

РОЛЬ МЕТАБОЛИЗМА НЕЙРОСТЕРОИДОВ В АНТИКОМПУЛЬСИВНОМ ЭФФЕКТЕ ПРОИЗВОДНОГО ПИРАЗОЛО[с]ПИРИДИНА – ГИЖ-72

Н. В. Кудряшов^{1, 2}, Т. С. Калинина¹, К. А. Касабов¹, А. А. Шимширт¹,
А. В. Волкова¹, Л. А. Жмуренко¹, В. С. Кудрин¹, Т. А. Воронина¹

В условиях экспериментальной модели обсессивно-компульсивного расстройства – тесте “закапывание шариков” (marble burying test) – изучено влияние селективного блокатора митохондриального транслокационного белка 18 кДа (TSPO 18 кДа) РК11195 (N-бутан-2-ил-1-(2-хлорофенил)-N-метилизохинолин-3-карбоксамид; 1 и 3 мг/кг внутрибрюшинно) и ингибитора 5 α -редуктазы финастерид (1,25; 2,5; 5 мг/кг внутрибрюшинно) на антикомпульсивный эффект нового производного пиразоло[с]пиридина – ГИЖ-72 (4,6-диметил-2-(4-хлорфенил)-2,3-дигидро-1H-пиразоло[4,3-с]-пиридин-3-он хлоралгидрат; 20 мг/кг внутрибрюшинно) у мышей линии C57BL/6. Установлено, что РК11195 (1 и 3 мг/кг) не оказывал влияния на компульсивное поведение мышей и антикомпульсивный эффект ГИЖ-72 (20 мг/кг). В то же время финастерид (2,5 и 5 мг/кг) вызывал дозозависимое ингибирование компульсивного поведения и устранял антикомпульсивный эффект ГИЖ-72 (20 мг/кг). Таким образом, антикомпульсивная активность ГИЖ-72 в тесте “закапывание шариков” может зависеть от активности 5 α -редуктазы, но не TSPO 18 кДа.

Ключевые слова: обсессивно-компульсивное расстройство; ГИЖ-72; финастерид; РК11195; нейростероиды; мыши C57BL/6.

ВВЕДЕНИЕ

Синтезированное в ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” оригинальное гетероциклическое соединение ГИЖ-72 (4,6-диметил-2-(4-хлорфенил)-2,3-дигидро-1H-пиразоло[4,3-с]пиридин-3-он хлоралгидрат) относится к принципиально новому классу производных пиразоло[с]пиридина, обладает антидепрессивным и анксиолитическим эффектами, а также низкой токсичностью [1]. Анксиолитическая активность ГИЖ-72 изучена на крысах и мышах линий BALB/c и C57BL/6 после однократного и хронического введения в тестах “приподнятый крестообразный лабиринт”, “конфликтная ситуация”, “открытое поле”, “закапывание шариков” [1]. Продолжительность анксиолитического эффекта ГИЖ-72 составляет 24 ч, что выделяет его в ряду других фармакологических агентов, обладающих анксиолитической активностью. К противотревожному действию ГИЖ-72 не развивается привыкание, для соединения не характерен синдром отмены, в отличие от анксиолитиков бензодиазепинового ряда [2]. На оперантной модели лекарственной дифференцировки показано отсутствие у ГИЖ-72 свойств позитивного модулятора ГАМК_A-рецептора [1]. В тесте “закапывание шариков”, который рассматривается в качестве трансляционной модели обсессивно-компульсивного расстройства (ОКР) [12], показано, что ГИЖ-72 подавляет компульсивное поведение мы-

шей [3]. Данный эффект не только сохраняется, но и усиливается после субхронического и хронического введения на модели непредсказуемого хронического умеренного стресса, в отличие от флувоксамина, для которого характерна инверсия антикомпульсивного эффекта в аналогичных условиях [3]. В то же время молекулярные механизмы психотропных свойств ГИЖ-72 остаются неизвестными.

Данные литературы о механизмах фармакологической активности близких по химической структуре соединений указывают на то, что к ряду возможных мишеней ГИЖ-72 могут относиться основные ферменты метаболизма прогестерона (рис. 1). Так, среди лигандов TSPO 18 кДа известны вещества, близкие по структуре к ГИЖ-72, например, алпидем — производное имидазопиридина [13], DPA-713 и DPA-714 — производные пиразолопиримидина [22]. Экспериментально установлено, что нейроактивные стероиды имеют модуляторные сайты на ГАМК_A- и NMDA-глутаматных рецепторах [8], что, в свою очередь, может оказывать регуляторное влияние на серотониновую [23] и дофаминовую системы ЦНС [11], вовлеченные в патогенез ОКР [17]. Клинические исследования также свидетельствуют о дисрегуляции в системе нейроактивных стероидов у больных ОКР, у которых выявлены повышенные уровни дигидроэпиандростерона и его сульфатного метаболита [4]. Наконец, в экспериментальных исследованиях установлено, что нейроактивные стероиды могут влиять на компульсивное поведение грызунов. В частности, экзогенное введение эндогенного положительного модулятора нейростероидного сайта ГАМК_A-рецептора аллопрегнанолон, 3 α ,5 α -восстановленного метаболита прогестерона,

¹ ФГБНУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова, Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8; e-mail: kunvi@mail.ru

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

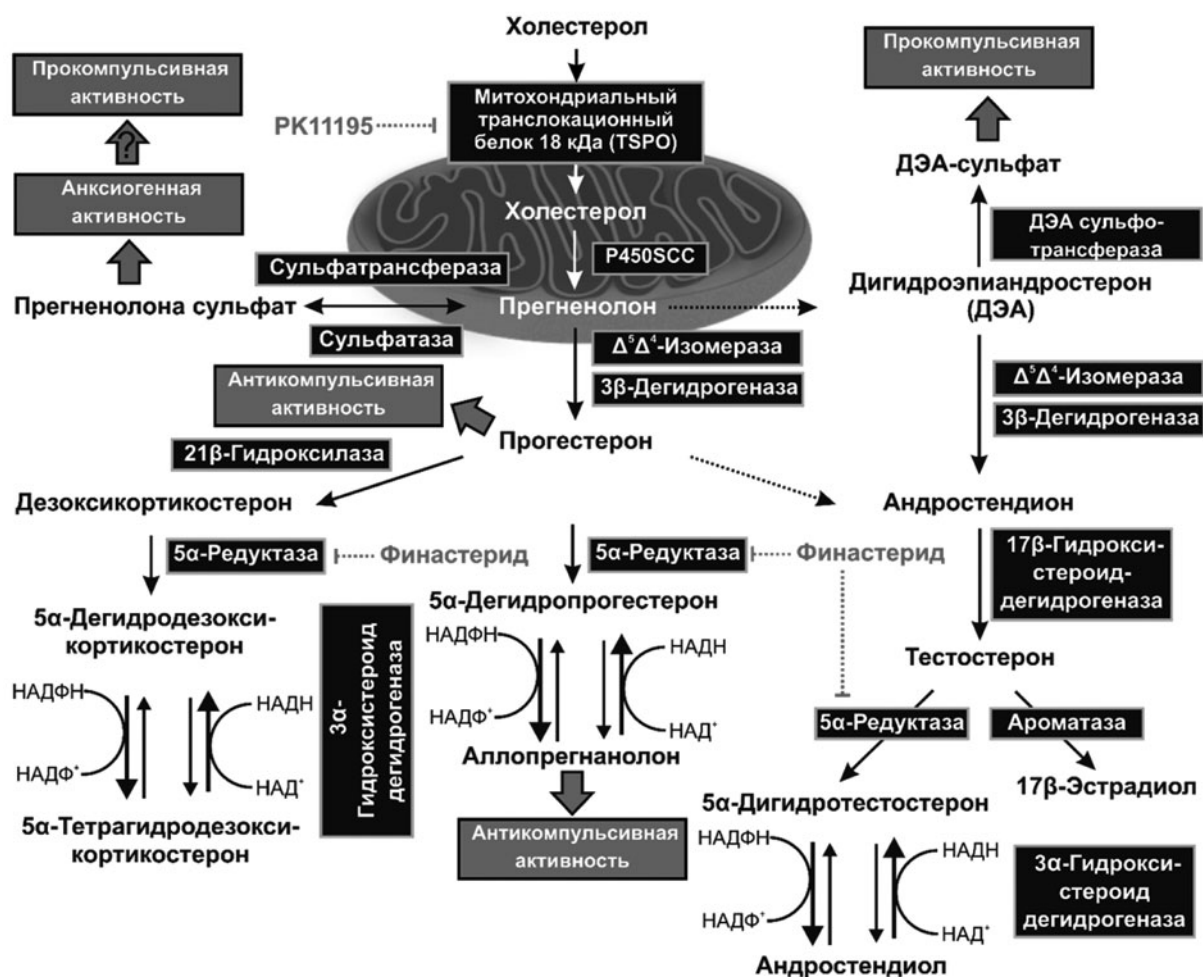


Рис. 1. Схема биосинтеза нейроактивных стероидов в ЦНС и их влияние на компульсивное поведение мышей ([9] модификация).

или самого прогестерона приводит к ослаблению компульсивного поведения мышей, в то время как предполагаемый позитивный аллостерический модулятор NMDA-рецепторов дегидроэпиандростерон-3-сульфат [18], напротив, усиливает его [24]. Таким образом, система эндогенных нейростероидов является возможной мишенью для фармакологической коррекции ОКР.

Целью настоящего исследования явилась оценка роли функциональной активности TSPO 18 кДа и 5α-редуктазы в антикомпульсивной активности ГИЖ-72 у мышей инбредной линии C57BL/6.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на 140 самцах мышей инбредной линии C57BL/6 массой 20 – 25 г (Питомник “Столбовая” ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественной суточной смене освещенности день/ночь, свободном доступе к воде и корму. Содержание животных соответствовало правилам надлежащей лабораторной практики, утвержденной приказом № 199н от 01.04.2016 г. Минздрава РФ. При проведении экспери-

ментов были приняты меры, исключающие излишние физические страдания или повреждения животных.

В настоящей работе использованы: 4,6-диметил-2-(4-хлорфенил)-2,3-дигидро-1*H*-пиразоло[4,3-*c*]пиридин-3-она хлоралгидрат (ГИЖ-72, 20 мг/кг) (ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова”), финастерид (1,25; 2,5; 5 мг/кг; Sigma Aldrich), PK11195 (1 и 3 мг/кг; Sigma Aldrich). В качестве контроля использовали эквивалентный объем (0,1 мл на 10 г массы тела животного) 0,9 % раствора натрия хлорида с добавлением Tween-80 (Sigma Aldrich). Все вещества вводили внутривентриально в виде эмульсии с Tween-80 (Sigma Aldrich).

Схема эксперимента. Животные контрольных групп получали 2 инъекции “пустой” эмульсии с Tween-80 (с интервалом 30 мин), вторую инъекцию осуществляли за 30 мин до теста “закапывание шариков”. При изучении эффектов блокаторов нейростероидогенеза, PK11195 и финастерид, также были использованы 2 последовательные инъекции: 1) PK11195 и финастерид вводили за 60 мин до поведенческих процедур; 2) “пустую” эмульсию Tween-80 вводили за 30 мин до теста “закапывание шариков”. Для оценки

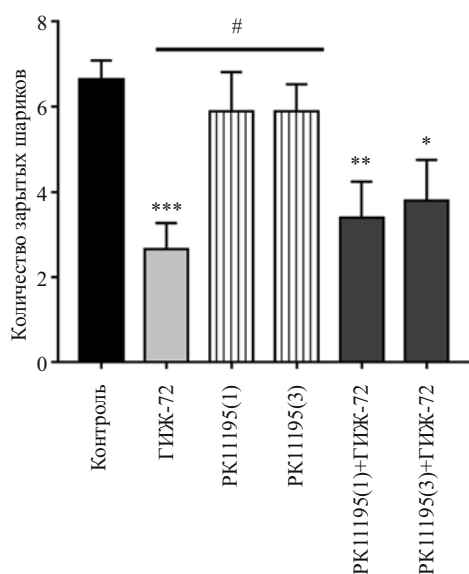


Рис. 2. Влияние РК11195 (1 и 3 мг/кг) на активность ГИЖ-72 (20 мг/кг) в тесте “закапывание шариков” у мышей C57BL/6.

Данные представлены как $M \pm S.E.M.$; РК11195(1) — доза 1 мг/кг; РК11195(3) — доза 3 мг/кг; *, **, *** — отличия от контроля при $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, соответственно; # — отличия от ГИЖ-72 при $p < 0,05$ (однофакторный ANOVA с последующим post-hoc тестом Ньюмана — Кейлса).

антикомпульсивного эффекта ГИЖ-72 “пустую” эмульсию вводили за 30 мин до введения ГИЖ-72 и за 60 мин до теста “закапывание шариков”. Блокаторы нейростероидогенеза (РК11195 и финастерид) [9, 10] вводили за 30 мин до введения ГИЖ-72.

Выбор дозы ГИЖ-72 (20 мг/кг) основан на предшествующих исследованиях, где был показан стойкий антикомпульсивный эффект соединения [1, 3]. Дозирование РК11195 (1 и 3 мг/кг) проведено в соответствии с данными об антагонизме РК11195 и лигандов TSPO кДа [10, 20, 25]. Ввиду отсутствия данных о влиянии финастерида на компульсивное поведение дозовый диапазон (1,25; 2,5; 5 мг/кг) выбран в соответствии с собственными пилотными исследованиями.

Тест “закапывание шариков”. В качестве экспериментальной установки были использованы индивидуальные поликарбонатные боксы для грызунов (31,5 × 23 × 15,7 см), которые на 5 см заполняли плотно утрамбованными опилками. В экспериментальной комнате поддерживали минимальный уровень шума и освещение в 100 лк. Предварительно животных помещали в индивидуальные боксы с подстилкой на 30 мин с целью ознакомления. После предварительной посадки опилки вновь утрамбовывали и помещали на них 9 стеклянных шариков диаметром 1,5 см. Мышей помещали в индивидуальные боксы с шариками на 30 мин, по истечении этого времени подсчитывали количество зарытых шариков (зарытыми считались шарик, погруженный в подстилку на 2/3) [3].

Обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prizm 7.0

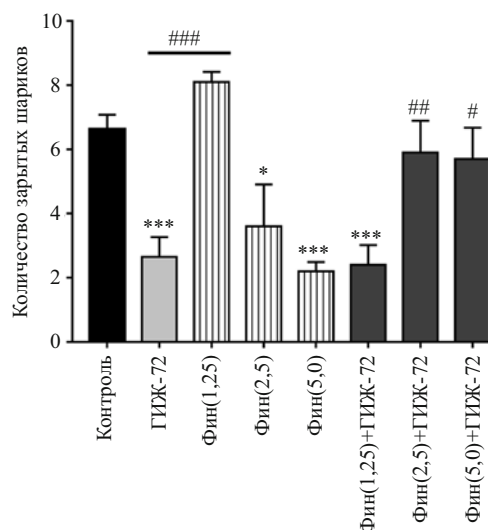


Рис. 3. Влияние предварительного введения финастерида (1,25; 2,5; 5 мг/кг) на антикомпульсивную активность ГИЖ-72 (20 мг/кг) у мышей C57BL/6.

Данные представлены как $M \pm S.E.M.$; Фин(1,25) — финастерид в дозе 1,25 мг/кг; Фин(2,5) — финастерид в дозе 2,5 мг/кг; Фин(5,0) — финастерид в дозе 5,0 мг/кг; *, **, *** — отличия от контроля при $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, соответственно; ##, ### — отличия от ГИЖ-72 при $p < 0,01$, $p < 0,001$, соответственно (однофакторный ANOVA с последующим post-hoc тестом Ньюмана — Кейлса).

(GraphPad Software, Inc. USA). Проверку результатов на нормальность распределения осуществляли по критерию Шапиро — Уилка, после чего данные были представлены в виде средних значений по группе с указанием стандартной ошибки среднего. Отличия между группами определяли по методу однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим post-hoc тестом Ньюмана — Кейлса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка влияния РК11195 на антикомпульсивный эффект ГИЖ-72. Контрольная группа животных закапывала в среднем ($7,0 \pm 0,4$) шариков, что соответствует обычному уровню компульсивного поведения мышей линии C57BL/6 (рис. 2) [1]. Однофакторный дисперсионный анализ продемонстрировал достоверные отличия между экспериментальными группами животных ($F_{5, 79} = 7,066$, $p < 0,001$), последующий post-hoc тест выявил, что ГИЖ-72 (20 мг/кг) уменьшал количество закопанных шариков в 2 раза, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$), что соответствует ранее полученным данным о наличии антикомпульсивного эффекта у изучаемого соединения [3, 1]. Селективный блокатор TSPO 18 кДа РК11195 в дозах 1 и 3 мг/кг не оказывал влияния на компульсивное поведение мышей, а также не устранял антикомпульсивный эффект ГИЖ-72.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что антикомпульсивный эффект ГИЖ-72 в тесте “закапывания шариков” не зависит от функциональной актив-

ности TSPO 18 кДа. В то же время сам РК11195 не оказывал влияния на компульсивное поведение мышей, и эти результаты согласуются с данными об отсутствии поведенческих эффектов РК11195 в диапазоне доз от 0,01 до 10 мг/кг у интактных грызунов [10, 21, 25]. Клинико-экспериментальные данные свидетельствуют об относительно постоянном уровне TSPO 18 кДа в нейронах и глиальных клетках в норме [7, 19]. Флуктуации экспрессии этого белка обычно наблюдаются после острого стресса [4]. В условиях патологии, как правило, фиксируют стойкое увеличение экспрессии TSPO 18 кДа, что обуславливает использование этого белка в качестве маркера ряда патологических процессов, например, нейровоспаления [15]. В случае направленного повышения экспрессии TSPO 18 кДа, поведенческие эффекты, спровоцированные этими изменениями, полностью устраняются после внутрибрюшинного введения РК11195 в дозе 3 мг/кг [14]. Учитывая изложенное выше, следует ожидать, что применение селективного антагониста TSPO 18 кДа не должно приводить к изменению видоспецифического стереотипного поведения животных, примером которого является поведенческая реакция мышей в тесте “закапывания шариков”, что совпадает с полученными данными.

Оценка влияния финастерида на антикомпульсивный эффект ГИЖ-72. Однофакторный дисперсионный анализ выявил достоверные отличия между экспериментальными группами животных ($F_{7,99} = 9,513, p < 0,0001$) (рис. 3), последующий *post-hoc* тест показал двукратное подавление компульсивного поведения мышей после введения им ГИЖ-72 (20 мг/кг) ($p < 0,001$), а также дозозависимый антикомпульсивный эффект самого финастерида. Так, финастерид в дозе 2,5 мг/кг уменьшал количество закопанных шариков практически в 2 раза ($p < 0,05$), а в дозе 5 мг/кг — в 3 раза ($p < 0,001$). В то же время в дозе 1,25 мг/кг финастерид не обнаруживал антикомпульсивного эффекта. Предварительное введение финастерида в дозах 2,5 и 5 мг/кг приводило к подавлению антикомпульсивного эффекта ГИЖ-72 (20 мг/кг) ($p < 0,01$), что свидетельствует о взаимодействии между финастеридом и ГИЖ-72.

Выявленное дозозависимое взаимодействие ГИЖ-72 и финастерида может быть объяснено с позиции однонаправленного влияния изучаемых веществ на метаболизм нейроактивных стероидов в ЦНС (рис. 1). В частности, антикомпульсивная активность самого финастерида, по-видимому, связана с ингибированием 5 α -редуктазы и опосредована накоплением прогестерона, обладающего дозозависимым антикомпульсивным эффектом у мышей [24]. Последующее введение ГИЖ-72, также обладающего подобной активностью, приводит к взаимному подавлению антикомпульсивного эффекта, что может указывать на способность ГИЖ-72 стимулировать биосинтез нейроактивных стероидов на ранних стадиях и, в конечном

счете, приводить к повышению уровней 3 α -восстановленных форм, обладающих антикомпульсивной активностью [24]. Однако в условиях ингибирования 5 α -редуктазы финастеридом и последующего накопления прогестерона, по-видимому, избыточные количества прегненолона подвергаются метаболизму по пути образования сульфатного производного, обладающего анксиогенными свойствами [16], а также дегидроэпиандростерон-3-сульфата, для которого характерна прокомпульсивная активность в эксперименте [24].

Следует отметить, что наличие у финастерида антипсихотической активности — угнетение “стартл-реакции” и ее препульсового ингибирования у крыс [5] — также может вносить определённый вклад в антикомпульсивный эффект препарата, поскольку для типичных и атипичных антипсихотических средств, применяемых в составе комбинированной лекарственной терапии ОКР, характерен дозозависимый антикомпульсивный эффект в тесте “закапывание шариков” [6].

Выявленное дозозависимое взаимодействие между финастеридом и ГИЖ-72 указывает на необходимость дальнейшего изучения роли системы эндогенных нейроактивных стероидов в реализации психотропных эффектов оригинального гетероциклического соединения ГИЖ-72, в частности изучение влияния ГИЖ-72 на: 1) активность 5 α -редуктазы; 2) уровни 3 α -восстановленных нейростероидов; 3) уровни прегненолона и дигидроэпиандростерона, а также их сульфатных производных.

ВЫВОДЫ

1. Селективный блокатор TSPO 18 кДа РК11195 (1 и 3 мг/кг, однократное внутрибрюшинное введение) не влияет на компульсивное поведение мышей линии C57BL/6 в тесте “закапывание шариков”.
2. Предварительное введение РК11195 (1 и 3 мг/кг) не влияет на антикомпульсивную активность ГИЖ-72 (20 мг/кг, однократное внутрибрюшинное введение) в тесте “закапывание шариков” у мышей линии C57BL/6.
3. Ингибитор 5 α -редуктазы финастерид (2,5 и 5 мг/кг, однократное внутрибрюшинное введение) обладает дозозависимым антикомпульсивным эффектом в тесте “закапывание шариков” у мышей линии C57BL/6 (уменьшение количества зарытых шариков в 2 и 3 раза, соответственно; $p < 0,05$ и $p < 0,001$).
4. Предварительное введение финастерида (2,5 и 5 мг/кг) приводит к подавлению антикомпульсивного эффекта ГИЖ-72 (20 мг/кг) в тесте “закапывание шариков” у мышей линии C57BL/6.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. В. Кудряшов, Т. С. Калинина, А. А. Шимширт и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **78**(11), 3 – 7 (2015).
2. Н. В. Кудряшов, *Автореф. дис. кандидата биол. наук*, Москва (2016).

3. Н. В. Кудряшов, Т. С. Калинина, Л. А. Жмуренко, Т. А. Воронина, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **161**(3), 355 – 358 (2016).
4. K. L. Bigos, M. M. Folan, M. R. Jones, et al., *J. Psychiatr. Res.*, **43**(4), 442 – 445 (2009).
5. M. Bortolato, R. Frau, M. Orru, et al., *Neuropsychopharmacology*, **33**(13), 3146 – 3156 (2008).
6. L. A. Bruins Slot, L. Bardin, A. L. Auclair, et al., *Behav. Pharmacol.*, **19**(2), 145 – 152 (2008).
7. M. K. Chen, T. R. Guilarte, *Pharmacol. Ther.*, **118**(1), 1 – 17 (2008).
8. N. A. Compagnone, S. H. Mellon, *Front Neuroendocrinol.*, **21**(1), 1 – 56 (2000).
9. D. A. Finn, A. S. Beadles-Bohling, E. H. Beckley, et al., *CNS Drug Rev.*, **12**(1), 53 – 76 (2006).
10. E. C. Gavioli, F. S. Duarte, E. Bressan, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **471**(1), 21 – 26 (2003).
11. L. Jaworska-Feil, B. Budziszewska, M. Leskiewicz, W. Lason, *Pol. J Pharmacol.*, **50**(6), 449 – 452 (1998).
12. D. Joel, D. J. Stein, R. Schreiber, *Animal and Translational Models for CNS Drug Discovery*, F. Borsini (ed.), Academic Press, San Diego (2008), pp. 133 – 164.
13. T. Kim, A. N. Pae, *Expert Opin. Ther. Pat.*, **26**(11), 1325 – 1351 (2016).
14. L. Li, W. Wang, L. M. Zhang, et al., *Neuropharmacology*, **125**, 117 – 128 (2017).
15. G. J. Liu, R. J. Middleton, C. R. Hatty, et al., *Brain Pathol.*, **24**(6), 631 – 653 (2014).
16. C. L. Melchior, R. F. Ritzmann, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **48**(4), 893 – 897 (1994).
17. D. L. Pauls, *Dialogues Clin. Neurosci.*, **12**(2), 149 – 163 (2010).
18. R. A. Prough, B. J. Clark, C. M. Klinge, *J. Mol. Endocrinol.*, **56**(3), R139 – 155 (2016).
19. R. H. Purdy, A. L. Morrow, P. H. Moore, Jr., S. M. Paul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**(10), 4553 – 4557 (1991).
20. Z. K. Qiu, J. L. He, X. Liu, et al., *Sci. Rep.*, **6**, 37345 (2016).
21. L. Rago, V. Saano, T. Auvinen, et al., *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **346**(4), 432 – 436 (1992).
22. A. Reynolds, R. Hanani, D. Hibbs, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**(19), 5799 – 5802 (2010).
23. M. Robichaud, G. Debonnel, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **9**(2), 191 – 200 (2006).
24. S. N. Umathe, J. M. Vaghasiya, N. S. Jain, P. V. Dixit, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **33**(7), 1161 – 1166 (2009).
25. L. M. Zhang, Z. K. Qiu, N. Zhao, et al., *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **17**(10), 1659 – 1669 (2014).

Поступила 04.10.17

THE ROLE OF NEUROSTEROIDS METABOLISM IN ANTICOMPULSIVE EFFECT OF PYRAZOLE[c]PYRIDINE DERIVATIVE GIZH-72

N. V. Kudryashov^{1, 2}, T. S. Kalinina¹, K. A. Kasabov¹, A. A. Shimshirt¹,
A. V. Volkova¹, L. A. Zhmurenko¹, T. A. Voronina¹

¹ Federal State Budgetary Institution 'Research Zakusov Institute of Pharmacology', 8 Baltijskaya St., Moscow, Russian Federation, 125315

² Sechenov First Moscow State Medical University, 8 Trubetskaya St., Moscow, Russian Federation, 119991

There were studied the impact of selective antagonist of the mitochondrial translocator protein (TSPO 18 kDa) PK11195 (N-butan-2-yl-1-(2-chlorophenyl)-N-methylisoquinoline-3-carboxamide; 1 or 3 mg/kg, i.p.) and 5 α -reductase inhibitor finasteride (1.25; 2.5; 5 mg/kg, i.p.) on anticomulsive effect of pyrazole[c]pyridine derivative GIZH-72 (4,6-dimethyl-2-(4-chlorophenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-c]pyridin-3-one chloralhydrate, 20 mg/kg, i.p.) in marble burying test in C57BL/6 mice. It is established that PK11195 (1 or 3 mg/kg, i.p.) had no effects on both compulsive behavior of mice and anticomulsive effect of GIZH-72 (20 mg/kg, i.p.). Finasteride (2.5 or 5.0 mg/kg) decreased of compulsive behavior in the dose-dependent manner in C57BL/6 mice. Pretreatment with finasteride (2.5 or 5.0 mg/kg, i.p.) led to completely reduction of anticomulsive effect of GIZH-72 (20 mg/kg, i.p.). Thus, anticomulsive effect of GIZH-72 may depend on activity of 5 α -reductase, but not TSPO 18 kDa.

Keywords: obsessive compulsive disorder; GIZH-72; finasteride; PK11195; neurosteroids; C57BL/6 mice.