

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ СТИМУЛЬНЫХ СВОЙСТВ АНТИДЕПРЕССАНТОВ

А. О. Королев, Т. С. Калинина, А. В. Волкова, Г. В. Мокров,
Н. В. Кудряшов, Т. А. Воронина¹

В условиях оперантной модели лекарственной дифференцировки (ЛкД) с питьевым подкреплением изучены интероцептивные стимульные свойства амитриптилина (5,4 мг/кг, внутривентриально), флуоксетина (10 мг/кг, внутривентриально) и производного пирроло[1,2-а][1,4]дiazемина ГМАЛ-24 (10 мг/кг, внутривентриально) на самцах крыс Вистар. Формирование ЛкД осуществляли в условиях оригинальной экспериментальной схемы, в которой принципиально важным моментом было использование 7-суточного курса инъекций тренировочного препарата, предваряющего дифференцировочное обучение. В условиях данной модификации лекарственной дифференцировки впервые показано наличие дифференцировочных интероцептивных стимульных свойств у амитриптилина и отсутствие таковых у флуоксетина и ГМАЛ-24.

Ключевые слова: трициклические антидепрессанты; лекарственная дифференцировка; крыса; оперантное поведение.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на эффективность методологии лекарственной дифференцировки (ЛкД) для изучения нейрохимических и молекулярных механизмов психотропной активности фармакологических веществ [7], интероцептивные стимульные свойства антидепрессантов остаются малоизученными. В литературе представлены единичные данные о наличии интероцептивных эффектов у трициклического антидепрессанта имипрамина [10, 11] и ряда других препаратов с разными механизмами антидепрессантного действия [5, 8, 10, 11].

Информация о наличии интероцептивных эффектов у амитриптилина (Амн) противоречива. Имеющиеся немногочисленные экспериментальные данные свидетельствуют или об отсутствии интероцептивных эффектов у Амн, или о невозможности использовать ЛкД по причине плохой переносимости препарата в дифференцируемых дозах [10]. Вместе с тем данные о способности Амн в условиях заместительного тестирования полностью воспроизводить интероцептивные эффекты имипрамина косвенно свидетельствуют о наличии у него стимульных свойств [10, 11]. Поскольку Амн является препаратом первого выбора для лечения депрессивных расстройств в Российской Федерации и вторым — за рубежом, например, в США Амн используется в качестве эталонного препарата сравнения при скрининге веществ с антидепрессивной активностью, отсутствие достоверных данных об его интероцептивных свойствах существенно ограничивает возможности сравнительного анализа механизмов антидепрессивных эффектов новых соединений *in vivo*.

За рубежом антидепрессантами первого выбора являются ингибиторы обратного захвата серотонина. Среди препаратов этой группы интероцептивные эффекты установлены у сертралина и циталопрама, но не у флуоксетина (Флн), который был неэффективен как дифференцировочный стимул при обучении ЛкД в течение более чем года [12].

В ФГБУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН синтезировано и отобрано в ряду производных пирроло[1,2-а][1,4]дiazемина в качестве терапевтически перспективного соединения ГМАЛ-24, обладающее выраженными антидепрессивными и анксиолитическими свойствами [5].

Поскольку для достижения клинического эффекта требуется 1–2-недельный прием антидепрессантов, нами разработана новая схема эксперимента, согласно которой субхроническое введение препарата, предваряющее дифференцировочное обучение, может способствовать возникновению и/или стабилизации специфического интероцептивного состояния у животных, что должно обеспечить стабильную сигнальную функцию при последующем дифференцировочном инструментальном обучении в камере Скиннера.

С учетом вышеизложенного целью настоящей работы явилось сравнительное изучение интероцептивных эффектов Амн, Флн и производного пирроло[1,2-а][1,4]дiazемина — соединения ГМАЛ-24 — в условиях нового протокола выработки ЛкД на основе оперантной модели поведения у крыс Вистар.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты были проведены на 36 самцах крыс Вистар массой 250–300 г в начале и 400–450 г в конце эксперимента (питомник лабораторных животных Столбовая). Животных содержали в стандартных условиях при есте-

¹ ФГБУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” РАМН, Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

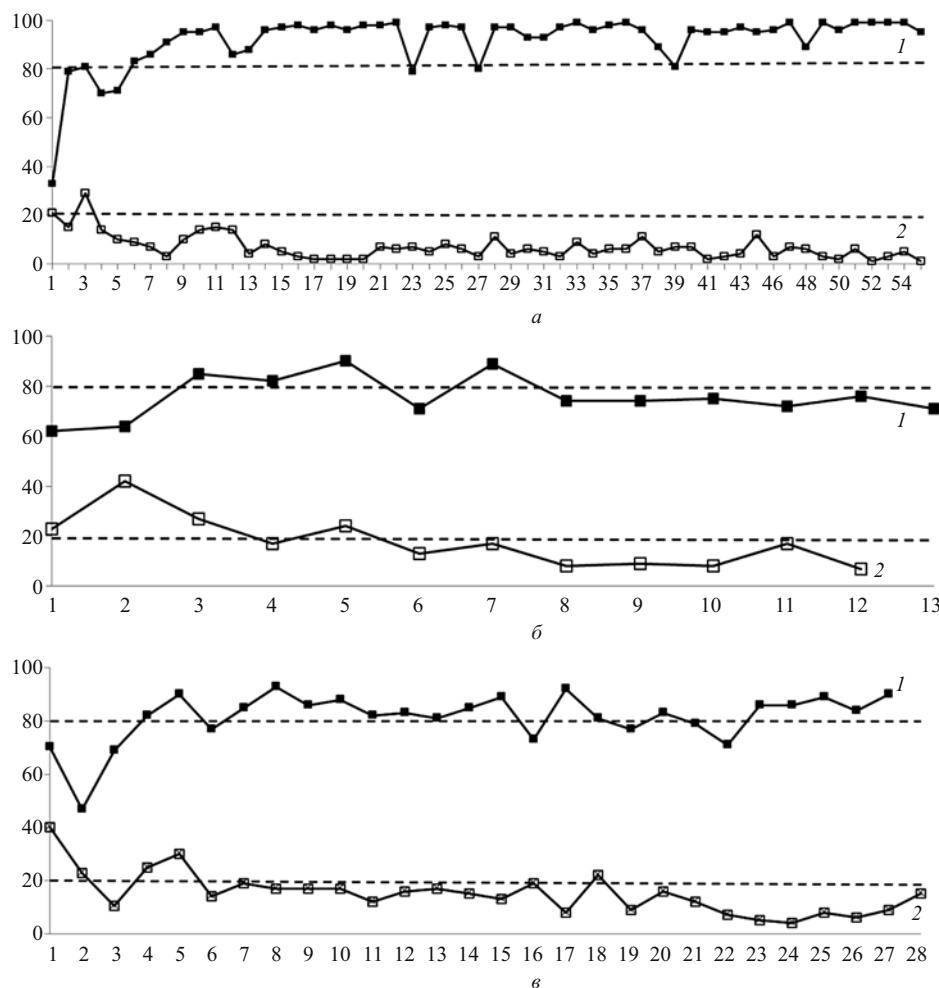


Рис. 1. Кривые накопления правильных реакций при формировании лекарственных дифференцировок амитриптилина (*а*), ГМАЛ-24 (*б*) и флуоксетина (*в*) у крыс Вистар.

По оси абсцисс — номера сеансов обучения; по оси ординат — процент выбора рычагов, адекватных инъекциям амитриптилина (5,4 – 10 мг/кг; внутрибрюшинно), ГМАЛ-24 (10 мг/кг; внутрибрюшинно) и флуоксетина (10 мг/кг; внутрибрюшинно): 1 — инъекции “тренировочного препарата”, 2 — инъекции физиологического раствора. Пунктирная линия — уровень установленного критерия обученности.

ственном световом режиме при свободном доступе к корму. Крысы, обучаемые ЛкД на основе питьевой мотивации, получали воду только в течение экспериментов в качестве вознаграждения при тренировке и через разные интервалы времени после сеансов обучения в пределах 30 мин. Свободный доступ к воде этим животным предоставляли в выходные дни. Эксперименты проводили после 24-часовой питьевой депривации [3]. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики и Приказу МЗ и СР РФ от 23 августа 2010 г. № 708н “Об утверждении Правил лабораторной практики”.

Были использованы Амн (Московский эндокринный завод), селективный ингибитор обратного захвата серотонина Флн (субстанция, АЛСИ Фарма) и 2-(2-гидроксиэтил)-1,2,4,5-тетрагидро-3Н-пирроло[1,2-*a*][1,4]дiazепин-3-он (ГМАЛ-24) (субстанция, ФГБУ “НИИ Фармакологии им. В. В. Закусова” РАМН), имипрамин (субстанция, Egis Pharmaceuticals PLC), циталопрам (субстанция Sigma Aldrich, США).

Амн (5,4 мг/кг), Флн (10 мг/кг) или ГМАЛ-24 (10 мг/кг) использовали в качестве дифференцируемых

стимулов при выработке у крыс оперантного навыка альтернативного выбора правого или левого рычага в зависимости от введения препарата или физиологического раствора.

У крыс, успешно обученных ЛкД, в тестах на замещение были использованы: Амн (1,35; 2,7; 3,75; 5,4 мг/кг), имипрамин (1,75; 5; 10; 15 мг/кг), Флн (5; 10; 20 мг/кг), циталопрам (5; 10; 20 мг/кг), ГМАЛ-24 (1; 5; 10 мг/кг).

Вещества вводили внутрибрюшинно в виде эмульсии в объеме 0,2 мл на 100 г массы. Растворитель — Tween-80.

Оперантные рефлексы вырабатывали одновременно у 6 крыс в 6 камерах Скиннера (Lafayette Instrument Co, США) в условиях автоматизации эксперимента при использовании программы АВЕТ II (США). В качестве единицы подкрепления использовали каплю воды объемом 0,125 мл при осуществлении адекватной реакции.

Процедура формирования ЛкД антидепрессантов состояла из 3 основных этапов: 1) выработки базового оперантного рефлекса в соответствии со стандартной процедурой FR 10 (режим фиксированного отношения — 10,

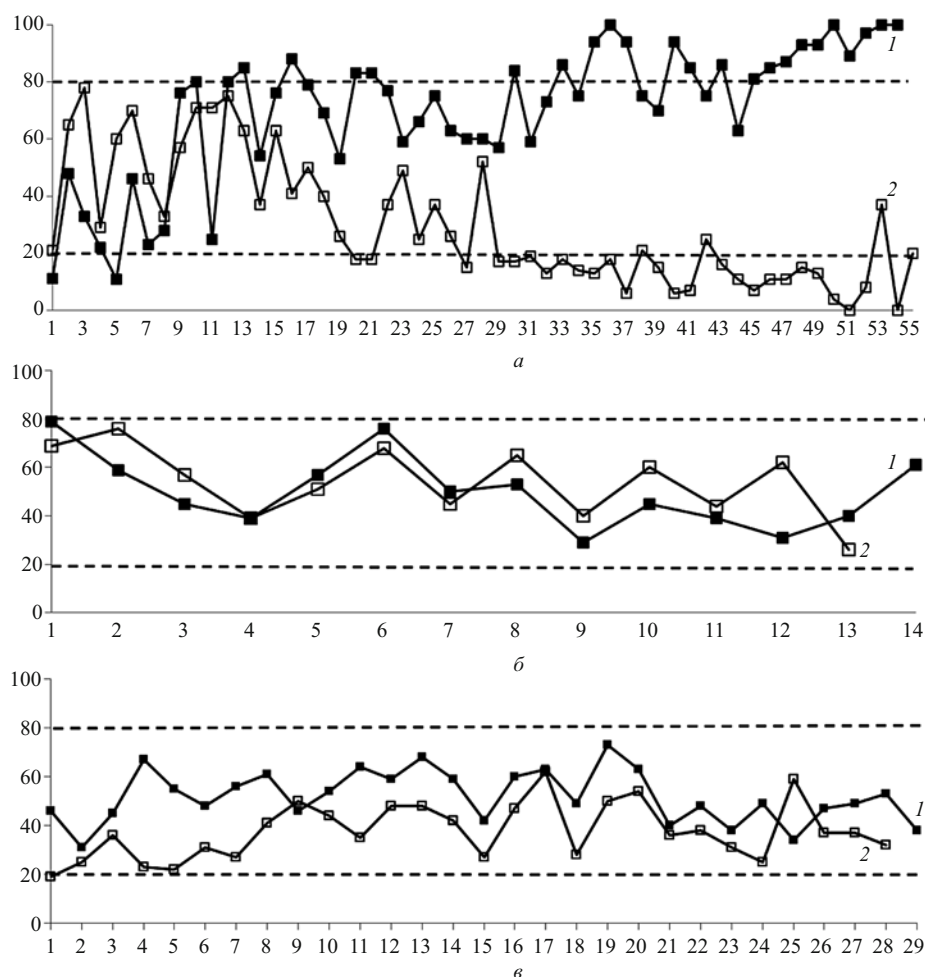


Рис. 2. Динамика воспроизведения лекарственных дифференцировок амитриптилина (*а*), ГМАЛ-24 (*б*) и флуоксетина (*в*) у крыс Вистар.

По оси абсцисс — номера сеансов обучения, по оси ординат — процент выбора рычагов, адекватных инъекциям амитриптилина, ГМАЛ-24 и флуоксетина до получения 1 единицы подкрепления: 1 — инъекции “тренировочных” веществ, 2 — инъекции физиологического раствора. Пунктирные линии — уровень установленного критерия обученности на фоне каждого из моделируемых состояний.

где 10 нажатий на один из двух рычагов рассматривается в качестве законченного условно-рефлекторного акта) [9]; 2) 7-суточного курса инъекций Амн (10 мг/кг), Флн (10 мг/кг) или ГМАЛ-24 (10 мг/кг), используемых далее в качестве дифференцируемых стимулов; 3) выработки собственно ЛкД в модификации, согласно которой в процессе дифференцировочного обучения последовательно увеличивали режим фиксированного отношения от FR 2 до FR 10 с шагом 2, то есть FR 2, FR 4, FR 6, FR 8, FR 10.

Оценка особенностей динамики формирования ЛкД состояла из 2 этапов: 1) анализа текущего процесса выработки условнорефлекторного навыка различения веществ и 2) оценки параметров воспроизведения ЛкД, собственно отражающих “силу стимульного контроля” тренировочного вещества [2]. Оценка текущего процесса обучения ЛкД осуществляли при регистрации: 1) среднего по группе % адекватных дифференцировочных реакций; 2) числа сеансов обучения до достижения первого критерия обученности в каждом из дифференцируемых состояний; 3) количества сеансов обучения, после кото-

рых наблюдали стабильное выполнение ЛкД; 4) частоты оперантных реакций животных.

Критерием обученности полагали достижение животными 80 % уровня адекватных реакций альтернативного выбора, стабильным воспроизведением ЛкД — демонстрацию 80 % уровня адекватных реакций до получения 1 единицы подкрепления минимум в 8 из 10 последовательных сеансов (пяти — на фоне действия вещества и пяти — после инъекции контрольного раствора) [3].

В заместительных тестах при введении тест-веществ регистрировали уровень воспроизведения оперантной дифференцировки, сформированной при использовании Амн в дозе 5,4 мг/кг, определяя % реакций, ассоциируемый с введением тренировочного антидепрессанта.

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли по точному критерию Фишера для оценки выборочных долей вариант и по парному *t*-критерию Стьюдента [1]

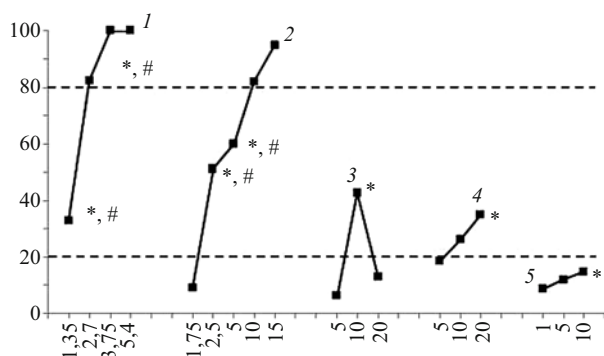


Рис. 3. Заместительное тестирование в условиях лекарственной дифференцировки “амитриптилин — физиологический раствор”.

По оси абсцисс — дозы веществ, мг/кг, использованных в тестах: 1 — амитриптилин, 2 — имипрамин, 3 — флуоксетин, 4 — циталопрам, 5 — ГМАЛ-24, по оси ординат — процент реакций, адекватных введению амитриптилина (5,4 мг/кг). Пунктирные линии отражают уровень генерализации реакции альтернативного выбора: 80 и более % — выбор амитриптилина, 20 и менее % — выбор физиологического раствора. * — отличие от амитриптилина при $p < 0,05$ (точный критерий Фишера), # — отличие от физиологического раствора при $p < 0,05$ (точный критерий Фишера).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности формирования ЛкД “Амитриптилин-физиологический раствор”

При формировании ЛкД начальная дифференцируемая доза Амн составляла 10 мг/кг, при использовании которой после 15 сеансов обучения у всех обучаемых крыс наблюдали признаки седативного состояния, мышечной слабости, потерю массы тела, не связанную с формированием питьевой мотивации. Снижение дифференцируемой дозы Амн до 5,4 мг/кг привело в дальнейшем к устранению у крыс вышеперечисленных нежелательных эффектов в течение всего многомесячного экспериментального периода.

При формировании ЛкД “Амн — физиологический раствор” установлено, что крысы достигали первого критерия обученности в течение четвертого сеанса обучения при введении физиологического раствора (83 ± 12 % адекватных реакций) и в течение пятого сеанса — при инъекции Амн ($85 \pm 3,9$ % правильных выборов). Средняя частота оперантных реакций составила $24,9 \pm 1,2$ нажатий/мин на фоне введения Амн и $22,4 \pm 1,5$ нажатий/мин — при введении физиологического раствора. Как показано на рис. 1, а, стабильное выполнение дифференцировки наблюдали после 16 сеансов обучения, по достижении которых крысы были способны воспроизводить 80 %-ный уровень адекватных реакций в 8 сеансах из 10.

Стабильное воспроизведение условнорефлекторного навыка различения Амн (5,4 мг/кг) и контрольного раствора регистрировали после 6 сеансов тренировки (рис. 2, а). При анализе индивидуальных реакций установлено, что используемые критерии при обучении ЛкД Амн были характерны для 11 из 12 обучаемых крыс (92 %).

При заместительном тестировании была выявлена прямая пропорциональная зависимость интероцептивных стимульных эффектов Амн от дозы (рис. 3). Трициклический антидепрессант имипрамин дозозависимым образом и полностью в максимальной исследуемой дозе воспроизводил интероцептивные эффекты Амн.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что Амн обладает выраженными интероцептивными дифференцировочными стимульными свойствами у самцов крыс стока Вистар в условиях оперантной модели ЛкД, что согласуется с данными о способности Амн вызывать полную генерализацию стимульных свойств имипрамина [10]. Таким образом, 7-суточный курс инъекций Амн (10 мг/кг), предваряющий выработку ЛкД при последующем снижении дифференцировочной дозы Амн до 5,4 мг/кг, сопровождается достаточно быстрым обучением ЛкД “Амн — физиологический раствор”. Динамика выработки ЛкД Амн в данных экспериментальных условиях сопоставима с таковой у высоко-дифференцируемых и средне-дифференцируемых препаратов [2, 3].

Антидепрессанты группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина, Флн и циталопрам, вызывали лишь частичную генерализацию стимульных свойств трициклического антидепрессанта Амн. Соединение ГМАЛ-24 в дозах, в которых оно обнаруживает антидепрессивные свойства на мышах и крысах, при замещении Амн вызывало оперантное поведение, адекватное инъекциям физиологического раствора.

Полученные результаты свидетельствуют о достаточно высокой специфичности интероцептивных эффектов трициклических антидепрессантов, что согласуется с данными о том, что лишь неселективные ингибиторы обратного захвата моноаминов способны воспроизводить интероцептивные эффекты имипрамина [9, 10]. Аналогичный вывод сделан и в отношении селективных и неселективных ингибиторов серотонина и норадреналина [5, 6].

Особенности формирования ЛкД “Флуоксетин — физиологический раствор”

При оперантном обучении крыс ЛкД “Флн — физиологический раствор” было выявлено существенное различие в частоте оперантных реакций в дифференцируемых состояниях. Так, средняя частота оперантных реакций при введениях физиологического раствора в среднем в течение первых 14 сеансов обучения составила $10,7 \pm 1,6$ нажатий/мин, в то время как при инъекциях Флн — $4,3 \pm 1,1$ нажатий/мин ($p \leq 0,5$). Таким образом, разница частот оперантных реакций в дифференцируемых состояниях различалась на 60 %, что в свою очередь, влекло за собой аналогичную разницу в частоте подкреплений адекватного оперантного поведения. Ранее установлено, что уменьшение частоты оперантных реакций под влиянием психотропного вещества более чем на 50 % по сравнению с введением контрольного раствора в течение первых 14 сеансов обучения ЛкД может прогнозировать неэффективность этого вещества в качестве дифференцируемого стимула при дальнейшем обучении ЛкД [10]. В течение наблюдаемого периода тренировки

крысы были не способны ни к стабильному выполнению дифференцировки, ни к ее воспроизведению (рис. 1, в).

Учитывая данные [13] об отсутствии интероцептивных свойств Флн (5 мг/кг) при обучении крыс ЛкД “Флн — физиологический раствор” в течение года, представлялось нецелесообразным продолжать дальнейшее формирование дифференцировки при снижении дозы антидепрессанта. Таким образом было установлено, что внесение в протокол формирования ЛкД “Флн — физиологический раствор” субхронического курса инъекций не приводит к успешному формированию ЛкД Флн.

Особенности формирования ЛкД “ГМАЛ-24 — физиологический раствор”

Достижение первого критерия обученности при выработке ЛкД “ГМАЛ-24 — физиологический раствор” регистрировали в течение 3-го сеанса обучения при введении физиологического раствора и 4-го сеанса — на фоне введения препарата. Средняя частота оперантных реакций при инъекциях физиологического раствора составила $23,6 \pm 1,5$ нажатий/мин и $28 \pm 2,1$ нажатий/мин при введении ГМАЛ-24. При подкреплении адекватных реакций крысы достигали и превышали 80 %-ный уровень адекватных реакций, стабильно выполняя ЛкД после 12 сеансов обучения (рис. 1, б). Вместе с тем при оценке воспроизведения дифференцировки до получения 1-й единицы подкрепления установлено, что крысы выбирали рычаги случайным образом (рис. 2, б), что свидетельствует об отсутствии интероцептивных стимульных свойств у соединения ГМАЛ-24.

Характер замещения Амн селективными ингибиторами обратного захвата серотонина и ГМАЛ-24 свидетельствует о том, что механизмы психотропной активности нового соединения отличны, как от механизмов действия трициклических антидепрессантов, так и от механизмов действия препаратов группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина. Отсутствие интероцептивных эффектов у нового соединения ГМАЛ-24 свидетельствует о чрезвычайно малой вероятности развития лекарственной зависимости при его длительном применении.

ВЫВОДЫ

1. Амитриптилин (5,4 мг/кг) обладает дифференцировочными стимульными интероцептивными эффектами в условиях оперантной модели лекарственной дифферен-

цировки у крыс Вистар при использовании предварительного субхронического введения антидепрессанта.

2. Интероцептивные эффекты амитриптилина имеют прямопропорциональную зависимость от дозы и характеризуются высокой специфичностью, так как интероцептивные эффекты амитриптилина полностью воспроизводятся только при замене его на имипрамин (10 мг/кг), но не на флуоксетин, циталопрам или ГМАЛ-24.

3. Флуоксетин (10 мг/кг) и ГМАЛ-24 (10 мг/кг) не вызывают лекарственную дифференцировку в условиях оперантной модели поведения, что свидетельствует об отсутствии у них интероцептивных эффектов.

Часть работы, касающаяся исследования интероцептивных эффектов амитриптилина, выполнена при поддержке гранта РФФИ № 12-04-01475-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. П. Боровиков, *Статистика для профессионалов. Искусство анализа данных на компьютере*, Санкт-Петербург (2001).
2. А. В. Волкова, Т. С. Калинина, Т. А. Воронина, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **73**(10), 2 – 6 (2010).
3. Т. С. Калинина, Е. В. Петрянина, Т. А. Воронина, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **71**(1), 3 – 7 (2008).
4. Т. С. Калинина, *Автореф. дис. ... д-ра биол. наук*, Москва (2008).
5. Г. В. Мокров, А. М. Лихошерстов, В. И. Посева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **47**(9), 12 – 17 (2013); *Pharm. Chem. J.*, **47**(9), 464 – 469 (2013).
6. T. Alici, H. Kayir, M. O. Aygoren, et al., *Psychopharmacology*, **183**(4), 446 – 451 (2006).
7. R. A. Glennon, R. Young, *Drug Discrimination: Applications to Medicinal Chemistry and Drug Studies*, Hoboken, NJ (2011).
8. A. Dekeyne, M. J. Millan, *Psychopharmacology*, **203**(2), 329 – 341 (2009).
9. A. Dekeyne, M. J. Millan, *Behav. Pharmacol.*, **14**(5 – 6), 391 – 407 (2003).
10. D. A. Overton, *State dependent learning and drug discrimination*, Plenum Press, New York (1984).
11. M. D. Schechter, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **19**(5), 751 – 754 (1983).
12. L. Zhang, J. E. Barrett, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **259**(3), 1088 – 1093 (1991).
13. D. Marona-Lewicka, D. E. Nichols, *Psychopharmacology*, **138**(1), 67 – 75 (1998).

Поступила 03.04.14

COMPARATIVE STUDY OF DISCRIMINATIVE STIMULUS PROPERTIES OF ANTIDEPRESSANTS

A. O. Korolev, T. S. Kalinina, A. V. Volkova, G. V. Mokrov, and N. V. Kudryashov

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

Interoceptive stimulus properties of amitriptyline (54. mg/kg body weight), fluoxetine (10 mg/kg), and pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepine derivative GMAL-24 (10 mg/kg) were studied in a standard operant model with liquid reinforcement of drug discrimination (DD) in male Wistar rats. A new experimental schedule that includes subchronic (7-day) administration of a training drug was used to perform DD learning. For the first time, it was found that amitriptyline has a discriminative interoceptive stimulus properties. Neither fluoxetine nor GMAL-24 did exhibit interoceptive properties. Imipramine (15 mg/kg, i.p.) fully substitutes for amitriptyline stimulus in substitution test. Fluoxetine (5 – 20 mg/kg, i.p.) failed to substitute with amitriptyline. Thus, amitriptyline/saline drug discrimination should be used for a comparative analysis of the central mechanisms of action of psychotropic substances, rather than for screening specific antidepressant activity.

Keywords: tricyclic antidepressants; drug discrimination; rat; operant behavior