической практике, действует на мю-опиоидный тип рецепторов, однако применение этих препаратов связано с серьезными побочными эффектами, такими как развитие зависимости, тошнота, угнетение дыхания, констипация и др. [3] При этом было установлено, что агонисты каппа-опиоидных рецепторов оказывают обезболивающее действие, не вызывая побочных реакций со стороны

дыхания и желудочно-кишечного тракта, а также имеют низкий наркогенный потенциал [4]. Тем не менее, их применение ограничено, поскольку они могут повлечь за собой авersive эффекты, включая депрессию, дисфорию и галлюцинации [5].

Каппа-опиоидные рецепторы локализованы в центральной и периферической нервной системе. Они участвуют в регуляции боли, настроения, поведения, двигательной активности, выполняют нейропротекторные и нейроэндокринные функции [5, 6]. Активные конформации рецептора обеспечивают рекрутинг эффекторных молекул, основными из которых являются G-белки и бета-аррестины. Предполагается, что анальгетическое действие каппа-агонистов связано с активацией G-белков и последующим ингибированием

аденилатциклазы, усилением калиевой и ослаблением кальциевой проводимости [7]. Активация бета-аррестинового пути ведет к подавлению G-белкового сигналинга, десенсибилизации и интернализации каппа-опиоидного рецептора, что является одной из причин развития толерантности. Кроме того, бета-аррестины могут инициировать протеинкиназу p38, которая является важным компонентом механизма развития аверсивных побочных эффектов [8].

В настоящее время актуальной задачей является поиск более безопасных агонистов каппа-опиоидных рецепторов с анальгетической активностью [9]. Среди решений этой задачи можно выделить следующие направления: 1) создание препаратов, которые обладают только периферическим действием, то есть не проникают через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и не действуют на центральную нервную систему (ЦНС); 2) поиск функционально селективных веществ, активирующих определенный сигнальный путь (например, G-белки, не задействуя бета-аррестины) [10]. Предполагается, что особенности конформации рецептора при связывании с агонистом определяют функциональную селективность.

Настоящая работа посвящена изучению активности нового каппа-опиоидного агониста РУ-1205. В отличие от классических представителей данного класса, соединение РУ-1205 проявляет выраженное анальгетическое, противосудорожное [11, 12] и нейропротекторное [13] действие, при этом не вызывает дисфорических или аверсивных эффектов. Это свойство может быть обусловлено функциональной селективностью, либо наличием дополнительного механизма действия, который связан с блокированием митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) p38, поскольку ранее было показано, что ингибитор p38 SB203580 может полностью устранять аверсивное действие каппа-опиоидных агонистов [14].

Поскольку аверсивные эффекты могут проявляться как на клеточном, так и на системном уровне нейрональной организации, нами использованы метод локальной фиксации потенциала и регистрация локальных полевых потенциалов (LFP) с последующим расчетом взвешенного индекса фазовой задержки (WPLI) и применением машинного обучения (ML), в качестве инструмента для определения отличий и сходств лигандов с хорошо изученными фармакологическими свойствами, таких как U-50488, а также ингибитор МАРК p38 SB203580.

ЦЕЛЬ. Выявление механизмов действия РУ-1205, связанных с ингибированием МАРК p38 и функциональной селективностью.

Результаты данного исследования позволяют расширить понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе анальгетических и побочных эффектов при применении каппа-опиоидных агонистов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Исследование включало в себя два основных этапа. На первом этапе регистрировали локальный полевой потенциал (LFP) после введения исследуемых веществ, затем рассчитывали взвешенный индекс фазовой задержки и анализировали данные с помощью методов ML.

На втором этапе методом локальной фиксации потенциала изучалось взаимодействие соединения РУ-1205 с U-50488 на клеточном уровне с целью уточнения механизма действия вещества РУ-1205 и дополнительной валидации результатов классификации LFP.

Исследуемые соединения

В качестве исследуемых объектов использовали соединение 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-а]бензимидазол – РУ-1205 (синтезировано в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, Россия); соединение U-50488 (Sigma Aldrich, США); соединение SB203580 (Sigma Aldrich, США).

Продолжительность исследования и условия проведения

Исследование проводилось в период с мая по сентябрь 2023 года. Все экспериментальные процедуры выполнялись в условиях лаборатории электрофизиологических исследований Научного центра инновационных лекарственных средств Волгоградского государственного медицинского университета (НЦИЛС ВолгГМУ).

Этическая экспертиза

Эксперименты на животных проводились в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, принципам надлежащей лабораторной практики (GLP) (ГОСТ 33044-2014, 2021), а также руководящих принципов ARRIVE (Animal Research: Reporting of *in vivo* Experiments). Проведение исследования одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (Регистрационный номер IRB00005839 IORG0004900, справка № 2022/096 от 21.01.2022).

Животные

Для проведения эксперимента использовали белых крыс-самцов весом 260–280 г ($n=62$). Животных содержали в стандартных условиях вивария при 12-часовом режиме, диапазон температур составлял $22\pm2^{\circ}\text{C}$, со свободным доступом к пище и воде. Животные были воспроизведены в виварном блоке НЦИЛС ВолгГМУ.

Оперативные вмешательства

Имплантация электродов из нержавеющей стали ($\varnothing$ 0,1 мм) проводилась в условиях изофлуранового наркоза (Laboratories Karizoo, S.A., Испания) с использованием системы ингаляционной анестезии для грызунов (Ugo Basile Veterinary anesthesia workstation 21100, Италия). После выполнения трепанационных отверстий электроды размещали в соответствии со стереотаксическими координатами относительно брегмы.

Корковые электроды: F – переднезадняя ось (AP)=0,00; медиолатеральная ось (ML)=2,00; P – AP=-4,08, ML=2,00; O – AP=-7,08, ML=2,00.

Глубокие электроды: прелимбическая кора (PrL) – AP=+2,7 мм, ML=0,8 мм; дорсовентральная (DV)=3,8 мм; базолатеральная миндалина (BLA) – AP=-2,8 мм, ML=5–5,3 мм, DV=8,8 мм; гиппокамп (Hipp) – AP=-4,9 мм, ML=4,8 мм, DV=6,0 мм; вентральная область покрышки (VTA) – AP=-5,2 мм, ML=1,0 мм, DV=8,6 мм; прилежащее ядро (NAc) – AP=+1,8 мм, ML=1,6 мм, DV=7,3 мм.

Имплантация направляющей канюли из нержавеющей стали 21 калибра для интрацеребровентрикулярных инъекций исследуемых соединений проводилась в левый боковой желудочек головного мозга по стереотаксическим координатам относительно брегмы: AP=-0,6 мм, ML=1,6 мм, DV=4,0 мм. Интрацеребровентрикулярный путь введения был выбран с целью повышения биодоступности веществ, а также исключения развития эффектов за пределами ЦНС, которые могут опосредовать вторичное воздействие на функции головного мозга и исказить результаты эксперимента. Электроды и канюля фиксировались на черепе самотвердеющей пластмассой (Протакрил-М, Украина) и двумя винтами из нержавеющей стали. После операции животные содержались в индивидуальных клетках. На протяжении двух дней животным проводилась антибиотикопрофилактика ципрофлоксацином 50 мг/кг в/б. Послеоперационный период составлял 5–7 дней.

Регистрация LFP сигнала и введение изучаемых веществ

После адаптации животным ($n=30$) вводили ACSF 5 мкл (контрольная выборка), при регистрации опытных выборок сигналов животные получали: соединение PY-1205 350 мкг, соединение U-50488 100 мкг, соединение SB203580 1 мкг, комбинацию SB203580+U-50488 (100 мкг+1 мкг) интрацеребровентрикулярно. Между введениями веществ соблюдались интервалы в 7 дней для достижения полного выведения из организма (не менее 97% на основании периода полувыведения). Дозы для соединений U-50488 [15] и SB203580 [16] подобраны на основании литературных данных.

Соединение PY-1205 вводилось в дозе эквивалентной ЭД₈₀ в моделях боли. Через 30 минут после введения соединений проводилась запись LFP в течение 10 минут. LFP регистрировали в монополярном монтаже с общим усредненным референтом при помощи лабораторного электроэнцефалографа NVX-36 (МКС, Россия). Сигналы оцифровывались с частотой дискретизации 500 Гц.

WPLI анализ сигнала

Чтобы оценить функциональную связанность между парами электродов использовали взвешенный индекс фазовой задержки (Рис. 1). Расчет WPLI между парами электродов проводили с использованием пакета программного обеспечения MNE Python v.1.6.1¹ (BSD-3-Clause license) для следующих частотных диапазонов: дельта 0,5–4 Гц, тета 4–8 Гц, альфа 8–12 Гц, бета 12–30 Гц и гамма 30–50 Гц. Полученные данные анализировали методом главных компонент с помощью программы Graphpad Prism 10.1 с academic license (Dotmatics, США).

Построение ML-модели классификатора

При построении моделей на основе алгоритмов ML использовали открытую библиотеку Python scikit-learn v.1.3.2² (New BSD License). Реализовали метод классификации на основе гауссовских процессов, были построены две модели: GPC-BO-v.02.10-5.2308 (Gaussian Process Classifier с параметрами 10.0 * RBF(5.0), optimizer=None) и GPC-BO-v.02.10-10.2308 (Gaussian Process Classifier с параметрами 10.0 * RBF(10.0), optimizer=None). После обучения моделей строили матрицы несоответствий и проводили 5-кратную кросс-валидацию.

Локальная фиксация потенциала клетки в конфигурации «целая клетка»

Корональные срезы мозга толщиной 500 мкм, были выполнены на уровне базолатерального комплекса 2,5–3,5 мм каудальнее брегмы с использованием вибратома (Campden 7000smz-2, Великобритания). Каждый срез помещали в регистрационную камеру, заполненную искусственной спинномозговой жидкостью (ACSF) (117 мМ натрия хлорида, 4,7 мМ калия хлорида, 1,2 мМ натрия дигидрофосфата, 2,5 мМ кальция хлорида, 1,2 мМ магния хлорида, 25 мМ натрия гидрокарбоната и 11 мМ глюкозы, аэрированный смесью 95% кислорода и 5% углекислого газа при pH=7,4) при температуре 31±1°C со скоростью потока 2 мл/мин.

¹ Zenodo. MNE-Python (v1.6.1). – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://zenodo.org/records/10519948>

² Scikit-learn. Machine Learning in Python. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://scikit-learn.org/stable/index.html>

Регистрация спайковой активности нейронов базолатерального миндалевидного тела (BLA) проводилась с использованием водно-иммерсионного объектива $\times 40$ микроскопа (Olympus BX51, Япония) стандартным методом фиксации потенциала на целой клетке («Patch Clamp» в конфигурации «whole-cell»). Пирамидные клетки в области BLA были идентифицированы по свойствам аккомодации к устойчивой деполяризующей интрацеллюлярной инъекции (200 пА, 500 мс). Микропипетки (сопротивление наконечника 3–5 МОм), изготовленные из боросиликатного стекла, заполняли внутриклеточным раствором, содержащим: 122 мМ К-глюконата, 5 мМ натрия хлорида, 0,3 мМ кальция хлорида, 2 мМ магния хлорида, 1 мМ этиленгликоль-тетрауксусной кислоты (EGTA), 10 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES), 5 мМ динатриевой соли аденозин-5-трифосфата ($\text{Na}_2\text{-ATP}$) и 0,4 мМ натриевой соли гуанозин-5-трифосфата ($\text{Na}_2\text{-GTP}$), pH регулировали в пределах 7,2–7,3 с использованием гидроксида калия (осмолярность регулировалась до 280 мОсм/кг с использованием сахарозы). Сбор данных и анализ сигналов осуществляли с помощью усилителя HEKA Patch Clamp EPC10 USB (HEKA Elektronik, США), ПК Asus microXperts (ASUS, Тайвань), ПО PatchMaster (HEKA Elektronik, США).

Были получены три кривые дозозависимости с оценкой воздействия агониста каппа-опиоидных рецепторов U-50488 на активность пирамидных нейронов в присутствии соединения РУ-1205 и без. Было выделено три группы: (1) локальная перфузия соединения U-50488 в концентрациях от 0,001 до 10 мкМ ($n=8$); (2) комбинация U-50488 (0,001–10 мкМ) и РУ-1205 (10 мкМ) ($n=8$); (3) комбинация U-50488 (0,01–10 мкМ) и РУ-1205 (100 мкМ) ($n=8$). Регистрировали только один нейрон в каждом срезе после аппликации возрастающих доз. ACSF использовался в качестве контроля во всех экспериментах.

Статистическая обработка

Выполнялся логистический регрессионный анализ с построением кривых «доза–эффект» и расчетом максимального эффекта (E_{max}), коэффициента детерминации (R^2) – статистического показателя качества моделей и углового коэффициента («slope»), отражающего величину, на которую изменяется расчетный целевой показатель в среднем при изменении регрессора. После верификации нормальности распределения по тесту Шапиро–Уилка проводили сравнение групп с использованием дисперсионного анализа (ANOVA) для повторных измерений с последующим тестом Даннета с помощью программы GraphPad Prism 10.1. Полученные данные представлены в виде $\text{Me} \pm \text{SEM}$. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рассчитаны значения WPLI для 64 электродных пар по 5 основным ритмам (140 параметров для каждого сигнала). С учетом наличия мультиколлинеарности между признаками, дальнейший анализ выполнялся методом главных компонент с целью сокращения числа переменных путем их объединения в интегративные характеристики коннективности на основании структуры взаимосвязей между ними. Выделено 2 первые наиболее значимые компоненты, которые объясняют 58,32% вариативности (собственные значения >1).

Ранее было установлено, что аверсивный эффект каппа-опиоидных агонистов тесно связан с миндалевидным телом [17]. Локальная микроинъекция SB203580 (ингибитора р38 MAPK) в миндалевидное тело приводила к устранению аверсивного действия соединения U-50488 (активатора р38 MAPK) [18]. Нами выявлено усиление связей миндалевидного тела с различными областями мозга после введения U-50488 ($\Delta\text{WPLI} > 0,3$ по сравнению с контролем). Подобных изменений коннективности миндалевидного тела не наблюдалось при сочетании SB203580 с U-50488, что подтверждает антагонистическое взаимодействие между этими препаратами. Учитывая, что параметры WPLI, связанные с миндалевидным телом, имели высокие коэффициенты нагрузки ($>0,7$) на 1 компоненту, можно предполагать сохранение признаков сигнала, связанных влиянием на р38 MAPK.

Следующим шагом для оценки вероятности принадлежности соединения РУ-1205 к классам «ингибитор» и «неингибитор» построены модели классификатора (Рис. 2). С целью повышения стабильности, прогностической надежности и робастности была выбрана модель с ядерной функцией на основе гауссовских процессов (Gaussian Process Classifier).

Согласно полученным прогнозным оценкам, соединение РУ-1205 не проявляет MAPK р38-ингибирующей активности в ЦНС с уровнем средней вероятности не ниже 89,44% по результатам прогноза наиболее робастной модели. Для подтверждения валидности полученных моделей представлена матрица несоответствий и результаты 5-кратной кросс-валидации (Рис. 3, 4).

Второй этап работы основан на исследовании, где было установлено, что блокирование каппа-опиоидных рецепторов в миндалине приводит к снижению спайковой активности пирамидных нейронов [19]. Аналогичный эффект наблюдался при блокировании CRF1 рецепторов, которые (так же как каппа-опиоидные рецепторы), реализуют свой эффект через бета-аррестинный путь и активацию MAPK р38 [20]. Также было достоверно показано полное устранение аверсивного эффекта U-50488 при введении вещества SB203580 в миндалину [18].

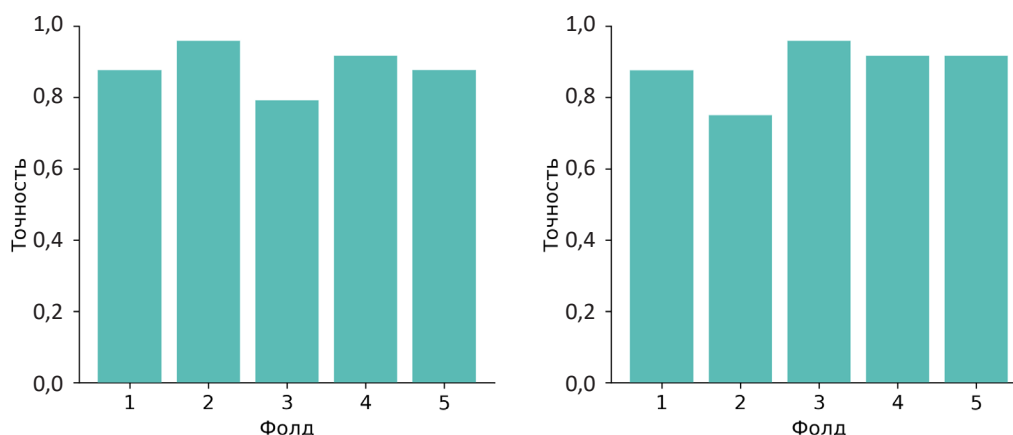


Рисунок 4 – Результаты 5-кратной кросс-валидации модели «GPC-BO-v.02.10-5.2308» (слева) и «GPC-BO-v.02.10-10.2308» (справа)

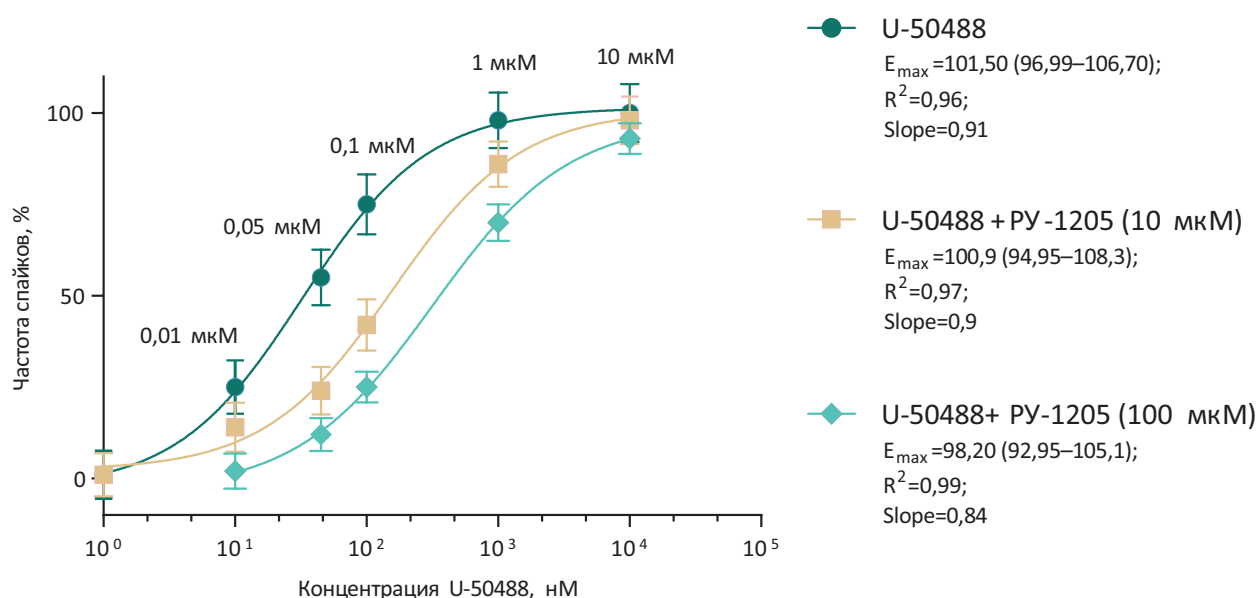


Рисунок 5 – Дозозависимые эффекты соединения U-50488 (концентрации показаны на графике) на спайковую активность пирамидных нейронов миндалины в комбинации с соединением РУ-1205 (концентрация соединения РУ-1205 – 0, 10, 100 мкМ)

Для определения эффекта соединения РУ-1205 (в концентрации 10 и 100 мкМ) на U-50488-индуцированную спайковую активность пирамидных нейронов базолатеральной миндалины вещество апплицировалось в комбинации с возрастающими концентрациями U-50488.

Было установлено, что U-50488 дозозависимо увеличивает частоту спайковой активности пирамидных нейронов BLA, начиная с концентрации 0,01 мкМ ($p < 0,05$). Полученные дозозависимые кривые (Рис. 5) позволяют заключить, что при комбинировании вещества U-50488 и РУ-1205 вступают в конкурентный антагонизм, о чем свидетельствует смещение кривой вправо (без значимого изменения «slope» кривой) и сохранение величины максимального эффекта (плато).

В различных исследованиях было показано,

что каппа-опиоидные агонисты способны влиять на биоэлектрическую активность мозга [21]. Действие опиоидных средств наиболее выражено в таких структурах мозга, как кора [22], гиппокамп [23], мезолимбическая система [24, 25] и миндалина [26], в связи с этим имплантация глубоких электродов выполнена в эти зоны. Ранее установлено, что ингибитор р38 MAPK изменяет нейрональную активность в гиппокампе, а также снижает мощность ЭЭГ в диапазоне гамма-частот у мышей [27]. Исходя из этого, было выдвинуто предположение, что анализ влияния каппа-опиоидных агонистов и блокаторов р38 на LFP может дать понимание о механизме действия производного бензимидазола РУ-1205 со схожим профилем активности. Учитывая, что спектральные изменения LFP носят неспецифический характер, нами предпринята

- analgesia and opioid-induced adverse effects: A review // *Pharmaceuticals*. – 2021. – Vol. 14, No. 11. – Art. ID: 1091. DOI: 10.3390/ph14111091
8. Gopalakrishnan L., Chatterjee O., Ravishankar N., Suresh S., Raju R., Mahadevan A., Prasad T.K. Opioid receptors signaling network // *J Cell Commun Signal*. – 2022. – Vol. 16, No. 3. – P. 475–483. DOI: 10.1007/s12079-021-00653-z
9. Machelska H., Celik M.Ö. Advances in achieving opioid analgesia without side effects // *Front Pharmacol*. – 2018. – Vol. 9. – Art. ID: 1388. DOI: 10.3389/fphar.2018.01388
10. Mores K.L., Cummins B.R., Cassell R.J., van Rijn R.M. A review of the therapeutic potential of recently developed G protein-biased kappa agonists // *Front Pharmacol*. – 2019. – Vol. 10. – Art. ID: 407. DOI: 10.3389/fphar.2019.00407
11. Спасов А.А., Калитин К.Ю., Гречко О.Ю., Анисимова В.А. Противозепилептическая активность нового производного бензимидазола РУ-1205 // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2015. – Т. 160, № 9. – С. 320–323.
12. Kalitin K.Y., Grechko O.Y., Spasov A.A., Sukhov A.G., Anisimova V.A., Matukhno A.E. GABAergic mechanism of anticonvulsive effect of chemical agent RU-1205 // *Bull Exp Biol Med*. – 2018. – Vol. 164. – P. 629–635. DOI: 10.1007/s10517-018-4047-4
13. Калитин К.Ю., Придворов Г.В., Спасов А.А., Муха О.Ю. Влияние каппа-опиоидных агонистов буторфанола и соединения РУ-1205 на биоэлектрическую активность мозга при глобальной ишемии // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. – 2022. – Т. 19, № 3. – С. 128–133. DOI: 10.19163/1994-9480-2022-19-3-128-133
14. Liu-Chen L.Y., Huang P. Signaling underlying kappa opioid receptor-mediated behaviors in rodents // *Front Neurosci*. – 2022. – Vol. 16. – Art. ID: 964724. DOI: 10.3389/fnins.2022.964724
15. Tortella F. C., Robles L., Holaday J. W. U50, 488, a highly selective kappa opioid: anticonvulsant profile in rats // *J Pharmacol Exper Ther*. – 1986. – Vol. 237, No. 1. – P. 49–53.
16. Lemos C., Salti A., Amaral I.M., Fontebasso V., Singewald N., Dechant G., Hofer A., El Rawas R. Social interaction reward in rats has anti-stress effects // *Addict Biol*. – 2021. – Vol. 26, No. 1. – Art. ID: e12878. DOI: 10.1111/adb.12878
17. Ji G., Neugebauer V. Kappa opioid receptors in the central amygdala modulate spinal nociceptive processing through an action on amygdala CRF neurons // *Molecul Brain*. – 2020. – Vol. 13, No. 1. – P. 1–10. DOI: 10.1186/s13041-020-00669-3
18. Zan G.Y., Wang Q., Wang Y.J., Chen J.C., Wu X., Yang C.H., Chai J.R., Li M., Liu Y., Hu X.W., Shu X.H. p38 mitogen-activated protein kinase activation in amygdala mediates kappa opioid receptor agonist U50,488H-induced conditioned place aversion // *Neurosci*. – 2016. – Vol. 320. – P. 122–128. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.01.052
19. Yakhnitsa V., Ji G., Hein M., Presto P., Griffin Z., Ponomareva O., Navratilova E., Porreca F., Neugebauer V. Kappa opioid receptor blockade in the amygdala mitigates pain like-behaviors by inhibiting corticotropin releasing factor neurons in a rat model of functional pain // *Front Pharmacol*. – 2022. – Vol. 13. – Art. ID: 903978. DOI: 10.3389/fphar.2022.903978
20. Dermitzaki E., Tsatsanis C., Gravanis A., Margioris A.N. Corticotropin-releasing hormone induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase // *J Biologic Chem*. – 2002. – Vol. 277, No. 14. – P. 12280–12287. DOI: 10.1074/jbc.M111236200
21. Ona G. Sampedro F., Romero S., Valle M., Camacho V., Migliorelli C., Mañanas M.Á., Antonijoan R.M., Puentes M., Coimbra J., Ballester M.R. The Kappa Opioid Receptor and the Sleep of Reason: Cortico-Subcortical Imbalance Following Salvinorin-A // *Int J Neuropsychopharmacol*. – 2022. – Vol. 25, No. 1. – P. 54–63. DOI: 10.1093/ijnp/pyab063
22. Tejeda H.A., Hanks A.N., Scott L., Mejias-Aponte C., Hughes Z.A., O'donnell P. Prefrontal cortical kappa opioid receptors attenuate responses to amygdala inputs // *Neuropsychopharmacol*. – 2015. – Vol. 40, No. 13. – P. 2856–2864. DOI: 10.1038/npp.2015.138
23. Jamali S., Dezfouli M.P., Kalbasi A., Daliri M.R., Haghighparast A. Selective modulation of hippocampal theta oscillations in response to morphine versus natural reward // *Brain Sci*. – 2023. – Vol. 13, No. 2. – Art. ID: 322. DOI: 10.3390/brainsci13020322
24. Ahmadi Soleimani S.M., Mohamadi M. A. H. M.H., Raoufy M.R., Azizi H., Nasehi M., Zarrindast M.R. Acute morphine administration alters the power of local field potentials in mesolimbic pathway of freely moving rats: Involvement of dopamine receptors // *Neurosci Lett*. – 2018. – Vol. 686. – P. 168–174. DOI: 10.1016/j.neulet.2018.09.016
25. Reakkamnuan C., Cheaha D., Kumarnsit E. Nucleus accumbens local field potential power spectrums, phase-amplitude couplings and coherences following morphine treatment // *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. – 2017. – Vol. 77, No. 3. – P. 214–224. DOI: 10.21307/ane-2017-055
26. Hein M., Ji G., Tidwell D., D'Souza P., Kiritoshi T., Yakhnitsa V., Navratilova E., Porreca F., Neugebauer V. Kappa opioid receptor activation in the amygdala disinhibits CRF neurons to generate pain-like behaviors // *Neuropharmacolog*. – 2021. – Vol. 185. – Art. ID: 108456. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2021.108456
27. Ittner A.A., Gladbach A., Bertz J., Suh L.S., Ittner L.M. p38 MAP kinase-mediated NMDA receptor-dependent suppression of hippocampal hypersynchronicity in a mouse model of Alzheimer's disease // *Acta Neuropathol Commun*. – 2014. – Vol. 2. – P. 1–17. DOI: 10.1186/s40478-014-0149-z
28. Zhang F., Wang F., Yue L., Zhang H., Peng W., Hu L. Cross-species investigation on resting state electroencephalogram // *Brain Topogr*. – 2019. – Vol. 32. – P. 808–824. DOI: 10.1007/s10548-019-00723-x
29. Imperatori L.S., Cataldi J., Betta M., Ricciardi E., Ince R.A., Siclari F., Bernardi G. Cross-participant prediction of vigilance stages through the combined use of wPLI and wSMI EEG functional connectivity metrics // *Sleep*. – 2021. – Vol. 44, No. 5. – Art. ID: zsaa247. DOI: 10.1093/sleep/zsaa247
30. Banks M.I., Krause B.M., Endemann C.M., Campbell D.I., Kovach C.K., Dyken M.E., Kawasaki H., Nourski K.V. Cortical functional connectivity indexes arousal state during sleep and anesthesia // *Neuroimage*. – 2020. – Vol. 211. – Art. ID: 116627. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2020.116627
31. Delgado-Sallent C., Nebot P., Gener T., Fath A.B., Timplalexi M., Puig M.V. Atypical, but not typical,

