

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

НЕЙРОСТЕРОИДОГЕНЕЗ И ОРИЕНТИРОВОЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ГРЫЗУНОВ

Т. С. Калинина, А. А. Шимширт, Н. В. Кудряшов, Т. А. Воронина, С. Б. Середенин¹

Изучено влияние внутрибрюшинного введения селективного блокатора митохондриального транслокационного белка 18kD РК11195 (5 мг/кг), ингибитора 3 α -гидроксистероидной оксидоредуктазы индометацина (5; 10 мг/кг), ингибитора 5 α -редуктазы финастерида (5; 15 мг/кг) и нейростероида прегненолона (20 мг/кг) на ориентировочно-исследовательскую реакцию в тесте “открытое поле” у самцов мышей инбредных линий BALB/c, C57BL/6 и крыс Вистар. Установлено, что введение РК11195 ослабляет ориентировочно-исследовательское поведение в тесте “открытое поле” у мышей обеих линий. Финастерид и индометацин вызывают снижение поведенческой активности у грызунов независимо от вида и типа эмоционально-стрессовой реакции. Прегненолон обладает активирующим действием в тесте “открытое поле”, но при этом потенцирует депримирующий эффект финастерида у мышей BALB/c.

Ключевые слова: тревожные реакции; нейростероиды; финастерид; индометацин; РК11195; мышь; крыса

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время убедительное число исследований указывает на определяющую роль синтеза нейростероидов *de novo* в ЦНС в обеспечении поведенческих реакций на стресс, участии в регуляции когнитивных, социальных, эмоциональных и сопряжённых с половым поведением физиологических функций [7 – 9, 12].

Синтез нейростероидов в ЦНС, преимущественно в лимбических структурах (гиппокамп, миндалевидный комплекс) и гипоталамусе, начинается с активации митохондриального транслокационного белка 18kD (МТБ18) [3, 4, 9, 11]. Одна из функций МТБ18 состоит в связывании с холестерином и транспортировке его в митохондрии, где под действием фермента P-450_{SCC} из холестерина образуется прегненолон (рисунок). Последний после выхода из митохондрий в цитоплазму глиальной или нейрональной клетки проходит каскад превращений по трём основным путям метаболизма: с образованием прогестерона, дегидроэпиандростерона или сульфатных производных прегненолона [9, 11]. В ходе первого метаболического пути фермент 3 β -гидроксистероидная дегидрогеназа преобразует прегненолон в прогестерон, который под влиянием 5 α -редуктазы и 3 β -гидроксистероидной оксидоредуктазы превращается в аллопрегнанонол, обладающий свойствами положительного модулятора нейростероидного участка ГАМК_A-рецептора [2 – 4, 6]. Прегненолона сульфат и дигидроэпиандростерон являются антагани-

стами ГАМК_A-рецептора, могут приводить к активации глутаматных NMDA-рецепторов [12].

Анксиолитические эффекты селективных лигандов МТБ18 (этифоксин, эмапунил) связывают с облегчающим влиянием на синтез аллопрегнанонола [10, 11, 16, 18]. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что тревожно-депрессивные реакции у животных сопровождаются снижением содержания аллопрегнанонола в ЦНС [12, 17]; клинические работы указывают на аналогичные изменения в плазме и спинномозговой жидкости у пациентов с аффективными расстройствами [6, 7]. Сообщают также об уменьшении плотности МТБ18 в тромбоцитах пациентов, страдающих паническими атаками [16].

В эксперименте снижение содержания эндогенного аллопрегнанонола может быть вызвано путем введения соединения РК11195, селективного блокатора МТБ18, или специфических блокаторов ферментов метаболизма прогестерона (трилостан, индометацин, финастерид) [11, 12, 17]. Известно, что системное введение индометацина, избирательно ингибирующего активность 3 α -гидроксистероидной оксидоредуктазы, фермента превращения 5 α -дегидропрогестерона в аллопрегнанонол, снижает ориентировочно-исследовательскую реакцию (ОИР) мышей инбредной линии BALB/c в тесте “открытое поле” [2]. В современной литературе вопрос о том, в какой степени фармакологическая блокада того или иного этапа метаболизма прогестерона отражается на уровне тревожности млекопитающих разного вида, освещен слабо. Известно, что эффективность анксиолитиков зависит от генетически контролируемого типа поведения при стрессовом воздействии [1]. В связи с этим актуальность при-

¹ ФГБУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.
E-mail: zakusovpharm@mail.ru

обретает вопрос о специфике поведенческих ответов на блокаду нейростероидогенеза у инбредных животных с различным фенотипом эмоционально-стрессовых реакций.

Цель настоящего исследования состояла в сравнительном изучении влияния веществ, селективно ингибирующих основные этапы метаболизма прогестерона в ЦНС, на уровень исследовательской активности грызунов разных видов и генотипов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на 113 самцах инбредной линии мышей BALB/c, 77 самцах инбредной линии мышей C57BL/6 массой 20–25 г и 30 самцах крыс Вистар массой 180–200 г (питомник “Столбовая” РАМН). Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественной суточной смене день/ночь. Содержание животных соответствовало

правилам лабораторной практики и Приказу МЗ и СР РФ от 23 августа 2010 г. № 708н “Об утверждении Правил лабораторной практики”. При проведении экспериментов были приняты меры, исключающие излишние физические страдания или повреждения животных.

Селективный блокатор МТБ18 РК11195 (“Sigma Aldrich”), специфический необратимый блокатор 5 α -редуктазы финастерид (“Sigma Aldrich”), ингибитор 3 α -гидроксистероидной оксидоредуктазы индометацин (“Sigma Aldrich”) применяли для моделирования нарушения нейростероидогенеза. Нерастворимые в воде вещества (финастерид, прегненолон, РК11195, индометацин) вводили внутривентриально в суспензии Twin-80 (“Sigma Aldrich”). Мышам вводили дозы исследуемых веществ в объеме 0,1 мл на 10 г массы, крысам — в объеме 0,2 мл на 100 г массы. Финастерид, индометацин, РК11195 или предшественник эн-

Влияние веществ, ингибирующих метаболизм прогестерона, на ориентировочно-исследовательскую реакцию грызунов в тесте “открытое поле”

| Вещество | Доза, мг/кг | Горизонтальная активность | | | Вертикальная активность | Число обследованных отверстий | K _{оир} | % животных, выходящих в центр |
|-----------------------------------|-------------|---------------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| | | Ц | Ц + П | Ц/(Ц + П) × 100, % | | | | |
| <i>Мыши BALB/c</i> | | | | | | | | |
| Физраствор (n = 65) | – | 4,1 ± 0,8 | 19,8 ± 1,4 | 21 | 1,5 ± 0,3 | 1,7 ± 0,3 | 23,2 ± 1,8 | 88 (57/65) |
| РК11195 (n = 20) | 5 | 0,2 ± 0,1** | 3,4 ± 0,5** | 6** | 1,1 ± 0,3** | 1,2 ± 0,2** | 5,6 ± 0,7** | 20 (4/20)** |
| Финастерид (n = 20) | 15 | 2,1 ± 0,5**.# | 9,6 ± 1,4**.# | 22 | 0,6 ± 0,1** | 1,5 ± 0,3 | 11,6 ± 1,4**.# | 55 (11/20)** |
| Индометацин (n = 8) | 10 | 1,4 ± 0,1 | 7,9 ± 1,9**.# | 18 | 1,6 ± 0,8 | 1,4 ± 0,4 | 10,9 ± 2,3**.# | 38 (3/8)** |
| Прегненолон (n = 10) | 20 | 5,9 ± 2,6 | 31,6 ± 7,9 | 19 | 2,0 ± 1,1 | 1,4 ± 0,5 | 35,1 ± 8,0** | 70 (7/10) |
| Финастерид + прегненолон (n = 10) | 15 + 20 | 0,3 ± 0,2**.# | 1,9 ± 0,7**.# | 16 | 0,3 ± 0,1**.# | 1,3 ± 0,3**.# | 3,7 ± 0,9**.# | 20 (2/10)°° |
| <i>Мыши C57BL/6</i> | | | | | | | | |
| Физраствор (n = 37) | – | 9,7 ± 1,5 [×] | 53,8 ± 4,8 [×] | 18 | 8,8 ± 1,6 [×] | 7,7 ± 0,9 [×] | 66,9 ± 5,6 [×] | 100 (37/37) [×] |
| РК11195 (n = 10) | 5 | 6,6 ± 1,4 | 31,8 ± 3,8* | 17 | 6,8 ± 1,5 | 9,1 ± 1,3 | 44,1 ± 6,2* | 100 (10/10) |
| Финастерид (n = 20) | 15 | 1,5 ± 0,1** | 26,0 ± 5,1** | 8** | 4,1 ± 0,8** | 1,3 ± 0,3* | 31,6 ± 5,9** | 55 (11/20)**.# |
| Индометацин (n = 10) | 10 | 5,8 ± 1,1* | 35,3 ± 1,3** | 17 | 6,2 ± 0,9 | 2,6 ± 0,5** | 44,0 ± 1,7** | 100 (10/10) |
| <i>Крысы Вистар</i> | | | | | | | | |
| Физраствор (n = 10) | – | 1,8 ± 0,3 | 14,9 ± 1,2 | 12 | 5,8 ± 0,9 | 0,8 ± 0,4 | 21,5 ± 1,5 | 100 (10/10) |
| Финастерид (n = 10) | 5 | 1,5 ± 0,3 | 13,1 ± 0,9 | 11 | 3,7 ± 0,3* | 0,7 ± 0,3 | 17,4 ± 1,0* | 100 (10/10) |
| Индометацин (n = 10) | 5 | 1,5 ± 0,3 | 12,2 ± 1,5 | 12 | 3,4 ± 0,7* | 1,1 ± 0,3 | 16,6 ± 1,9* | 100 (10/10) |

Примечание. Данные представлены $M \pm S.E.M.$, n — количество мышей в группе; Ц — горизонтальная активность в центральной части установки; П — горизонтальная активность в периферической части установки; Ц/(Ц + П) · 100 (%) — индекс тревожности, уменьшение которого свидетельствует об усилении тревожности мышей; [×] — отличие от BALB/c, которым вводили физиологический раствор, при $p \leq 0,01$; ** — отличие от физиологического раствора при $p < 0,05$; 0,01; #,### — отличие от РК11195 при $p \leq 0,05$; 0,01; °° — отличие от прегненолона при $p \leq 0,01$.

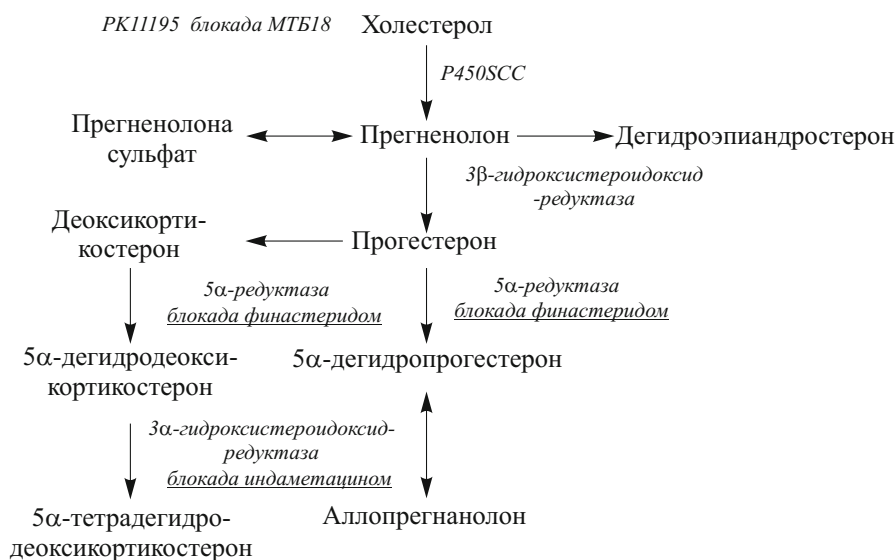


Схема синтеза нейростероидов в мозге (модификация D. A. Finn, 2006)

догенных нейростероидов прегненолон вводили за 30–40 мин до оценки ОИР. При изучении влияния финастерида на эффекты прегненолона финастерид вводили за 60 мин, а прегненолон — за 30 мин до проведения теста “открытое поле”.

Для оценки ОИР у грызунов использовали тест “открытое поле”. В эксперименте на мышах установка представляла собой квадратную площадку со стороной 40 см, огражденную вертикальными стенками высотой 22 см. Площадка разделена на 25 одинаковых квадратов. В 9 центральных квадратах располагались 16 отверстий диаметром 2 см. Для крыс использовали площадку размером 60 × 60 см с 9 квадратами и 16 отверстиями в полу диаметром 4 см. Освещенность площадки составляла 300 лк в эксперименте на мышах и 150 лк — в опытах на крысах. Перед помещением в установку мыши находились в темноте в течение 20–30 мин, крысы — в помещении с освещением 5 лк в течение 30 мин. Регистрировали горизонтальную двигательную активность у стенок площадки и в ее центральной части, вертикальную активность и число обследованных отверстий в полу установки в течение 2 мин, при суммировании параметров определяли коэффициент ОИР ($K_{\text{оир}}$). Определяли индекс тревожности по соотношению активности в центральной части установки к сумме активностей в центре и на периферии и фиксировали число животных, осуществлявших полный переход в центральные квадраты.

После проверки на нормальность распределения по критерию Шапиро-Уилка данные были представлены в виде средних значений по группе с указанием ошибки стандартного отклонения. Достоверность отличий между группами определяли по методу однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением критерия множественных сравнений Ньюмена-Кейлса (программа БиоСтат 2009, Профес-

сиональная версия 5.8.4) или методу оценки для выборочных долей вариант (в %). В эксперименте были использованы группы животных численностью от 8 до 65.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Мыши инбредных линий BALB/c и C57BL/6 различались по своей исследовательской активности: $K_{\text{оир}}$ для первых составил $23,2 \pm 1,8$, для вторых — $66,9 \pm 5,6$ ($p < 0,01$), что согласуется с данными литературы [1]. Большинство мышей обеих групп, получавших физиологический раствор, осуществляли выходы в центральную часть “открытое поле”, но вместе с тем различие между линиями по данному параметру составило 17 % ($p < 0,01$) (таблица).

Селективный блокатор МТБ18 РК11195 (5 мг/кг) у мышей линии BALB/c вызывал снижение всех регистрируемых параметров ОИР, по сравнению с показателями в группе контрольных животных. Финастерид (15 мг/кг) уменьшал горизонтальную и вертикальную активности и не оказывал влияния на число обследованных отверстий и индекс тревожности (таблица). Индометацин (10 мг/кг) оказывал ингибирующее действие лишь в отношении горизонтальной активности животных, тем не менее, все же снижал $K_{\text{оир}}$ в 2 раза, по сравнению с контролем подобно финастериду (таблица).

РК11195 и ингибиторы метаболизма прогестерона вызывают не только снижение $K_{\text{оир}}$, но и уменьшают процент животных, вышедших в центральную часть установки, по сравнению с животными контрольной группы, что может свидетельствовать об усилении тревожности (таблица). При селективной блокаде МТБ18 также отмечали увеличение тревожности, что проявлялось в уменьшении соотношения двигатель-

ной активности животных в центральной и периферической частях установки “открытое поле” (таблица).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о снижении ОИР у мышей BALB/c при фармакологическом нарушении всех исследуемых этапов метаболизма прогестерона. Селективная блокада функциональной активности МТБ18 при системном введении РК11195 приводит к более глубокому подавлению поведенческой активности в тесте “открытое поле”, по сравнению с нарушением ферментативной активности 5 α -редуктазы при системном применении финастериды или 3 α -гидроксистероидной оксидоредуктазы — при инъекции индометацина.

Селективное ингибирование активности МТБ18 у мышей C57BL/6 вызывало уменьшение горизонтальной активности и $K_{опр}$. Финастерид снижал все регистрируемые параметры поведения в тесте “открытое поле”, оказывая наиболее значительные изменения в отношении центральной горизонтальной активности (таблица). Индометацин уменьшал горизонтальную активность и число обследованных отверстий, не оказывая влияния на вертикальную активность мышей C57BL/6 (таблица). Депримирующее действие финастериды сочеталось со снижением процента животных, осуществлявших выход в центральную часть установки и уменьшением индекса тревожности. Ослабление исследовательского поведения, вызванное применением РК11195 или индометацина, не сопровождалось уменьшением активности в центральной части установки.

У крыс Вистар ингибиторы метаболизма прогестерона в изученных дозах вызывали сопоставимое между собой (на 36 – 41 %) снижение вертикальной активности без изменения индекса тревожности и распределения двигательной активности между центральной и периферической частями установки (таблица).

Прегненолон вызывал поведенческую активацию в тесте “открытое поле” без изменения процента животных, посещающих центральную часть установки. Вместе с тем введение эндогенного предшественника нейростероидов на фоне финастериды приводило к более глубокому подавлению ориентировочно-исследовательского поведения мышей, по сравнению с применением одного финастериды (таблица).

Результаты настоящего исследования, свидетельствующие об уменьшении параметров ОИР у мышей и крыс при внутрибрюшинном введении РК11195 или ингибиторов метаболизма прогестерона, согласуются с данными литературы об анксиогенных эффектах индометацина, финастериды, РК11195 у крыс в условиях теста “открытое поле”, приподнятого крестообразного лабиринта, при оценке реакции замирания и зоосоциальных взаимодействий при введении блокаторов нейростероидогенеза непосредственно в структуры мозга (гиппокамп и область вентромедиальной покрышки) [8, 11]. При системном введении РК11195, трилостана, индометацина или финастериды регистрировали инги-

бирование анксиолитических свойств селективных лигандов МТБ18 этифоксина и эмапунилы [12, 20].

Представленные в литературе данные о влиянии экзогенного прегненолона или его сульфатов на уровень тревожности в эксперименте *in vivo* не однозначны, поскольку сообщается как об анксиолитическом [14, 15], так и анксиогенном действии предшественника нейростероидов [14]. Имеются данные о том, что сульфатные производные прегненолона и дигидроэпиандростерона являются антагонистами ГАМК_A-рецепторов и/или агонистами глутаматных NMDA-рецепторов [18], что может объяснять анксиогенные эффекты при системном применении прегненолона. В нашем эксперименте прегненолон не только не обнаруживал анксиолитического действия на фоне применения финастериды, но даже усиливал ингибирующее влияние последнего на ОИР мышей BALB/c. Одно из объяснений этих результатов может состоять в том, что ингибирование 5 α -редуктазы приводит к увеличению содержания прогестерона, и введение прегненолона при этом может смещать соотношение нейростероидов в мозге сторону преобладания ГАМК_A-негативных метаболитов прегненолона.

Фармакологическая мишень МТБ18 уже стала основой для создания оригинальных психотропных средств. В настоящее время в клинической практике применяется этифоксин (стрезам) с анксиолитическими и противосудорожными свойствами. Однако данный препарат, производное бензоксазина, связывается не только с МТБ18, но и с небензодиазепиновым сайтом ГАМК_A-рецептора [11, 13, 19]. В клинических исследованиях изучают лиганд МТБ18 производное ацетамида ХВД173 (эмапунил, ранее — АС-5216), проявивший анксиолитический эффект при панических атаках, свободный от седативного действия и не вызывающий, по предварительным данным, зависимости [16].

Результаты настоящей работы свидетельствуют, о том, что снижение активности основных ферментов метаболизма прогестерона ведет к подавлению исследовательской активности у мышей независимо от фенотипа ответа на эмоциональный стресс, поэтому поиск путей фармакологической коррекции биотрансформации прогестерона, направленных на образование ГАМК_A позитивных нейростероидов, следует рассматривать в качестве актуального направления для создания оригинальных анксиолитиков, превосходящих известные, в частности бензодиазепины и ингибиторы обратного захвата серотонина, по селективности эффекта и скорости его достижения.

ВЫВОДЫ

1. Селективная блокада митохондриального транслочационного белка 18kD путем системного введения РК11195 (5 мг/кг) снижает коэффициент ориентировочно-исследовательской реакции на 76 % у самцов мышей BALB/c и на 19 % — у самцов мышей

C57BL/6, по сравнению с контрольными группами животных. PK11195 в 3 – 4 раза снижает активность мышей BALB/c в центральной части экспериментальной установки, что свидетельствует об усилении тревожности животных.

2. Финастерид (15 мг/кг, однократно, внутривнутрибрюшинно) и индометацин (10 мг/кг, однократно, внутривнутрибрюшинно) вызывают снижение коэффициента ориентировочно-исследовательской реакции у мышей независимо от типа эмоционально-стрессовой реакции на 34 – 53 %, и в дозе 5 мг/кг — на 19 – 23 % у крыс Вистар.

3. Прегненолон (20 мг/кг) обладает активирующим действием в тесте “открытое поле” у мышей BALB/c, увеличивая коэффициент ориентировочно-исследовательской реакции животных на 51 %, по сравнению с контрольной группой мышей, но при этом на 68 % усиливает депримирующий эффект финастерида.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-01596.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. Б. Середенин, М. А. Яркова, М. В. Воронин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **1**, 63 – 65 (2001).
2. А. А. Шимширт, Т. С. Калинина, Т. А. Воронина, *Рос. био-терапевт. журн.*, **1**(11), 45 – 47 (2012).
3. G. Akk, D. F. Covey, A. S. Evers, et al., *Pharmacol. Ther.*, **116**(1), 35 – 57 (2007).
4. J. L. Do-Régo, J. Y. Seong, D. Burel, et al., *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **3**(4), 1 – 15 (2012).
5. M. Duskova, M. Hill, M. Matouskova, L. Starka, *Prague Medical Report.*, № 3, 222 – 230 (2009).
6. D. A. Finn, A. S. Beadles-Bohling, E. H. Beckley, et al., *CNS Drug Reviews*, **12**(1), 53 – 76 (2006).
7. C. A. Frye, *Psychoneuroendocrinology*, **34**, 143 – 161 (2009).
8. V. Kalinin, *Anxiety disorders*, In Tech (2011).
9. S. Kawata, M. Yamad, T. Kimoto, *Adv. in Biophys.*, **37**, 1 – 30 (2001).
10. A. Kita, H. Kohayakawa, T. Kinoshita, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **142**(7), 1059 – 1072 (2004).
11. P. Longone, F. Michele, E. D'Agati, et al., *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **2**(55), 1 – 9 (2011).
12. G. MacKenzie, *J. Magure. Biol. Mol. Concepts.*, **4**(1), 29 – 42 (2013).
13. J. Micallef, C. Soubrouillard, F. Guet, et al., *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **15**, 209 – 216 (2001).
14. C. L. Melchior, R. F. Ritzmann, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **48**(4), 893 – 897 (1994).
15. D. S. Reddy, S. K. Kulkarni, *Brain Res.*, **752**(1–2), 61 – 71 (1997).
16. R. Rupprecht, G. Rammes, D. Eser, et al., *Science*, **325**, 490 – 493 (2009).
17. J. Sarkar, S. Wakefield, G. MacKenzie, et al., *J. Neurosci.*, **31**(50), 18198 – 18210 (2011).
18. M. Sedlacek, M. Korinek, M. Petrovici, et al., *Physiol. Res.*, **57** (Suppl. 3), S49 – S57 (2008).
19. D. Servant, P. L. Graziani, D. Moyses, et al., *Encephale*, **24**, 569 – 574 (1998).
20. R. R. Ugale, A. N. Sharma, D. M. Kokare, et al., *Brain Research*, **12**, 193 – 201 (2007).

Поступила 16.12.13

NEUROSTEROIDOGENESIS AND EXPLORATORY RESPONSES IN RODENTS

T. S. Kalinina*, A. A. Shimshirt, N. V. Kudryashov, T. A. Voronina, and S. B. Seredenin

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiyskaya 8, Moscow, 125315, Russia.

* e-mail: zakusovpharm@mail.ru

We have studied the influence of intraperitoneal introduction of a selective blocker of mitochondrial translocation protein 18kD PK11195 (5 mg/kg), indomethacin (5 and 10 mg/kg), finasteride (5 and 15 mg/kg), and neurosteroid pregnenolone (20 mg/kg) on the exploratory behavior of male BALB/c mice, C57BL/6 mice, and Wistar rats in open-field test. It is found that treatment with PK11195 weakens the exploratory behavior in open-field test in mice of both strains. Finasteride and indomethacin decrease the exploratory responses in rodents regardless of the species or type of stress emotional response phenotype. Pregnenolone possesses activating effect in open-field test, but enhances the inhibitory effect of finasteride in BALB/c mice.

Keywords: anxiety responses; neurosteroids; finasteride; indomethacin; PK11195; mouse; rat