

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ОЦЕНКА ПРОКОГНИТИВНОГО ЭФФЕКТА ДИЛЕПТА И ЕГО ОСНОВНОГО МЕТАБОЛИТА, ГЗР-125, В ТЕСТЕ РАСПОЗНАВАНИЯ ОБЪЕКТОВ У КРЫС

П. И. Горелов, Р. У. Островская, Н. М. Сазонова¹

В опытах на крысах было изучено влияние дипептидного миметика нейротензина, потенциального антипсихотика *N*-капроил-*L*-пролил-*L*-тирозина метилового эфира (ГЗР-123, дилепт) и его основного метаболита *N*-капроил-*L*-пролил-*L*-тирозина (ГЗР-125) в тесте распознавания новых объектов (Novel object recognition, NOR). Тест был выбран из многих когнитивных тестов в связи с тем, что он позволяет выявить избирательное действие на внимание и эпизодическую память и представляет собой трансляционную модель когнитивных нарушений у больных шизофренией. В качестве препарата, нарушающего распознавание, был использован блокатор центральных *m*-холинорецепторов, скополамин, в дозе 0,2 мг/кг. Дилепт (2 мг/кг) восстанавливает нарушенные скополамином показатели когнитивных функций в тесте распознавания новых объектов. Основным метаболитом дилепта (ГЗР-125, 2 мг/кг) также восстанавливает нарушенные скополамином когнитивные функции. Выявленный холинопозитивный эффект метаболита может вносить вклад в прокогнитивное действие исходной молекулы, дилепта.

Ключевые слова: нейротензин; дилепт; метаболит дилепта; распознавание объектов

ВВЕДЕНИЕ

Все многообразие клинических проявлений шизофрении до недавнего времени характеризовали двумя группами симптомов – позитивными и негативными. В последние годы все большее внимание уделяется поиску путей воздействия на когнитивный дефицит, выраженность которого в значительной степени определяет прогноз заболевания и влияет на формирование другой психопатологической симптоматики [15]. Позитивные расстройства довольно хорошо контролируются типичными нейролептиками; что касается когнитивного дефицита, они его, напротив, усугубляют, в основном за счет характерного для этих препаратов холинонегативного эффекта. Атипичные нейролептики эффективны только в отношении некоторых видов когнитивной недостаточности [10]. При этом для них характерен широкий спектр побочных эффектов. До 25 – 30 % больных резистентны ко всем известным нейролептикам, что диктует необходимость поиска принципиально новых высокоэффективных нейролептиков, лишенных побочных эффектов. Имеются убедительные доказательства роли нейротензина (НТ) в качестве эндогенного нейролептика [9]. Тот факт, что сам НТ проявляет низкую энзиматическую устойчивость и нейротропную активность только при непосредственном введении в мозг, побудил к активному поиску его миметиков, обладающих большей биологической стабильностью и эффективных в условиях системного введения. Оригинальный подход к поиску новых высокоэффективных антипсихотиков, предложенный Т. А. Гудашевой [8], основан на создании модифицированной дипептидной последовательности пролил-тирозин в связи с тем, что

она составляет “головку” β-поворота НТ_{8–13} и имеет структурное сходство с атипичным нейролептиком, сульпиридом. Из серии *N*-ацил-пролил-тирозинов для более подробного изучения отобран *N*-капроил-*L*-пролил-*L*-тирозин метиловый эфир (ГЗР-123, дилепт) [4]. Основным метаболитом дилепта, по данным фармакокинетического исследования с использованием ВЭЖХ-МС/МС является *N*-капроил-*L*-пролил-*L*-тирозин (ГЗР-125) [1]. Дилепт, кроме широкого спектра антипсихотических эффектов, продемонстрировал антиамнестический эффект в тесте УРПИ (условный рефлекс пассивного избегания) [2]. Учитывая инвазивный характер этого теста, представляло интерес сравнить дилепт и его основной метаболит ГЗР-125 в таком тесте, как распознавание новых объектов (Novel object recognition, NOR), основанном на запоминании знакомых объектов и естественном для грызунов предпочтении новизны [7].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Предпочтение новизны заключается в том, что если дать животному для изучения знакомый объект и новый (отличающийся по форме и/или цвету) – оно предпочтет изучать новый объект.

Эксперименты были выполнены на беспородных крысах-самцах массой 250 – 300 г в светлое время суток с 11 ч до 14 ч. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. При работе с животными соблюдали этические правила гуманного обращения, изложенные в директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС.

В данном исследовании мы использовали следующий вариант теста NOR:

Объекты распознавания А1, А2, А3 представляли собой белые пластмассовые сосуды цилиндрической (высо-

¹ Лаборатория психофармакологии (зав. – проф. Т. А. Воронина) ФГБУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

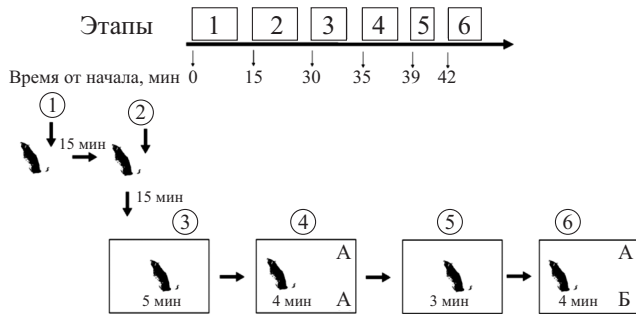


Рис. 1. Схема проведения эксперимента.

1. Инъекция №1 – физраствор подкожно для группы 1, скополамин 0,2 мг/кг подкожно для остальных. 2. Инъекция №2 – физраствор внутрибрюшинно для групп 1 и 2, дилепт 2 мг/кг для группы 3, ГЗР-125 2мг/кг для группы 4. 3. Ознакомление. Животному предоставляли 5 мин для свободного перемещения и изучения установки, в которую оно попадет впервые. 4. Экспозиция 1. Животное отгораживает и устанавливают первую пару объектов (одинаковые; А1 и А2). Затем загородку убирали и давали животному 4 мин на изучение объектов. 5. Смена объектов. Первую пару объектов убирали и готовили вторую, в которой один объект заменяли его копией, а второй представляли впервые. Для предотвращения передачи следов запахов от животного к животному, объекты между этапами 2 и 4 протирали водно-спиртовой смесью (1:1). В это время животное свободно перемещается по установке, как и во время предварительного ознакомления. 6. Экспозиция 2. Животное отгораживали и устанавливали вторую пару объектов (разные; А3 и Б1). Затем загородку убирали и давали животному 4 мин на изучение объектов.

та 19 см, диаметр 5 см) формы с нанесенными на высоте 3 и 9 см черными полосами.

Объект Б1: черный пластмассовый сосуд той же формы и размера.

Вес наполнителя сосудов подбирался таким, чтобы животные не могли их опрокинуть случайными движениями хвоста: для животных 250 – 300 мг масса сосуда составляла 400 г.

В случае если животное ни при одном предъявлении не изучало объекты – оно исключалось из эксперимента. Последовательность этапов эксперимента представлена на рис. 1. Были сформированы следующие группы животных (по 6 особей в каждой группе): 1. Пассивный контроль – вводили физиологический раствор подкожно, затем, спустя 15 мин – физиологический раствор внутрибрюшинно. 2. Активный контроль – вводили скополамин подкожно в дозе 0,2 мг/кг, спустя 15 мин – физиологический раствор внутрибрюшинно. 3. Опытная-1 – вводили скополамин подкожно в дозе 0,2 мг/кг, спустя 15 мин – суспензия таблеток дилепта в дозе 2 мг/кг внутрибрюшинно. 4. Опытная-2 – вводили скополамин подкожно в дозе 0,2 мг/кг, спустя 15 мин – водный раствор ГЗР-125 с твином-80 в дозе 2 мг/кг внутрибрюшинно.

Выбор дозы ГЗР-125 обусловлен тем фактом, что эффективная доза дилепта, согласно нашим предыдущим данным [2], составляет 0,8 – 1 мг/кг, а согласно данным кинетических исследований около 50 % дилепта превращается в метаболит ГЗР-125 [1].

Для регистрации поведения животных применялись web-камеры разрешением 0,3 – 0,6 Мр, подключенные к ПК с ПО для работы с видеопотоком, включавшим видеозапись только в момент нахождения животных в области кадра, содержащей объекты.

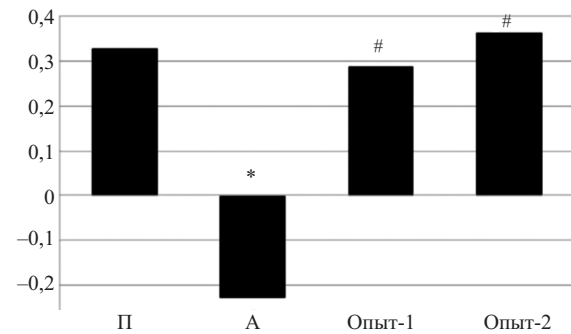


Рис. 2. Средние значения коэффициента дискриминации крыс по тесту распознавания новых объектов.

П – группа 1 – “Пассивный контроль”; А – группа 2 – “Активный контроль”; Опыт-1 – группа 3 – “Опытная-1”; Опыт-2 – группа 4 – “Опытная-2”; * – отличие группы 2 от группы 1; # – отличие групп 3 и 4 от группы 2.

Критерием предпочтения объектов служил коэффициент дискриминации (КД), вычисляемый по следующей формуле:

$$КД = t(Б1) - t(А3) / t(Б1) + t(А3),$$

где: $t(Б1)$ – суммарное время, проведенное у объекта Б1; $t(А3)$ – суммарное время, проведенное у объекта А3.

Значения $КД > 0,1$ означают, что животное различает новый и старый объекты.

Для оценки выраженности прокогнитивного действия исследуемых веществ вычисляли коэффициент антиамнестической активности (КАА), по следующей формуле:

$$КАА = (КД_{АК} - КД_0) / (КД_{АК} - КД_{ПК}) \times 100 \%,$$

где: $КД_{ПК}$ – средний КД в группе №1 – “пассивный контроль”; $КД_{АК}$ – средний КД в группе №2 – “активный контроль” (скополамин); $КД_0$ – средний КД в одной из групп “опытная”, для которой вычислялся КАА.

Для оценки статистической значимости различий между группами использовали критерий Манна-Уитни. Статистическую обработку проводили в программе BioStat 2008. Результаты считались достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В группе пассивного контроля наблюдалось ожидаемое поведение – крысы проводили у нового объекта (Б1) больше времени, чем у знакомого, что и отразилось в положительных значениях КД ($M \pm SEM: 0,33 \pm 0,07$). При введении скополамина в дозе 0,2 мг/кг распознавание объектов нарушалось ($M \pm SEM: -0,23 \pm 0,07$; $p = 0,009$ по сравнению с группой пассивного контроля), животные проводили или практически одинаковое время у обоих объектов, что дало значение КД, близкое к 0, или больше времени у знакомого – что дало в целом по группе отрицательное значение КД. В группе Опытная-1 введение дилепта в дозе 2 мг/кг корректировало скополаминовою амнезию ($M \pm SEM: 0,29 \pm 0,06$; по сравнению с группой активного контроля $p = 0,016$), животные снова различали новый объект от старого. Введение ГЗР-125 в дозе 2 мг/кг также дало положительное когнитотропное действие ($M \pm SEM: 0,36 \pm 0,06$; по сравнению в активным

контролем $p = 0,009$), при этом среднее значение КД оказалось даже больше, чем у интактных животных. Сравнение средних значений КД дано на рис. 2. Значения расчетного показателя КАА составили 92 и 106 % для дилепта и его основного метаболита, соответственно.

Ранее нами было показано, что дилепт проявляет в эксперименте основные черты, характерные для действия потенциальных антипсихотиков: он ослабляет апоморфиновую вертикализацию, фенаминовую гиперактивность и стереотипию, устраняет допамин-зависимое нарушение экстраполяционного поведения, проявляет гипотермическое действие и потенцирует эффект барбитуратов, ослабляет вызванное апоморфином и кетамином угнетение препульсового торможения [3]. При этом, дилепт, в отличие от известных нейролептиков, ухудшающих выработку УРПИ [5] проявлял способность облегчать обучаемость в тесте УРПИ [2]. Положительный эффект в тесте УРПИ позволил предполагать наличие у дилепта позитивного когнитотропного эффекта. Однако известно, что реализация условнорефлекторной реакции пассивного избегания, основанной на негативном подкреплении, связана не только с состоянием когнитивных процессов (обучаемость, память), но также с уровнем тревожности, порогом болевой реакции. Чтобы установить наличие у дилепта специфического когнитотропного эффекта, в работе был применён тест распознавания новых объектов, рассматриваемый в настоящее время в качестве трансляционной модели внимания и эпизодической памяти [11]. В пользу такой трактовки значения этого теста свидетельствуют данные о нарушении способности к визуальному различению объектов у больных шизофренией [12]. В работе был воспроизведён описанный ранее повреждающий эффект скополамина в отношении распознавания новых объектов [6, 14]. Впервые выявлена способность дилепта и его основного метаболита устранять повреждающий эффект скополамина, что свидетельствует о положительном когнитотропном эффекте указанных соединений и позволяет полагать наличие у них холинопозитивного эффекта. В этом состоит принципиальное отличие дилепта от известных нейролептиков, обладающих в той или иной степени выраженности холинолитическим действием и ухудшающих различные когнитивные показатели, в том числе распознавание новых объектов [13].

ВЫВОДЫ

1. Блокатор центральных мускариночувствительных холинорецепторов, скополамин нарушает распознавание новых объектов крысами, что является показателем нарушения внимания и эпизодической памяти.
2. Дипептидный миметик нейротензина, потенциальный антипсихотик дилепт (N-капроил-L-пролил-L-тирозина метиловый эфир) восстанавливает нарушенные скополамином показатели когнитивных функций в тесте распознавания новых объектов.
3. Основной метаболит дилепта (N-капроил-L-пролил-L-тирозин) также восстанавливает нарушенные скополамином когнитивные функции. Выявленный холинопозитивный эффект метаболита может вносить вклад в прокогнитивное действие исходной молекулы, дилепта.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. П. Жердев, С. С. Бойко, Н. В. Месонжник и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **72**, 16–19 (2009).
2. Р. У. Островская, М. В. Ретюнская, Л. С. Гузевых и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **68**(1), 3–6 (2005).
3. Р. У. Островская, Т. А. Гудашева, Н. А. Крупина, С. Б. Середенин, *Биоорганическая химия*, **38**(1), 119–126 (2012).
4. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Т. А. Гудашева, Р. У. Островская и др., *Патент РФ* № 2091390 (1997).
5. J. Arnt, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, № 51, 321–329 (1982).
6. N.de Bruin, B. Pouzet, B. *Pharmacol Biochem Behav.*, **85**(1), 253–60 (2006).
7. E. Dere, J. P. Huston, M. A. De Souza Silva, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, № 31, 673–704 (2007).
8. T. A. Gudasheva, T. A. Voronina, R. U. Ostrovskaya, et al. *J. Med. Chem.*, № 41, 284–290 (1998).
9. B. Kinkad and C. B. Nemeroff, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **5**(2), 205–218 (2006).
10. H. Y. Meltzer, S. R. McGurk, *Schizophr. Bull.*, № 25, 233–235 (1999).
11. J. P. Redrobe, S. Bull, and N. Plath, *Frontiers in Psychiatry*, № 146, 1–7 (2010).
12. C. Tek, J. Gold, T. Blaxton, et al., *Arch Gen Psychiatry*, **59**(2), 146–153 (2002).
13. A. V. Jr. Terry, D. A. Gearhart, S. Warner, et al., *Neurosc.*, **150**(2), 413–424 (2007);.
14. M. L. Woolley, C. A. Marsden, A. J. Sleight, et al., *Psychopharmacology (Berl)*, **170**(4), 358–367 (2003).
15. J. W. Young, S. Powell, V. Risbrough, et al., *Pharmacol. Ther.*, **122**(2), 150–202 (2009).

Поступила 17.06.13

THE STUDY OF PROCOGNITIVE EFFECT OF THE POTENTIAL ANTIPSYCHOTIC, DILEPT AND ITS MAIN METABOLITE, GZR-125 AT THE NOVEL OBJECTS RECOGNITION TEST IN RATS

P. I. Gorelov, R. U. Ostrovskaya, and N. M. Sazonova

Laboratory of psychopharmacology Zakusov Institute of Pharmacology Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya st., 8, Moscow, 125315, Russia

The effect of dipeptidyl neurotensine mimetic, N-caproyl-L-prolyl-L-tyrosine methyl ester (GZR-123, Dilept) and its main metabolite N-caproyl-L-prolyl-L-tyrosine (GZR-125) was evaluated at novel objects recognition test (NOR) in the male outbred rats. NOR was chosen from many cognitive test as those involving the selective action on the attention and episodic memory and considering as translational model for the study of cognition deficiency in schizophrenics. M-cholinoblocking agent scopolamine (0.2 mg/kg s.c.) was used as agent disturbing the performance of the test. Dilept (2 mg/kg i.p.) was shown to restore the NOR performance, disturbed by scopolamine. The same was true for GZR-125 (2 mg/kg i.p.), whose cholinopositive effect could contribute to the procoognitive effect of the parent molecule.

Key words: neurotensine; Dilept (GZR-123); main Dilept' metabolite (GZR-125); NOR-test