

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ИЗУЧЕНИЕ АНКСИОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ПИРАЗОЛО[с]ПИРИДИНА ГИЖ-72

Н. В. Кудряшов, Т. С. Калинина, А. А. Шимширт, А. О. Королев,
А. В. Волкова, Л. А. Жмуренко, Т. А. Воронина¹

Изучены анксиолитические свойства оригинального соединения ГИЖ-72 (4,6-диметил-2-(4-хлорфенил)-2,3-дигидро-1*H*-пиразоло[4,3-*c*]пиридин-3-он, хлоралгидрат) (20 мг/кг, внутривентриально) в тестах “открытое поле” и “закапывание шариков” в сравнении с флуоксетином (20 мг/кг, внутривентриально), диазепамом (1 мг/кг, внутривентриально), афобазолом (1 мг/кг, внутривентриально) на самцах мышей инбредных линий BALB/С и С57BL/6. В тесте “открытое поле” ГИЖ-72 проявил анксиолитический эффект, который сохранялся через 24 ч после введения и по структуре поведенческих эффектов отличался от эффектов диазепама и афобазола у мышей линии BALB/С. ГИЖ-72 уменьшал количество зарытых шариков в тесте “закапывание шариков” у мышей BALB/С и С57BL/6, и этот эффект сопоставим с эффектом флуоксетина. В условиях модели лекарственной дифференцировки “коразол (20 мг/кг) — физиологический раствор” на самцах крыс Вистар установлено, что ГИЖ-72 не ингибирует интерцептивные эффекты коразола, что свидетельствует об отсутствии у ГИЖ-72 свойства лиганда положительных модуляторных сайтов ГАМК_A-рецептора.

Ключевые слова: анксиолитики; антидепрессанты; тревога; лекарственная дифференцировка; мышь; крыса.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время рост заболеваемости тревожно-депрессивными расстройствами обуславливает актуальность поиска новых соединений, обладающих психотропными эффектами и терапевтической безопасностью. В рамках этой задачи в ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” был синтезирован ряд производных пиразоло[с]пиридина из которого было отобрано соединение ГИЖ-72 (4,6-диметил-2-(4-хлорфенил)-2,3-дигидро-1*H*-пиразоло[4,3-*c*]пиридин-3-он, хлоралгидрат), обладающее анксиолитическими и антидепрессивными свойствами, а также низкой токсичностью [4]. Анксиолитическая активность ГИЖ-72 была изучена после однократного и хронического введения в опытах на крысах в тестах “приподнятый крестообразный лабиринт”, “конфликтная ситуация”, “открытое поле” [4].

В клинике некоторые антидепрессанты, в частности селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, применяют для лечения тревожных расстройств, таких как панические атаки и обсессивно-компульсивное расстройство [11, 13]. Установлено, что флуоксетин обладает анксиогенными свойствами на основных моделях тревоги у грызунов в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт”, “конфликтная ситуация”, “черно-белая камера” и т.д. [6], кроме теста “закапыва-

ние шариков”, в котором препарат демонстрирует ослабление тревожных реакций [18]. Для прогнозирования возможной эффективности ГИЖ-72 в фармакотерапии обсессивно-компульсивного расстройства представляется целесообразным изучение эффективности ГИЖ-72 на экспериментальной модели данной патологии — в тесте “закапывание шариков” (marble burying test) [18].

Более ранние исследования анксиолитических свойств ГИЖ-72 дали основу для предположения о возможной роли ГАМК_A-рецептора в реализации его психотропных эффектов [4]. В настоящее время показано, что ГАМКергическая система вовлекается в патогенез не только тревожных расстройств, но и депрессии [9, 16], а ГАМК_A-рецептор рассматривается в качестве гипотетической мишени для антидепрессантов [14, 17]. В связи с этим представляет интерес изучение возможной роли ГАМК_A-рецепторов в реализации психотропных эффектов ГИЖ-72.

Неконкурентный антагонист ГАМК_A-рецептора коразол в субсудорожных дозах вызывает у людей состояние тревоги, а в конвульсивных — провоцирует панические атаки [10]. В условиях эксперимента на животных анксиогенные эффекты коразола используются для моделирования тревожных состояний [3, 8, 10], в том числе, в различных модификациях лекарственной дифференцировки, что позволяет оценить анксиолитические эффекты веществ на моделях тревоги, обусловленных блокадой ГАМК_A-рецептора.

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

Целью настоящей работы являлось изучение анксиолитических свойств ГИЖ-72 в тестах “открытое поле”, “закапывание шариков” и исследование возможного вовлечения ГАМК_A-рецептора в реализацию эффектов ГИЖ-72 на модели оперантного метода лекарственной дифференцировки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты были проведены на 125 самцах инбредной линии BALB/C, 30 самцах инбредной линии C57BL/6 массой 20 – 25 г и 12 самцах крыс Вистар массой 250 – 300 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественной суточной смене освещенности день/ночь, свободном доступе к воде и пище. 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.

В работе использовали следующие вещества: 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”), флуоксетин гидрохлорид (20 мг/кг, субстанция Sigma), диазепам (1 мг/кг, субстанция Sigma), афобазол (1 мг/кг, ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова”). В качестве контроля использовали эквивалентный объем (0,1 мл на 10 г массы животного) физиологического раствора. ГИЖ-72, флуоксетин, диазепам и афобазол применяли в виде эмульсии с

Twin-80 (Sigma Aldrich). Все вещества вводили внутривенно за 30 мин до поведенческих тестов. В тесте “открытое поле” ГИЖ-72 и физиологический раствор также вводили за 24 ч до поведенческой процедуры.

Тест “открытое поле”. Исследование проводили на мышах линии BALB/C в соответствии с ранее описанной методикой “открытое поле” [2, 5]. Уровень тревожности оценивали в экспериментальной установке квадратной формы 40 на 40 см со стенками высотой 22 см. Площадка открытого поля была разделена на 25 квадратов, в 9 центральных квадратах располагалось 16 отверстий диаметром 2 см. Освещенность площадки составляла 300 лк. В течение 2 мин регистрировали периферическую и центральную горизонтальную активность, число обследований отверстий и вертикальных стоек. На основе полученных данных определяли коэффициент ориентировочной исследовательской реакции ($K_{OИР}$) по сумме параметров и индекс тревожности по соотношению активности в центральной части установки к сумме активностей в центре и на периферии. Увеличение индекса тревожности являлось коррелятом ослабления тревожных реакций.

Тест “закапывание шариков”. Эксперимент проводили по оригинальной методике Marble burying test для мышей [18]. Использовали мышей инбредных линий BALB/C и C57BL/6. В качестве экспериментальной установки использовали индивидуальные поликарбонатные боксы для грызунов (31,5 × 23 × 15,7 см), которые на 5 см заполняли плотно утрамбованными опилками. В экспериментальной комнате поддержива-

Эффекты ГИЖ-72, флуоксетина, диазепама и афобазола после однократного введения в тесте “открытое поле” на мышах линии BALB/C ($M \pm SE$)

Вещества, дозы	Горизонтальная активность		Индекс тревожности, %	Вертикальная активность	Обследование отверстий	$K_{OИР}$
	периферическая	центральная				
Контроль за 30 мин, $n = 10$	26,0 ± 3,2	2,7 ± 1,0	9,4	2,7 ± 1,1	5,3 ± 0,7	36,7 ± 4,5
ГИЖ-72 20 мг/кг за 30 мин, $n = 10$	22,6 ± 2,8	4,8 ± 1,7	17,5**	2,0 ± 0,8	6,4 ± 0,7	35,8 ± 4,6
Контроль за 24 ч, $n = 10$	12,2 ± 3,3	2,4 ± 0,7	16,4	0	5,7 ± 0,7	20,9 ± 3,4
ГИЖ-72 20 мг/кг за 24 ч, $n = 10$	6,3 ± 0,9	2,7 ± 1,0	30,0**	0	5,0 ± 0,9	14,0 ± 1,4
Контроль за 30 мин, $n = 10$	39,2 ± 2,3	7,8 ± 1,9	16,6	2,7 ± 0,4	8,3 ± 0,8	58,0 ± 3,1
Флуоксетин 20 мг/кг за 30 мин, $n = 10$	24,4 ± 4,2*	2,5 ± 0,9*	9,3**	0*	7,6 ± 0,8	34,9 ± 4,9 *
Контроль за 30 мин, $n = 15$	15,2 ± 1,4	4,1 ± 0,8	21	1,5 ± 0,3	1,7 ± 0,3	23,2 ± 1,8
Диазепам 1 мг/кг за 30 мин, $n = 10$	30,0 ± 2,8*	7,5 ± 0,8**	22	3,0 ± 0,4**	2,5 ± 0,4**	43,5 ± 3,8**
Афобазол 1 мг/кг за 30 мин, $n = 10$	23,1 ± 2,8*	6,1 ± 1,2**	21	1,9 ± 0,5	2,5 ± 0,3**	34,1 ± 2,6**

Примечание: n — количество мышей в группе;
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ в сравнении с контролем.

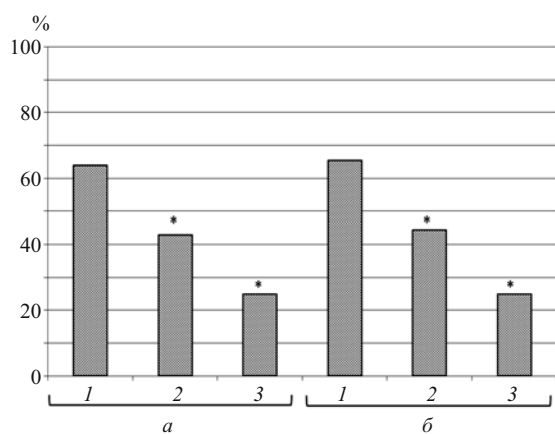


Рис. 1. Эффекты ГИЖ-72 и флуоксетина в тесте “закапывание шариков” у мышей:

a – мыши линии BALB/C; *б* – мыши линии C57BL/6; 1 – контроль; 2 – ГИЖ-72 в дозе 20 мг/кг; 3 – флуоксетин в дозе 20 мг/кг; * $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

По оси ординат – количество зарытых шариков, %.

ли 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 (по схеме 3 на 3). Мышей помещали в индивидуальные боксы с шариками на 30 мин, по истечению которых подсчитывали количество зарытых шариков (зарытыми считались шарики, погруженные в подстилку на 2/3).

Методика лекарственной дифференцировки (ЛкД). Эксперимент проводили на самцах крыс Вистар при использовании стандартной оперантной методики ЛкД “коразол (20 мг/кг) — физиологический раствор” на основе режима фиксированного отношения FR10 с питьевым подкреплением в соответствии с ранее описанным экспериментальным дизайном [1, 3]. По достижении стабилизации текущего процесса обучения ЛкД и воспроизведения ЛкД осуществляли заместительное тестирование или блокаду интероцептивных эффектов коразола. В тесте на антагонизм ГИЖ-72 вводили за 30 мин до коразола. Коразол вводили за 15 мин до тестирования. При заместительном тестировании ГИЖ-72 вводили за 40 мин до теста. Время теста составляло от 2 до 5 мин, тестовые сессии независимо от реакции животных подкрепляли и не подкрепляли случайным образом.

Параметрами оценки воспроизведения интероцептивных эффектов “тренировочных” и тестовых комбинаций являлись: 1) средний по группе % выборов рычага, соотношенного в процессе обучения с инъекцией тренировочного препарата; 2) % крыс, осуществляющих выбор рычагов, ассоциируемых с каждым из дифференцируемых стимулов.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения BioStat 2009 (professional version 5.8.4.3, AnalystSoft-

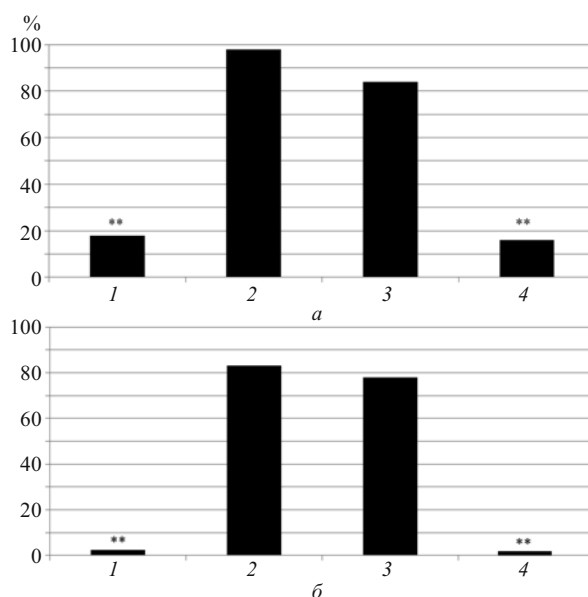


Рис. 2. Влияние ГИЖ-72 на интероцептивные эффекты коразола (20 мг/кг внутривенно) у крыс, обученных лекарственной дифференцировке “коразол — физиологический раствор” в оперантном режиме FR10:

a) влияние веществ на среднюю по группе долю (%) выборов рычагов, ассоциируемых с инъекцией коразола (20 мг/кг, в/б); параметр представлен по оси абсцисс;

б) влияние веществ на долю (%) крыс, выбирающих рычаг, адекватный коразолу; параметр представлен по оси ординат.

1 — физиологический раствор; 2 — коразол (20 мг/кг); 3 — ГИЖ-72 (20 мг/кг) + коразол (20 мг/кг); 4 — ГИЖ-72 (20 мг/кг); ** $p < 0,01$ в сравнении с коразолом.

Инс.). 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). Данные, представленные в %, обрабатывали в соответствии с методом оценки для выборочных долей вариант.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Открытое поле. ГИЖ-72 (20 мг/кг) при однократном введении, не изменяя $K_{\text{ОИР}}$ избирательно увеличивал индекс тревожности в 1,9 раза ($p < 0,01$), по сравнению с контрольной группой животных (таблица), что свидетельствует о наличии анксиолитической активности у изучаемого соединения, которая сохранялась через 24 ч после введения. Однако эффекты ГИЖ-72 через 30 мин и через 24 ч после введения имели некоторые различия: если в первом случае была отмечена тенденция к усилению центральной горизонтальной активности, то во втором — к уменьшению периферической горизонтальной активности.

Флуоксетин в дозе 20 мг/кг вызывал усиление тревожных реакций: уменьшал периферическую горизонтальную активность в 1,6 раза ($p < 0,05$), центральную —

в 3 раза ($p < 0,05$), индекс тревожности — в 1,8 раза ($p < 0,01$), устранял вертикальные стойки и снижал $K_{OИР}$ в 1,7 раза ($p < 0,05$), что согласуется с данными литературы [6]. Диазепам (1 мг/кг) в 2 раза увеличивал периферическую горизонтальную активность ($p < 0,05$), вертикальную активность и $K_{OИР}$ ($p < 0,01$), в 1,8 раз — центральную активность ($p < 0,01$), в 1,5 раза — число обследований отверстий ($p < 0,01$). Афобазол также демонстрировал анксиолитический эффект, который сопровождался увеличением периферической горизонтальной активности, центральной активности, числа обследований отверстий и $K_{OИР}$ в 1,5 раза ($p < 0,01$).

Тест “закапывание шариков”. ГИЖ-72 (20 мг/кг) после однократного введения демонстрировал ослабление тревожных реакций (рис. 1): уменьшал количество закопанных шариков на 21 % у мышей линий BALB/C и C57BL/6 ($p < 0,05$). Флуоксетин (20 мг/кг) при однократном введении также уменьшал количество зарытых шариков на 39,0 % у мышей линии BALB/C и на 40,4 % у мышей линии C57BL/6 ($p < 0,05$).

Лекарственная дифференцировка. Предварительное введение ГИЖ-72 в дозе 20 мг/кг не вызывало изменений интероцептивных эффектов коразола (рис. 2). В заместительном тестировании условно-рефлекторное поведение, ассоциированное с введением ГИЖ-72, соответствовало инъекции физиологического раствора.

ГИЖ-72 в дозе 20 мг/кг обнаруживал активность в тесте “закапывание шариков” на 2 линиях мышей — BALB/C и C57BL/6, которая была сопоставима с активностью флуоксетина. Наличие эффекта в тесте “закапывание шариков”, с одной стороны, является одним из прогностических признаков возможной эффективности ГИЖ-72 в фармакотерапии обсессивно-компульсивного расстройства [7, 18], с другой — позволяет предполагать наличие у ГИЖ-72 серотонинергического компонента, поскольку большинство антидепрессантов, ослабляющих тревожные реакции в тесте “закапывание шариков” обладают активностью в отношении серотонинергических процессов [11]. Кроме того, ранее полученные данные показали однонаправленное воздействие ГИЖ-72 и флуоксетина на содержание серотонина в прилежащем ядре и гипоталамусе [4].

В тесте “открытое поле” ГИЖ-72 (20 мг/кг) обладает анксиолитическим эффектом с избирательным увеличением индекса тревожности, который сохранялся через 24 ч после однократного введения. Противотревожное действие ГИЖ-72 в тесте “открытое поле” по своей структуре значительно отличается от такового у препаратов сравнения — диазепама и афобазола, что может быть следствием различий в механизмах анксиолитического эффекта этих соединений. При сравнении эффектов ГИЖ-72 через 30 мин и 24 ч после введения отмечено, что во втором случае анксиолитический эффект ГИЖ-72 сопровождается тенденцией к

уменьшению периферической активности, т.е. речь идет об уменьшении тигмотаксиса. Уменьшение тигмотаксиса в тесте “открытое поле” вызывает бупирон – анксиолитик с серотонинергическим механизмом действия [15], что может косвенно указывать на сходство с ГИЖ-72. По результатам теста “открытое поле” можно сделать вывод о том, что ГИЖ-72 по направленности эффекта и по структуре его поведенческих проявлений отличается от всех 3 препаратов сравнения: флуоксетина, диазепама и афобазола.

В условиях метода ЛкД ГИЖ-72 не изменяет интероцептивные эффекты коразола, а в заместительном тесте условно-рефлекторное поведение, ассоциированное с введением ГИЖ-72, соответствует инъекции физиологического раствора, что отличает ГИЖ-72 от всех известных положительных лигандов модуляторных сайтов ГАМК_A-рецепторов [10]. Учитывая высокую корреляцию данных, установленных при сопоставлении результатов, полученных при использовании оперантных методов ЛкД и методов рецепторного связывания [8], можно предположить, что соединение ГИЖ-72 не является лигандом ГАМК_A-рецепторов.

Таким образом, установлено, что ГИЖ-72 в дозе 20 мг/кг обладает анксиолитическим эффектом в тестах “закапывание шариков” и “открытое поле”. В тесте “закапывание шариков” эффект ГИЖ-72 сопоставим с эффектом флуоксетина, а в тесте “открытое поле” отличается от флуоксетина по направленности действия, а от диазепама и афобазола — по структуре поведенческих реакций. Позитивные эффекты ГИЖ-72, полученные в тесте “закапывание шариков”, сопоставимые с действием флуоксетина, предполагают эффективность ГИЖ-72 при обсессивно-компульсивном расстройстве. Однако анксиолитики бензодиазепинового ряда и нейролептики [7, 12] также подавляют закапывание шариков и являются средствами терапии второй линии при обсессивно-компульсивном расстройстве [13], что требует дифференцированного подхода к анализу активности ГИЖ-72 в данном тесте и делает актуальным задачу дальнейшего более детального изучения нейролептической активности ГИЖ-72 в эксперименте.

ВЫВОДЫ

1. ГИЖ-72 в дозе 20 мг/кг обладает анксиолитическим эффектом в тесте “закапывание шариков”, сопоставимым с эффектом флуоксетина.
2. ГИЖ-72 в дозе 20 мг/кг обладает анксиолитическим эффектом в тесте “открытое поле”, который сохраняется через 24 ч после введения и по своей структуре отличается от эффектов диазепама и афобазола.
3. ГИЖ-72 не ингибирует интероцептивные эффекты коразола при использовании оперантного метода лекарственной дифференцировки, что свидетельствует об отсутствии у ГИЖ-72 свойств лиганда ГАМК_A-рецептора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. С. Калинина, Т. А. Воронина, Е. В. Петрянина, *Эксперим. и клин. фармакол.*, № 1, 3 – 7 (2008).
2. Т. С. Калинина, А. А. Шимширт, Н. В. Кудряшов и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, № 2, 3 – 7 (2014).
3. А. О. Королев, Т. С. Калинина, А. В. Волкова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, № 7, 3 – 7 (2014).
4. О. К. Мелетова, *Автореф. дис. канд. биол. наук*, Москва (2007).
5. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, А. Н. Миронов (ред.), Москва (2012).
6. F. Borsini, J. Podhorna, D. Marazziti, *Psychopharmacology (Berl.)*, **163**(2), 121 – 141 (2002).
7. L. A. BruinsSlot, L. Bardin, A. L. Auclair, et al., *Behav. Pharmacol.*, **19**(2), 145 – 152 (2008).
8. J. J. Buccafusco, *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, 2 ed., CRC Press, Florida (2009).
9. S. A. Johnson, N. M. Fournier, L. E. Kalynchuk, *Behav. Brain Res.*, **168**(2), 280 – 288 (2006).
10. M. E. Jung, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **26**(4), 429 – 439 (2002).
11. D. Marazziti, M. Carlini, L. Dell'Osso, *Cur. Top. Med. Chem.*, **12**(4), 238 – 253 (2012).
12. L. B. Nicolas, Y. Kolb, E. P. Prinssen, *Eur. J. Pharmacol.*, **547**(1 – 3), 105 – 115 (2006).
13. C. B. Pull, C. Damsa, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, **4**(4), 779 – 795 (2008).
14. G. Sanacora, A. Saricicek, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **6**(2), 127 – 134 (2007).
15. M. Siemiakowski, H. Sienkiewicz-Jarosz, A. I. Czlonkowska, et al., *Pharmac. Biochem. Behav.*, **66**(3), 645 – 651 (2000).
16. V. Uzunova, L. Sampson, D. P. Uzunov, *Psychopharmacology*, **186**, 351 – 361 (2006).
17. I. Vollenweider, K. S. Smith, R. Keist, et al., *Behav. Brain Res.*, **217**(1), 77 – 80 (2011).
18. J. M. Witki, *Cur. Protoc. Neurosci.*, **9**, 9 – 30 (2008).

Поступила 05.05.15

THE STUDY OF ANXIOLYTIC PROPERTIES OF NEW PYRAZOLO[C]PYRIDINE DERIVATIVE GIZH-72

N. V. Kudryashov, T. S. Kalinina, A. A. Shimshirt, A. O. Korolev, A. V. Volkova,
L. A. Zhmurenko, and T. A. Voronina¹

¹ Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia.

It was studied the anxiolytic properties of 4,6-dimethyl-2-(4-chlorophenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-c]pyridin-3-one chloralhydrate (GIZh-72, 20 mg/kg, i.p.) and afobazole (1 mg/kg, i.p.) in comparison to fluoxetine (20 mg/kg, i.p.) and diazepam (1 mg/kg, i.p.) in open-field and marble burying tests on male mice of inbred strains BALB/C and C57BL/6. It is established that GIZh-72 administered both 30 min and 24 h before testing produces anxiolytic effect in the open-field test. The open field anxiety response patterns following GIZh-72 administration differed from these in diazepam or afobazole treated BALB/C mice. This drug also decreased the number of buried marbles in both BALB/C and C57BL/6 mice, the effect being comparable to that of afobazole and fluoxetine. In operant drug discrimination liquid-reinforcement paradigm in male Wistar rats, GIZh-72 failed to antagonize or substitute for the interoceptive stimulus cues of pentylentetrazole evoking the saline-like responses in the latter case, which was evidence for the absence of properties of a ligand bearing positive modulator sites of GABA_A receptor.

Keywords: anxiolytics; antidepressants; anxiety; drug discrimination; mice; rats.