

Влияние каппа-агониста опиоидных рецепторов – соединения РУ-1205 на генеративную функцию крыс-самцов

Ю.В. Лифанова , Н.В. Елисеева, А.А. Спасов, М.В. Мальцев, Е.Б. Лаврова, Л.И. Бугаева

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Аннотация. Изучено влияние нового каппа-опиоидного агониста производного бензимидазола (соединения РУ-1205) на генеративную функцию беспородных крыс-самцов при пероральном двухмесячном введении в дозах 5 мг/кг – экспериментально доказанная терапевтическая доза (ТД) и 500 мг/кг (высшая доза 100 ТД). Установлено отсутствие повреждающего действия соединения РУ-1205 на мотивационное половое поведение самцов и процессы сперматогенеза.

Ключевые слова: каппа-агонист, производные бензимидазола, генеративная функция самцов, половое поведение, сперматогенез, оплодотворяющая функция, фертильность

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

doi: <https://doi.org/10.19163/1994-9480-2023-20-4-152-156>

Influence of kappa-agonist of opioid receptors compound RU-1205 on the generative function of male rats

Yu.V. Lifanova , N.V. Eliseeva, A.A. Spasov, M.V. Maltsev, E.B. Lavrova, L.I. Bugaeva

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Abstract. The effect of a new kappa-opioid agonist benzimidazole derivative (compound RU-1205) on the generative function of outbred male rats was studied after oral administration for 2 months at doses of 5 mg/kg – experimentally proven therapeutic dose (TD) and 500 mg/kg (the highest dose is 100 TD). The absence of a damaging effect of the compound RU-1205 on the motivational sexual behavior of males and the processes of spermatogenesis was established.

Keywords: kappa agonist, benzimidazole derivatives, generative function of males, sexual behavior, spermatogenesis; fertilizing function, fertility

Агонисты каппа-опиоидных рецепторов являются перспективной группой лекарственных препаратов для купирования острого и хронического болевого синдрома. Прием каппа-агонистов не сопровождается дыхательной депрессией, эйфорией, тахифилаксией, в отличие от традиционных опиоидных анальгетиков [1]. Установлено, что соединение из ряда бензимидазолов РУ-1205 (дигидрохлорид 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-а]-бензимидазол), синтезированное в НИИ ФОХ ЮФУ г. Ростов-на-Дону, проявляет высокоселективную агонистическую активность в отношении каппа-опиоидных рецепторов [2] и является перспективной мишенью для создания нового отечественного лекарственного средства с анальгетическим потенциалом на его основе [3]. По результатам ранее проведенных токсикологических исследований соединение РУ-1205 относится к малотоксичным [4]. В исследованиях при трехмесячном повторном внутрижелудочном введении крысам градуированными дозами соединение РУ-1205 в дозах 5,0; 50,0 и 500 мг/кг не оказывало повреждающего влияния на интеграль-

ные показатели состояния животных, обмен веществ, гематологические и биохимические показатели крови. Выявленные тенденции угнетающего влияния РУ-1205 в дозе 500 мг/кг на состояние и динамику прироста массы тела, а также функции печени и почек были обратимы, нивелировались в течение одного месяца после отмены введения до уровня контрольных животных, что свидетельствует об отсутствии органотропного патологического влияния [5].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить влияние соединения РУ-1205 на половое поведение, сперматогенез и оплодотворяющую функцию крыс самцов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение влияния соединения РУ-1205 на генеративную функцию проводилось на 48 половозрелых беспородных белых крысах самцах и на 30 самках, массой 220–240 г, 3,5–4-месячного возраста, доставленных из питомника ФКУЗ «Волгоградский научно-исследова-

тельский противочумный институт» Роспотребнадзора и прошедших двухнедельный карантин.

Животные содержались с учетом стандартизированных условий (постановление от 29.08.2014 № 51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. «О защите животных, используемых для научных целей»). Дизайн исследования был одобрен региональным исследовательским этическим комитетом Волгоградской области (регистрационный номер IRB 00005839 IORG 0004900 (OHRP), протокол № 2077-2018 от 30 октября 2018 г.).

Перед началом исследования животных распределяли по группам (с использованием метода рандомизации по массе тела $\pm 10\%$): группа контроля, две опытные группы. Опытным группам ежедневно внутривенно вводили субстанцию соединения РУ-1205 (для получения раствора использовали очищенную воду) в дозах: 5 мг/кг – экспериментально доказанная терапевтическая доза (1-я опытная группа); 500 мг/кг – превышающая терапевтическую дозу в 100 (2-я опытная группа). Группе контроля вводили очищенную воду в объеме 2 мл на 100 г веса животного. Длительность введения испытуемого соединения крысам самцам составляла 2 месяца (ориентировочно один цикл сперматогенеза).

По окончании курса введения соединения РУ-1205 исследовали половое поведение, спермограмму, эпителиосперматогенный слой гонад, а также оплодотворяющую функцию у крыс самцов [6, 7].

Половое поведение у самцов (в паре с интактными самками крыс) исследовали в «площадке зоосоциальных предпочтений» (ПЗП) [8]. В период тестирования у самцов отмечали: латентный период первого подхода к самке (с); количество ее покрытий; число «эмоциональных» подходов самца к самке, а также длительность половой активности (с).

Оценку влияния изучаемого вещества на *сперматогенез* проводили после эвтаназии самцов (метод декапитации на гильотине). На вскрытии у самцов выделяли семенники и эпидидимисы, которые взвешивали на электронных весах, и по соотношению их массе тела животного высчитывали коэффициенты. Вес гонад выражали в граммах (г), а коэффициенты масс – в процентах от общего веса (%). Затем семенники фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина для проведения последующей гистологической обработки тканей и морфометрического исследования [9]. Из эпидидимисов извлекали семенную жидкость и исследовали спермограмму: подсчитывали общее количество сперматозоидов (ОКС, млн), время их подвижности (мин), кислотную (рН) и осмотиче-

скую (%) резистентности; на окрашенных мазках гомогената выявляли количество патологических и неподвижных форм (%).

Морфологическую оценку эпителиосперматогенного слоя проводили на изготовленных препаратах тканей гонад, где подсчитывали среднее количество сперматогоний, число канальцев со слущенным сперматогенным эпителием, количество канальцев с XII стадией мейоза (в 100 канальцах), а также рассчитывали индекс сперматогенеза.

В другой серии экспериментов исследовали влияние субстанции на *оплодотворяющую функцию самцов*. Спаривание тестируемых животных проводили в течение 10 дней (соотношение самцов и самок 1:2). Затем самок отсаживали от самцов в индивидуальные клетки, где за ними наблюдали еще в течение 10 дней [7]. По окончании данного периода самок подвергали эвтаназии (используя метод дислокации шейных позвонков под легким эфирным наркозом). При некропсии самок проводили визуальный осмотр яичников и матки, выделяли их, определяли наличие беременности в рогах матки, рассчитывали индекс беременности. В яичниках забеременевших крыс подсчитывали количество желтых тел беременности. В рогах матки у беременных самок подсчитывали общее количество имплантированных плодов, а также число живых плодов, наличие резорбций. В дальнейшем, на основании полученных результатов рассчитывали эмбриональную гибель до и после имплантации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Отмечено, что относительно контроля у самцов первой опытной группы (получавших изучаемое соединение в терапевтической дозе 5 мг/кг) статистически незначимо снижалась длительность половой активности на 10,4 %, но при этом возрастало количество эмоциональных подходов к интактным самкам и их покрытий на 31,0 и 13,3 % соответственно (табл. 1). У самцов второй опытной (получавших изучаемое соединение в дозе 500 мг/кг – 100 ТД) группы длительность половой активности отчетливо сокращалась на 44,2 % ($p < 0,001$), а количество эмоциональных подходов к самке и число ее покрытий снижалось соответственно на 41,2 % ($p < 0,01$) и на 80 % ($p > 0,05$).

В дальнейшем, из результатов исследований *спермограммы* самцов в первой опытной группе относительно группы контроль прослеживалось отчетливое увеличение общего количества сперматозоидов на 75,7 % ($p < 0,001$), увеличение длительности времени их подвижности на 10 % ($p > 0,05$) и снижение количества патологических форм на 25 % ($p < 0,01$) (табл. 2). У крыс самцов второй опытной группы показатели спермограммы несколько другие зафиксирована

слабая тенденция снижения ОКС на 23,3 % ($p > 0,05$), но при этом количество патологических форм сперматозоидов значительно снизилось на 35 % ($p < 0,001$),

но количество неподвижных форм несколько повышалось на 17,5 % ($p < 0,05$), время подвижности сперматозоидов существенно не изменялось.

Таблица 1

Влияние субстанции соединения РУ-1205 на половое поведение крыс-самцов в исследованиях с интактными самками ($M \pm m$), мин

Исследуемые группы самцов	Длительность		Количество	
	латентного периода половой активности, с	половой активности, с	эмоциональных подходов к самке	покрытый
Контроль, вода очищенная	17,80 ± 0,95	462,0 ± 8,4	15,3 ± 2,3	1,50 ± 0,56
Опытная группа 1, РУ-1205, 5 мг/кг	13,70 ± 0,92 ^{###}	414,0 ± 17,4	20,0 ± 1,39	1,70 ± 0,42
Опытная группа 2, РУ-1205, 500 мг/кг	16,20 ± 1,38	258,0 ± 14,4 ^{###}	9,0 ± 0,58 [#]	0,30 ± 0,21

Примечание: изменения статистически достоверны относительно группы контроля при [#] $p < 0,05$; ^{###} $p < 0,01$; ^{###} $p < 0,001$.

Таблица 2

Влияние субстанции соединения РУ-1205 на функциональное состояние сперматозоидов крыс-самцов ($M \pm m$)

Показатели	Контроль, вода очищенная	Опытная группа 1, РУ-1205, 5 мг/кг	Опытная группа 2, РУ-1205, 500 мг/кг
ОКС, 1×106	30,90 ± 2,87	54,30 ± 1,09 ^{###}	23,70 ± 1,12
Патологические формы, %	16,90 ± 0,92	12,70 ± 0,51 ^{###}	11,00 ± 0,62 ^{###}
Неподвижные формы, %	21,70 ± 1,23	22,30 ± 1,11	25,50 ± 0,81 [#]
Время подвижности, мин	365,00 ± 5,16	400,00 ± 15,22	325,0 ± 13,6
Кислотная резистентность, рН	2,60 ± 0,03	3,60 ± 0,37 [#]	3,00 ± 0,24
Осмотическая резистентность, %	1,90 ± 0,06	1,90 ± 0,05	2,00 ± 0,04 [#]

Примечание: изменения статистически достоверны относительно группы контроля при [#] $p < 0,05$; ^{###} $p < 0,01$; ^{###} $p < 0,001$.

Отсутствие существенных изменений со стороны сперматогенеза подтверждается результатами морфологической оценки эпителиосперматогенного слоя гонад крыс самцов. Выявлено, что у самцов крыс в первой опытной группе в сравнении с контролем индекс сперматогенеза увеличивался на 2,7 % ($p < 0,05$), при этом количество сперматогоний несколько повышалось (в среднем на 2,5 %), число канальцев со слущенным эпителием сокращалось на 10,5 % ($p > 0,05$), а количество канальцев с XII стадией мейоза увеличивалось на 30,4 % ($p > 0,05$). Морфологические изменения, зафиксированные во второй опытной группе также были статистически не значимы, при этом количество сперматогоний в канальцах гонад не изменялось относительно контроля, а количество канальцев со слущенным эпителием снижалось на 15,1 %, число канальцев с XII стадией мейоза повышалось на 21,7 %, а индекс сперматогенеза незначительно повышался на 1,2 %. Полученные результаты могут свидетельствовать об отсутствии повреждающего влияния исследуемой субстанции на сперматогенез.

В другой серии экспериментов на самцах, спаренных с интактными самками, было проанализирова-

но влияние соединения РУ-1205 на оплодотворяющую способность крыс-самцов. По результатам исследований, представленных в табл. 3, отмечено, что у интактных самок, спаренных с самцами первой опытной группы, индекс беременности повышался на 6 % ($p > 0,05$). При этом у этих самок плодовитость не изменялась, а общая эмбриональная гибель сокращалась на 35 %. Возраст эмбрионов в данной группе был в среднем на 2,6 дня больше ($p < 0,05$), что может свидетельствовать о более раннем оплодотворении этих самок самцами первой опытной группы.

В отношении группы интактных самок, спаренных с самцами второй опытной группы, также не обнаружено повреждающего действия изучаемой субстанции на оплодотворяющую способность крыс-самцов. Индекс беременности у данной группы самок относительно группы контроля не изменялся, а плодовитость статистически незначимо снижалась на 15,5 % ($p > 0,05$), при этом общая эмбриональная гибель не изменялась, а возраст плодов у самок превышал контрольные значения на 1,8 дня ($p > 0,05$), что также может свидетельствовать о более раннем спаривании с самками и их оплодотворении.

**Влияние субстанции соединения РУ-1205 на оплодотворяющую способность крыс-самцов
в исследованиях с интактными самками ($M \pm m$)**

Показатели		Контроль, вода очищенная	Опытная группа 1, РУ1205, 5 мг/кг	Опытная группа 2, РУ1205, 500 мг/кг
Количество (у.е. на 1 самку)	желтых тел беременности	12,60 ± 0,45	11,50 ± 0,47	10,30 ± 0,63 ^{##}
	плодов	10,30 ± 0,67	10,00 ± 0,47	8,70 ± 1,01
	резорбций	0,70 ± 0,30	0,90 ± 0,31	0,40 ± 0,16
Гибель, % (на 1 самку)	доимплантационная	12,60 ± 3,32	4,40 ± 1,66 [#]	12,90 ± 5,33
	постимплантационная	6,80 ± 3,01	8,20 ± 2,88	6,50 ± 2,92
Возраст эмбриона, дни		13,20 ± 0,80	15,80 ± 0,63 [#]	15,00 ± 1,09
Индекс беременности, %		90,00 ± 6,67	95,50 ± 4,55	90,00 ± 6,67

Примечание: изменения статистически достоверны относительно группы контроля при [#] $p < 0,05$; ^{##} $p < 0,01$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований можно предположить, что субстанция соединения РУ-1205 при внутрижелудочном введении в течение 2 мес. крыс-самцам в дозах 5 и 500 мг/кг оказывает дозозависимое влияние на генеративную функцию крыс-самцов. В терапевтической дозе 5 мг/кг изучаемое соединение мягко активизирует половое поведение, сперматогенез и оплодотворяющую функцию крыс. При введении соединения РУ-1205 в дозе 500 мг/кг – стократно превышающей терапевтическую дозу, отмечено некоторое угнетающее влияние на половое поведение, при этом повреждающего действия на сперматогенез и фертильность не зафиксировано.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Пчелинцев М.В. Оценка рисков злоупотребления опиоидами в условиях реальной клинической практики. *Реальная клиническая практика: данные и доказательства*. 2023;3(1):30–40. doi: 10.37489/2782-3784-myrdw-29
2. Спасов А.А., Анисимова В.А., Васильев П.М. и др. Средство, обладающее каппа-опиоидной агонистической активностью. Патент № 2413512 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/4188.
3. Spasov A.A., Zvartau E.E., Grechko O.Iu. et al. Study of aversive and p38 mapk-inhibitory properties of kappa-agonist with analgesic activity – compound RU-1205. *Research Results in Pharmacology*. 2020;6(3):59–65. doi 10.3897/rpharmacology6.54558.
4. Семенова Ю.В., Елисеева Н.В., Мазанова Л.С. и др. Острая токсичность каппа-опиоидного агониста – соединения РУ-1205 при пероральном введении. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2019;2:44–47.
5. Бугаева Л. И., Лебедева С. А., Кузубова Е. А. и др. Оценка безопасности каппа-опиоидного анальгетика – соединения РУ-1205. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2022;19(2):111–117. doi 10.19163/1994-9480-2022-19-2-111-117.

6. Методические рекомендации по изучению репродуктивной токсичности лекарственных средств. Составители: Дурнев А.Д., Смольникова Н. М., Скосырева А. М. и др. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Под редакцией А.Н. Миронова и др. М., 2012. Ч.1. С. 80-94.

7. Саноцкий И.В., Фоменко В.И. и др. Методы экспериментального исследования по установлению порогового действия промышленных ядов на генеративную функцию с целью гигиенического нормирования: методические указания НИИ гигиены, труда и профзаболеваний АМН СССР. М., 1978. 24 с.

8. Бугаева Л.И., Спасов А.А., Кузубова Е.А. Фундаментальные проблемы фармакологии: Сборник тезисов 2-го Съезда Российского Научного Общества фармакологов, Москва, 21–25 апреля 2003 года. Ч. 1. М.: Российское научное общество фармакологов, 2003. 254 с.

9. Fogg L.C., Cowing R.F. The changes in cell morphology and histochemistry of the testis following irradiation and their relation to other induced testicular changes. *Cancer Res*. 1951;11(2):81–86.

REFERENCES

1. Pchelincev M.V. Assessing the risks of opioid abuse in real-world clinical practice settings. *Real'naya klinicheskaya praktika: dannye i dokazatel'stva = Real-world clinical practice: data and evidence*. 2023;3(1):30–40. (In Russ.) doi: 10.37489/2782-3784-myrdw-29.
2. Spasov A.A., Anisimova V.A., Vasiliev P.M. et al. A drug with kappa-opioid agonist activity. Patent No. 2413512 C1, Russian Federation, МПК А61К 31/4188. (In Russ.).
3. Spasov A.A., Zvartau E.E., Grechko O.Iu. et al. Study of aversive and p38 mapk-inhibitory properties of kappa-agonist with analgesic activity – compound RU-1205. *Research Results in Pharmacology*. 2020;6(3):59–65. doi 10.3897/rpharmacology6.54558.
4. Semenova Yu.V., Eliseeva N.V., Mazanova L.S. et al. Acute toxicity of kappa-opioid agonist – RU-1205 compounds

when administered orally. *Volgogradskii nauchno-meditsinskii zhurnal = Volgograd scientific and medical journal*. 2019;2: 44–47. (In Russ.).

5. Bugaeva L.I., Lebedeva S.A., Kuzubova E.A. et al. Evaluation of the safety of kappa-opioid analgesic – RU-1205 compounds. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Journal of Volgograd State Medical University*. 2022;19(2):111–117. (In Russ.) doi 10.19163/1994-9480-2022-19-2-111-117.

6. Guidelines for the Study of Reproductive Toxicity of Medicinal Products. Compiled by: Durnev A.D., Smolnikova N.M., Skosyreva A.M. et al. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv = Nonclinical Drug Study Guidelines*. Ed. A.N. Mironov et al. Moscow, 2012. Part 1. P. 80–94. (In Russ.).

7. Sanotsky I.V., Fomenko V.I. and others. Methods of experimental research to establish the threshold effect of industrial poisons on the generative function for the purpose of hygienic rationing: methodological instructions of the Research Institute of Health, Labor and Occupational Diseases of the Academy of Medical Sciences of the USSR. Moscow, 1978. 24 p. (In Russ.).

8. Bugaeva L.I., Spasov A.A., Kuzubova E.A. Fundamental problems of pharmacology: Collection of theses of the 2nd Congress of the Russian Scientific Society of Pharmacologists, Moscow, April 21–25, 2003. Part 1. Moscow, Russian Scientific Society of Pharmacologists, 2003. 254 p. (In Russ.).

9. Fogg L.C., Cowing R.F. The changes in cell morphology and histochemistry of the testis following irradiation and their relation to other induced testicular changes. *Cancer Res*. 1951;11(2):81–86.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Информация об авторах

Юлия Викторовна Лифанова – ассистент кафедры фармакологии и биоинформатики, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; j_semenova_pharm@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9663-5067>

Наталья Владимировна Елисеева – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и биоинформатики, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; nvkirillova@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2243-5326>

Александр Алексеевич Спасов – академик, заслуженный деятель науки, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и биоинформатики, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; aspasov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7185-4826>

Мальцев Михаил Васильевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории токсикологии отдела экспериментальной фармакологии и токсикологии, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; m_maltsev_biolog@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3205-6493>

Лаврова Елена Борисовна – младший научный сотрудник лаборатории токсикологии отдела экспериментальной фармакологии и токсикологии, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; elena.lavrova34@mail.ru

Любовь Ивановна Бугаева – доктор биологических наук, заведующая лабораторией токсикологии отдела экспериментальной фармакологии и токсикологии, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; li_bugaeva@mail.ru

Статья поступила в редакцию 04.07.2023; одобрена после рецензирования 23.10.2023; принята к публикации 28.11.2023.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Information about the authors

Yulia V. Lifanova – Assistant at the Department of Pharmacology and Bioinformatics, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; j_semenova_pharm@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9663-5067>

Natalia V. Eliseeva – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology and Bioinformatics, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; nvkirillova@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2243-5326>

Alexander A. Spasov – Academician, Honored Scientist, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmacology and Bioinformatics, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; aspasov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7185-4826>

Mikhail V. Maltsev – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher at the Laboratory of Toxicology of the Department of Experimental Pharmacology and Toxicology, Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; m_maltsev_biolog@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3205-6493>

Elena B. Lavrova – Junior Researcher at the Laboratory of Toxicology of the Department of Experimental Pharmacology and Toxicology, Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; elena.lavrova34@mail.ru

Lyubov I. Bugaeva – Doctor of Biological Sciences, Head of the Toxicology Laboratory of the Department of Experimental Pharmacology and Toxicology, Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; li_bugaeva@mail.ru

The article was submitted 04.07.2023; approved after reviewing 23.10.2023; accepted for publication 28.11.2023.