

# НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

## ИЗУЧЕНИЕ АНКСИОЛИТИЧЕСКОГО И АНТИДЕПРЕССИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗОГИДРАЗИДА 2,2,6,6-ТЕТРАМЕТИЛПИПЕРИДОНА

П. Л. Наплёкова, В. Б. Наркевич, Т. А. Воронина, Н. В. Кудряшов,  
Л. М. Косточка, В. С. Кудрин<sup>1</sup>

Проведено изучение нейрофармакологических свойств соединения 3,4,5-триметокси-N'-(2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-илиден)бензогидазида гидрохлорида (ЛК-998). Установлено, что указанное вещество в дозах 10 и 20 мг/кг обладает выраженной анксиолитической активностью, что проявляется в значительном возрастании длительности пребывания животных в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) и увеличении числа заходов в них. По эффективности соединение ЛК-998 в дозе 10 мг/кг не уступает афобазолу в дозе 5 мг/кг в тестах ПКЛ и закапывания шариков. В тесте вынужденной беспомощности соединение ЛК-998 в дозах 10 и 20 мг/кг не оказывает антидепрессивного эффекта. Таким образом, соединение ЛК-998 в дозе 10 мг/кг оказывает анксиолитическое и антикомпульсивное действие и по эффективности не уступает афобазолу в дозе 5 мг/кг. ЛК-998 в дозе 200 мг/кг (т.е. в 20 раз превышающей терапевтическую (10 мг/кг)) не вызывает развития побочных эффектов и признаков неврологического дефицита как через 24 ч, так и в более отдалённые сроки (4, 10 и 14 сут) после введения.

**Ключевые слова:** 2,2,6,6-тетраметилпиперидон; анксиолитическая активность; приподнятый крестообразный лабиринт; тест закапывания шариков; открытое поле; тест вынужденной беспомощности.

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из перспективных направлений развития психофармакологии является разработка и изучение соединений, избирательно действующих на обратный захват серотонина (5-НТ). В то же время ряд авторов отмечает недостаточную клиническую эффективность известных модуляторов 5-НТ рецепторов и блокаторов обратного захвата 5-НТ [9]. Более того, установлено, что уменьшение содержания 5-НТ в структурах мозга вызывает снижение степени тревожности [10], тогда как использование селективных ингибиторов обратного захвата серотонина в качестве анксиолитических средств приводит к обратному эффекту, т.е. к возрастанию уровня 5-НТ [7].

Еще с конца 50 г. XX века значительный интерес привлекает группа производных пиперидина, представители которых обладают как нейролептической (группа бутирофенонов, в первую очередь, галоперидол), так и другими видами психотропной активности, в том числе антидепрессивной (ипрониазид, ниаламид и др.). Не ослабевает интерес к поиску новых соединений с антидепрессивными и анксиолитическими свойствами среди веществ данной группы и в настоящее время [7]. Так, обнаружено противотревожное действие у веществ группы ацетамидов пиперидина

<sup>1</sup> ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова”, Россия, 125315, Москва, Балтийская ул., 8; тел. (495) 601-21-53; e-mail: p.napleкова@gmail.com.

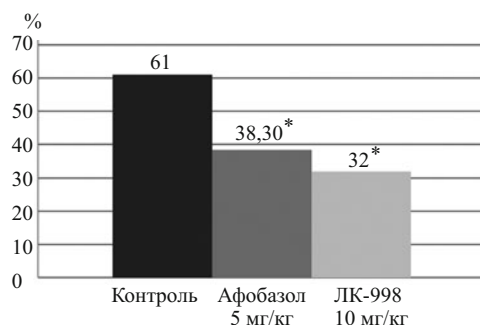
[8]. Сходными эффектами обладают и производные фенциклидина (1-(1-фенилциклогексил)пиперидин, РСР) [6]. В отделе химии ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” было синтезировано соединение 3,4,5-триметокси-N'-(2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-илиден)бензогидазид гидрохлорид (ЛК-998), являющееся производным 2,2,6,6-тетраметилпиперидона, и содержащее в качестве ароматического заместителя фрагмента 3,4,5-триметоксибензойную кислоту.

Целью данной работы явилось изучение потенциальных анксиолитических и антидепрессивных свойств соединения ЛК-998 в сравнении с афобазолом.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на белых беспородных мышцах-самцах массой 20–25 г, содержащихся в условиях лабораторного вивария при 12-часовом световом режиме со свободным доступом к воде и стандартному корму. Для исключения влияния суточных биоритмов на скорость биосинтеза и метаболизма нейромедиаторов эксперименты проводили между 10.00 и 12.00 часами дня. Эксперименты проводили в соответствии с этическими правилами гуманного обращения с животными, утвержденными этической комиссией ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова”.

Животным опытных групп внутривенно вводили ЛК-998 в дозах 5, 10 и 20 мг/кг и препарат срав-



Антикомпульсивный эффект ЛК-998 в сравнении с афобазолом в тесте закапывания шариков.

Приведены средние значения количества зарытых шариков по каждой группе в процентах по отношению к общему числу шариков.

\* Достоверность различий по сравнению с контролем при  $p < 0,05$  (сравнение 2 выборочных долей вариант, критерий Фишера).

нения афобазол в дозе 5 мг/кг [3]. Мышам контрольной группы вводили внутривенно физиологический раствор из расчета 0,4 мл/20 г массы тела. Регистрацию эффектов осуществляли через 60 мин после введения препаратов.

**Методика приподнятого крестообразного лабиринта.** Для оценки анксиолитического действия применяли стандартную методику приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ), основанную на возникновении у животного стресса и страха при реализации ориентировочно-исследовательского поведения и норкового рефлекса в сложных условиях (новизна обстановки, страх высоты и освещенность) [2, 11].

Крестообразный лабиринт расположен на высоте 30 см от пола и состоит из 2 открытых (не имеющих стенок) ( $5 \times 5 \times 20$  см) рукавов (ОР) и 2 закрытых (имеющих стенки) рукавов (ЗР), расположенных под углом  $90^\circ$ , а также центральной площадки размерами  $5 \times 5$  см. Мышь помещали на центральную площадку ПКЛ головой к открытому рукаву. В течение 5 мин регистрировали время пребывания в ОР, ЗР, число заходов (пересечение границы рукава четырьмя лапами) в ОР и ЗР. Заход в рукава ПКЛ засчитывали в том слу-

чае, когда животное пересекало границу рукава четырьмя лапами. Чем активнее мыши выходят в ОР лабиринта, тем меньше степень их тревожности. Каждая доза вещества была изучена на 10 животных. Статистическую обработку полученных результатов и достоверность различий определяли с помощью критерия Стьюдента. Вычисляли средние величины количества заходов и времени пребывания в отсеках для каждой группы и стандартные отклонения.

**Методика закапывания шариков (marble burying test)** используется для анализа антикомпульсивного действия веществ и основана на инстинкте грызунов избавляться от инородных предметов в убежище посредством их закапывания в подстилку, что является аналогом проявления обсессивно-компульсивного синдрома у человека [4]. Каждая доза вещества была изучена на 9 животных.

В тесте использовали 6 клеток размерами  $17 \times 28$  см и высотой 12 см. Перед посадкой мыши в клетку на слой плотно утрамбованных опилок толщиной 5 см выкладывали 9 пластиковых шариков диаметром 1,5 см. Животное помещали в один из углов и клетку накрывали решеткой. Через 30 мин подсчитывали количество закопанных шариков. Шарик считался закопанным при погружении на  $2/3$  своего объема в опилки. При статистической обработке данных вычисляли среднее количество закопанных шариков для каждой группы, их процентное отношение к общему числу шариков и стандартные отклонения. Достоверность различий между группами определяли с помощью точного критерия Фишера.

**Методика открытого поля.** Изучение влияния веществ на локомоторную активность мышей проводили в стандартном открытом поле, представляющем собой круглую коробку из белого непрозрачного пластика диаметром 45 см с высотой стенок 28 см и полом, расчерченным на сектора  $8 \times 8$  см с отверстиями диаметром 1,5 см в их пересечениях. Животное помещали в центр установки и в течение 3 мин проводили оценку горизонтальной двигательной (количество пересеченных секторов) и вертикальной активности [2]. Кроме

Таблица 1. Анксиолитическая активность ЛК-998 в сравнении с афобазолом в приподнятом крестообразном лабиринте

Группа/препарат	Доза, мг/кг	Число переходов		Время в открытых рукавах, с	Латентный период 1 захода в открытый рукав, с
		в темные рукава	в открытые рукава		
Контроль 1		$4,5 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,3$	$4,3 \pm 1,1$	$189,1 \pm 27,7$
ЛК-998	10	$9,8 \pm 1,1^*$	$5,5 \pm 1,1^*$	$42,4 \pm 12,7^*$	$46,1 \pm 19,0^*$
ЛК-998	20	$7,6 \pm 1,0^*$	$3,9 \pm 1,0^*$	$31,3 \pm 14,7^*$	$46,4 \pm 9,0^*$
Афобазол	5	$7,1 \pm 1,1^*$	$3,6 \pm 0,9^*$	$20,8 \pm 7,3^*$	$77,5 \pm 23,8^*$
Контроль 2		$6,0 \pm 0,6$	$0,2 \pm 0,1$	$1,6 \pm 1,0$	$242,2 \pm 35,8$
ЛК-998	5	$6,8 \pm 0,7$	$0,4 \pm 0,2$	$4,1 \pm 2,0$	$218,1 \pm 39,1$
Контроль 3		$5,5 \pm 0,8$	$0,6 \pm 0,3$	$4,1 \pm 2,0$	$275,3 \pm 20,5$
ЛК-998	40	$6,8 \pm 0,6$	$0,5 \pm 0,5$	$3,8 \pm 3,6$	$277,8 \pm 21,1$

Приведены средние значения и стандартные отклонения ( $M \pm m$ ).

\* Достоверность различий, по сравнению с контролем 1 при  $p < 0,05$  ( $t$ -критерий Стьюдента).

того, подсчитывали число заглядываний мышей в отверстия и количество болюсов. Статистическую обработку полученных результатов и достоверность различий определяли с помощью критерия Стьюдента.

**Тест вынужденной беспомощности** [12]. В первый день мышь помещали на 6 мин в цилиндр (диаметром 10 см и высотой 30 см), наполненный на 20 см водой с температурой 22 °С. На следующий день вводили ЛК-998 и через 60 мин повторно помещали мышь в те же условия, что и накануне, и на протяжении 6 мин регистрировали время сохранения животным характерной позы иммобильности (вынужденной беспомощности). Статистическую обработку полученных результатов и достоверность различий определяли с помощью критерия Стьюдента.

Острую токсичность соединения ЛК-998 при внутривенном введении в дозе 200 мг/кг оценивали в опытах на беспородных мышах-самцах массой 20 – 25 г. [1]. Оценка общего состояния, поведения и гибели животных проводилась через 1 ч, 24 ч, 4 сут, 10 сут и 14 сут после введения соединений. Степень нарушения координации движений оценивали по способности животных удерживаться на вращающемся стержне Rota Rod (диаметр 2,5 см, скорость вращения 10 оборотов в минуту) (Ugo Basile, Италия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что соединение ЛК-998 в дозах 10 и 20 мг/кг обладало выраженной анксиолитической активностью, что выражалось в значительном возрастании длительности пребывания животных в открытых рукавах ПКЛ и увеличении числа заходов в них (табл. 1). По эффективности соединение ЛК-998 в дозе 10 мг/кг превосходило эффект афобазола в дозе 5 мг/кг.

В тесте закапывания шариков установлено, что животные контрольной группы закапывают 61 % от общего количества шариков (рисунок). Мыши, которым вводили афобазол, закапывают 38 % от общего количества шариков, а грызуны, получавшие соединение ЛК-998 – 32 %. Таким образом, у данного соединения в дозе 10 мг/кг наблюдается анксиолитический (антикомпульсивный) эффект, сопоставимый с эффектом афобазола в дозе 5 мг/кг.

При исследовании влияния веществ на локомоторную активность мышей в открытом поле достоверных отличий показателей группы животных, которым вводили ЛК-998 (10 и 20 мг/кг внутривенно), от аналогичных параметров мышей контрольной группы не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии у изучаемого соединения как психостимулирующих, так и седативных свойств (табл. 2). В тесте поведенческого отчаяния по Порсолту соединение ЛК-998 в тех же дозах не изменяло длительности иммобилизации по сравнению с контролем, что является показателем отсутствия антидепрессантных свойств.

При изучении возможных побочных эффектов ЛК-998 в дозе 200 мг/кг (т.е. в 20 раз превышающей терапевтическую (10 мг/кг)) было показано, что данное вещество не вызывает развития побочных эффектов и признаков неврологического дефицита как через 24 ч, так и в более отдаленные сроки (4, 10 и 14 сут) после введения соединения. ЛК-998 в дозе 200 мг/кг не нарушает координацию движений животных (100 % мышей удерживаются на вращающемся стержне в течение 5 мин).

Таким образом, 3,4,5-триметокси-N'-(2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-илиден)бензогидразида гидрохлорид (ЛК-998) обладает выраженной анксиолитической активностью, не вызывая при этом неврологического дефицита.

Показано, что для ряда производных пиперидина (N-фенил-2-[1-[3-(2-пиридинилэтинил)бензоил]-4-пиперидин] ацетамид [8], 1-(1-фенилциклогексил) пиперидин, фенциклидин [14]) характерны анксиолитические свойства и установлено, что они обладают агонистическим сродством к рецепторам НТ<sub>1а</sub> подтипа, проявляя, в то же время, антагонизм к НТ<sub>2а</sub> рецепторам серотонина [14]. Подобная тропность характерна для соединений, обладающих противотревожной активностью, в частности, для широко используемого в клинической практике буспирона, который является агонистом 5-НТ<sub>1а</sub> рецепторов [5]. Можно предположить, что в механизме анксиолитического действия соединения ЛК-998, которое имеет структурное сходство с упомянутыми выше производными пиперидина, также принимает участие серотонинергическая система мозга.

Таблица 2. Эффекты ЛК-998 в тестах вынужденной беспомощности по Порсолту и открытого поля

Группа	Вынужденная беспомощность		Открытое поле		
	длительность иммобилизации, с	горизонтальная активность*	вертикальная активность <sup>#</sup>	количество заглядываний	количество болюсов
Контроль	244 ± 34	42,4 ± 9,4	1,0 ± 0,7	10,9 ± 1,7	0,6 ± 0,4
ЛК-998 10 мг/кг	258 ± 70	64,5 ± 10,8	2,6 ± 1,0	14,3 ± 2,1	0,4 ± 0,2
ЛК-998 20 мг/кг	235 ± 44	44,3 ± 7,4	1,6 ± 0,8	15,0 ± 1,7	0,4 ± 0,2

Приведены средние значения и стандартные отклонения ( $M \pm m$ ).

\* Количество пересеченных квадратов.

<sup>#</sup> Число вертикальных стоек.

На основании полученных нами новых данных о фармакологических свойствах соединения 3,4,5-триметокси-N'-(2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-илиден)-бензогидразид гидрохлорида оформлена патентная заявка № 2016111950 от 30.03.2016.

## ВЫВОДЫ

1. Соединение 3,4,5-триметокси-N'-(2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-илиден)бензогидразида гидрохлорид (ЛК-998) в дозах 10 и 20 мг/кг обладает выраженной анксиолитической активностью, значительно увеличивая число заходов мышей в открытые рукава ПКЛ и длительность пребывания в них. По эффективности соединения ЛК-998 в дозе 10 мг/кг превосходит афобазол в дозе 5 мг/кг.

2. В тесте закапывания шариков показано, что соединение ЛК-998 в дозе 10 мг/кг оказывает антикомпульсивный эффект, сопоставимый с эффектом афобазола в дозе 5 мг/кг.

3. Соединение ЛК-998 в дозе 200 мг/кг (т.е. в 20 раз превышающей терапевтическую — 10 мг/кг) не вызывает развития побочных эффектов и признаков неврологического дефицита как через 24 ч, так и в более отдалённые сроки (4, 10 и 14 сут) после введения.

4. Соединение ЛК-998 в дозах 10 и 20 мг/кг в тесте вынужденной беспомощности по Порсолту не оказывает антидепрессивного эффекта.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Е. В. Арзамасцев, И. В. Березовская, Т. А. Гуськова и др., *Руководство по проведению доклинических исследований*

- лекарственных средств*, Часть первая, Москва (2012), сс. 13 – 25.
- Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, М. А. Яркова, М. В. Воронин, *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Часть первая, Москва (2012), сс. 264 – 275.
  - С. Б. Середенин, М. В. Воронин, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **72**(1), 3 – 10 (2009).
  - С. L. Broekkamp, H. W. Rijk, D. Joly-Gelouin, *Eur. J. Pharmacol.*, **126**(3), pp. 223 – 229 (1986).
  - Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, K. L. Davis, D. Charney, J. T. Coyle and C. Nemeroff (eds.), Lippincott Williams & Wilkins, (2002), pp. 857 – 858.
  - R. Hajikhani, A. Ahmadi, N. Naderi, *Adv. Clin. Exp. Med.*, **21**(3), 307 – 312 (2012).
  - J. Kent, S. Mathew, J. Gorman, *Biol. Psychiat.*, **52**, 1008 – 1030 (2002).
  - C. P. Kordik, C. Luo, M. Gutherman, *Bioorg. Med. Chem. Let.*, **16**(11), 3065 – 3072 (2006).
  - D. J. Nutt, *CNS Spectr.*, **10**, 49 – 56 (2005).
  - J. D. Olivier, C. H. Vinkers, B. Olivier, *Front. Pharmacol.*, **4**, 74 (2013); doi: 10.3389/fphar.2013.00074.
  - S. Pellow, P. Chopin, S. E. File, M. Briley, et al., *J. Neurosci. Meth.*, **14**(3), 149 – 167 (1985).
  - R. D. Porsolt, G. Anton, N. Blavet, *Eur. J. Pharmacol.*, **47**, 379 – 391 (1978).
  - A. Trabanco, N. Aerts, R. Alvarez, J. Andres, et al., *Bioorg. Med. Chem. Let.*, **17**(14), 3860 – 3863 (2007).
  - P. Zajdel, K. Marcinec, A. Maslankiewicz, G. Satela, et al., *Biorg. Med. Chem.*, **20**(4), 1545 – 1556 (2012); doi: 10.1016/j.bmc.2011.12.039.

Поступила 05.04.16

## STUDYING ANXIOLYTIC AND ANTIDEPRESSANT PROPERTIES OF 2,2,6,6-TETRAMETHYLPIPERIDONE DERIVATIVE

P. L. Naplekova, V. B. Narkevich, T. A. Voronina, N. V. Kudryashov, L. M. Kostochka, and V. S. Kudrin

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

Neuropharmacological properties of LK-998 (3,4,5-trimethoxy-N'-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yliden)benzohydrazide), a 2,2,6,6-tetramethylpiperidone derivative have been studied. LK-998 exhibited anxiolytic activity in doses of 10 and 20 mg/kg, significantly increasing the duration of animal staying of in open arms of the elevated plus maze as well as the number of arm entries. The efficiency of drug tested in a dose of 10 mg/kg was comparable with that of afobazole in a dose of 5 mg/kg. In marble burying test, it was also found that animals treated with LK-998 at 10 mg/kg buried a close number of balls to that as rodents treated with afobazole at 5 mg/kg. At the same time, LK-998 in doses 10 and 20 mg/kg did not produce any antidepressant action in the learned helplessness test. Thus, LK-998 in a dose of 10 mg/kg has anxiolytic and anticomulsive effects comparable to those of afobazole at a dose of 5 mg/kg. The study of potential side effects of LK-998 in a dose of 200 mg/kg (i.e., 20 times the therapeutic dose of 10 mg/kg) showed that the drug tested caused neither side effects nor symptoms of neurological deficiency within 24 hours and on longer terms (4, 10 and 14 days after administration).

**Keywords:** 2,2,6,6-tetramethylpiperidone; anxiolytic activity; elevated plus maze test; marble burying test; open field test; learned helplessness test.