

©Коллектив авторов

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И НЕЙРОРЕЦЕПТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРОИЗВОДНОГО РАЦЕТАМА ГИЖ-290 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ДЕФИЦИТА ВНИМАНИЯ

Г.И. Ковалёв*, Н.А. Сухорукова, Е.В. Васильева, Е.А. Кондрахин, Р.М. Салимов, В.Б. Наркевич, В.С. Кудрин

Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова,
125315, Москва, ул. Балтийская, 8; *эл. почта: kovalev@academpharm.ru

Изучены поведенческие и нейрохимические эффекты нового производного рацетама ГИЖ-290 на модели дефицита внимания у аутбредных мышей CD-1. В результате субхронического введения ГИЖ-290 (1 мг/кг, 3 мг/кг и 5 мг/кг внутривентриально 1 раз в сутки в течение 6 дней) исходно низкий уровень внимания у животных субпопуляции ED-Low, отобранных при предварительном поведенческом типировании в тесте “закрытый обогащённый крестообразный лабиринт” (ЗОКЛ), увеличивался с наибольшей избирательностью при введении ГИЖ-290 в дозе 3 мг/кг. Методом радиолигандного анализа показано, что в этой дозе препарат изменял в префронтальной коре (ПФК) мозга животных субпопуляции ED-Low плотность (B_{\max}) маркерных D_2 -дофаминовых и ГАМК_B-рецепторов до величин B_{\max} в субпопуляции сравнения ED-High. При этом по данным ВЭЖХ-ЭД в ПФК грызунов ED-Low, получавших ГИЖ-290 в дозе 3 мг/кг, происходит нормализация тканевой концентрации как самого дофамина (ДА), так и показателей его внутри- и внеклеточного метаболизма (ДОФУК/ДА и ГВК/ДА). Полученные результаты указывают на эффективность изучаемого препарата в фармакотерапии дефицита внимания при его экспериментальном моделировании и воздействии на потенциальные молекулярные мишени, выявленные в проведённом исследовании.

Ключевые слова: дефицит внимания; ГИЖ-290; закрытый обогащённый крестообразный лабиринт; D_2 -рецептор; ГАМК_B-рецептор; ВЭЖХ

DOI: 10.18097/PBMC20226805367

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день синдром дефицита внимания (СДВ), включающий в себя комплекс симптомов с различной выраженностью гиперактивности, импульсивности и невнимательности, активно исследуется в неврологии и психиатрии. Данное нейробиологическое расстройство, возникающее в детском и подростковом возрасте, значительно осложняет у взрослых социальную адаптацию, выполнение рабочих задач, способность к контролю поведения и планированию действий, воспроизведение ранее полученных навыков в новых меняющихся условиях [1]. В современных стратегиях терапии СДВ как самостоятельной патологии и компонента при иных заболеваниях, используют комплексный подход, основанный на сочетании немедикаментозных методов и применении различных фармакологических средств. Важными критериями при терапии СДВ являются не только эффективность препаратов, направленно воздействующих на механизмы, лежащие в основе развития СДВ, но и терапевтическая широта, возможность варьирования дозы при длительном применении и удовлетворительная переносимость пациентами [2].

В экспериментальных исследованиях, проведённых в лаборатории радиоизотопных методов исследований НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, посвящённых разработке и апробации новой модели СДВ на основе фенотипирования аутбредных мышей CD-1, было обнаружено корректирующее действие различных ноотропных препаратов (пирацетама [3], пантогама [4], фенибута [6],

семакса [6]) на исходный дефицит внимания у мышей. Также с использованием методов радиолигандного анализа были изучены особенности нейрорецепторного профиля в структурах мозга грызунов, связанных с когнитивной функцией внимания, в частности — в префронтальной коре (ПФК). Полученные результаты позволили не только дополнить уже существующие концепции патогенеза СДВ, но и актуализировать процесс поиска новых лекарственных средств для терапии данного заболевания (“препарат-рецептор-мишень”). Одним из таких веществ стало синтезированное и изученное в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова соединение ГИЖ-290 — новое производное 4-фенилпирролидона, созданное на основе рацетамов, сочетающих противосудорожное и ноотропное действие [7] (рис. 1).

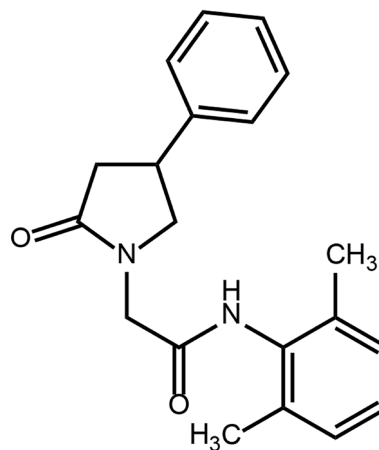


Рисунок 1. Структурная формула ГИЖ-290.

Целью данной работы было изучение поведенческих, нейрорецепторных и нейрометаболических эффектов нового производного рацетама ГИЖ-290 при его субхроническом введении аутистическим мышам CD-1 с использованием новой экспериментальной модели дефицита внимания.

МЕТОДИКА

Тест-система

Эксперимент проводили на самцах аутистических мышей CD-1, полученных из питомника лабораторных животных филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, массой 23-30 г ($n=172$), которых содержали в виварии НИИ фармакологии имени В.В. Закусова в стандартных условиях при свободном доступе к воде и корму. Эксперименты проводили с 10 ч до 16 ч. Экспериментальная установка была поставлена "НПК Открытая Наука" (Россия).

Фармакологические препараты и радиолиганды

В экспериментах были использованы реактивы, произведённые "Sigma-Aldrich" (США). ГИЖ-290 (2,6-диметиланилид (2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил) уксусной кислоты) был предоставлен отделом химии лекарственных средств НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Для изучения рецепторного связывания использовали следующие лиганды: [^3H]($-$)баклофен (49,7 Кюри/ммоль, "Perkin Elmer", США), [^3H]($-$)сульпирид (40 Кюри/ммоль), синтезированные профессором, д.х.н. Ю.А. Золотарёвым в отделе химии физиологически активных веществ Института молекулярной генетики РАН.

Тест "Закрытый обогащённый крестообразный лабиринт"

Грызунов подвергали поведенческому тестированию в закрытом обогащённом крестообразном лабиринте (ЗОКЛ) согласно описанной процедуре [8, 9].

Во время первого теста производили отбор особей с соответствующими поведенческими фенотипами, различавшимися по уровню внимания к объектам в отсеках установки. Животным посредством внутрибрюшинных инъекций в течение 6 дней один раз в сутки вводили физиологический раствор (контрольные группы — NaCl, 0,9%, с добавлением 0,4% твина-80), либо изучаемое вещество, растворенное в физрастворе с добавлением 0,4% твина-80 (опытные группы), в дозах 1 мг/кг, 3 мг/кг или 5 мг/кг соответственно. Выбор доз и продолжительности введения основывался на данных, полученных ранее в Лаборатории радиоизотопных методов исследований НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Во время второго теста, выполнявшегося в той же обстановке через 1 ч после заключительной инъекции, оценивали влияние изучаемого вещества на внимание к обстановке у мышей с известным типом исследовательской реакции на объекты, имеющиеся в лабиринте.

По окончании поведенческих экспериментов грызунов декапитировали, мозг извлекали на леду и выделяли ПФК по схеме [10]. После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -75°C .

Радиолигандный анализ D_2 -рецепторов

Выделение плазматических мембран ПФК, содержащих D_2 -рецепторы, проводили по методу [11]. Полученные образцы плазматических мембран суспендировали в буфере и хранили в холодильнике при температуре -75°C . Для радиолигандного анализа D_2 -рецепторов использовали метод [12].

Радиолигандный анализ ГАМК_B-рецепторов

Для приготовления мембранных препаратов, содержащих ГАМК_B-рецепторы коры мозга мышей, и последующего радиолигандного связывания использовали модифицированные методы [13, 14].

Жидкостно-сцинтилляционная спектрометрия

Предварительно просушенные фильтры GF/B и GF/C ("Whatman", Германия) заливали 5 мл сцинтилляционной жидкости (4 г PPO и 0,2 г POPOP на 1 л толуола) и переносили во флаконы для сцинтилляционного счёта. Радиоактивность проб определяли на счетчике Tri-Carb 2900TR ("Perkin Elmer") с эффективностью счёта 42-46%.

Результаты экспериментов по радиолигандному связыванию *ex vivo* оценивали с помощью рассчитанных величин K_d и B_{\max} , отражающих степень сродства рецептора к лиганду (нМ) и количество мест связывания лиганда (фмоль/мг белка) соответственно. Концентрацию белка измеряли по стандартной методике Лоури [15]. Для анализа насыщения и получения характеристик связывания K_d и B_{\max} измеряли специфическое связывание для D_2 -рецепторов от 1,25 нМ до 40 нМ, для ГАМК_B-рецепторов — от 1,25 нМ до 20 нМ. Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Для построения кривых насыщения радиоактивных лигандов каждая концентрация исследуемого вещества была взята в 2 повторностях.

Высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД)

Содержание моноаминов и их метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД) на хроматографе LC-304T ("BAS", США) [16]. Выделенные структуры головного мозга мышей размельчали в гомогенизаторе "стекло-тефлон" (0,2 мм) при скорости вращения пестика 3000 об/мин. Гомогенизацию осуществляли в 0,1 М HClO_4 с добавлением в качестве внутреннего стандарта 3,4-диоксибензиламина (ДОБА) в количестве 0,5 нмоль/мл. Пробы центрифугировали при 9000 g и температуре 4°C в течение 10 мин. Надосадочную жидкость (20 мкл) методом прямой инъекции наносили на обращенно-фазную

колонку ReproSil-Pur, ODS-3, 4×100 мм, размер частиц 3 мкм (“Dr.Majsch GMBH”, ФРГ). Моноамины и их метаболиты разделяли на ВЭЖХ системе, снабжённой инжектором “Rheodyne 7125” и электрохимическим детектором (LC-4B, “BAS”). В качестве подвижной фазы использовали 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 0,3 мМ ионопарного агента октансульфоната натрия, 0,1 мМ ЭДТА и 8% ацетонитрила (рН 3,6). Определение ДА (дофамин), ДОФУК (3,4-диоксифенилуксусная кислота), 3-МТ (3-метокситирамин), ГВК (гомованилиновая кислота), НА (норадреналин), 5-ОТ (5-окситриптамиин, серотонин) и 5-ОИУК (5-оксииндолуксусная кислота) осуществляли на стеклоуглеродном электроде при потенциале 0,85 В против Ag/AgCl электрода сравнения. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,7 мл/мин. Регистрацию образцов осуществляли с помощью специального программного комплекса Мультихром 1,5 (“Амперсенд”, Россия). Для калибровки хроматографа в качестве стандарта для определения количества веществ в структурах мозга мышей использовали смеси рабочих растворов в концентрации 0,5 нмоль/мл. Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали исходя из отношений площадей пиков в стандартном и экспериментальных образцах.

Статистическая обработка

Для обработки результатов радиолигандного связывания использовали программу GraphPad Prism 7 Demo и Statistica 6.0. Результаты представлены в виде средних значений с учётом стандартной ошибки среднего ($\text{mean} \pm \text{SEM}$). Статистическую обработку экспериментальных данных поведенческого теста и ВЭЖХ-ЭД осуществляли с помощью программы Statistica 6.0. Различия между субпопуляциями и группами по изучаемым показателям считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе проведенного исследования исходная гетерогенная популяция аутбредных мышей CD-1 была разделена на 2 субпопуляции, различающиеся по уровню поддержания внимания к новым объектам окружающей среды в тесте ЗОКЛ (ED-High и ED-Low). Как и в ранее опубликованных работах [3-6], при поведенческом тестировании у выявленных подтипов ED-High и ED-Low не зарегистрировано статистически значимых различий показателей ЗОКЛ, связанных с исследовательской (F_{PtrN} и PatrlN) и двигательной (T_{ChTm} и T_{GlTm}) активностью, а также уровнем тревожности (F_{ChTm} и F_{GlTm}). Отмечено существенно более низкое (в 6 раз) значение индекса ED-ratio (Obj_tR), отражающего степень устойчивости внимания к объектам, в контрольной группе субпопуляции ED-Low с исходным дефицитом внимания по сравнению с мышами группы ED-High (табл. 1).

При анализе поведенческих эффектов ГИЖ-290 было установлено его нормализующее влияние

на исходный дефицит внимания у животных субпопуляции ED-Low во всём изучаемом диапазоне доз. Так, субхроническое внутрибрюшинное введение ГИЖ-290 в дозе 1 мг/кг улучшало показатель Obj_tR у животных опытной группы в 6 раз, в дозе 3 мг/кг в 4,8 раза, в дозе 5 мг/кг в 3 раза соответственно. Кроме того, при введении ГИЖ-290 в дозах 1 мг/кг и 3 мг/кг обнаруженное корректирующее действие производного рацетама имело избирательную направленность, поскольку у грызунов ED-High не изменялся индекс ED-ratio в сравнении с соответствующим контролем (табл. 1). При использовании ГИЖ-290 в дозе 5 мг/кг отмечено ухудшение индекса внимания в субпопуляции ED-High, в которой показатель Obj_tR снижался вдвое, а также происходило увеличение общего времени пребывания животных в боковых отсеках лабиринта (T_{GlTm}). Кроме того, несмотря на обнаруженную избирательность действия изучаемого вещества в отношении показателей внимания, в опытных группах обеих субпопуляций ГИЖ-290 в дозе 1 мг/кг отрицательно влиял на интенсивность обследования новой для животных окружающей среды, снижая двигательную активность и увеличивая тревожность. Таким образом, экспериментальное изучение поведенческих эффектов ГИЖ-290 позволяет сделать вывод об его эффективности в дозе 3 мг/кг/день, что сопоставимо с эффективностью атомоксетина гидрохлорида [4], являющегося препаратом выбора как в исследовательской деятельности, так и в клинической практике СДВГ.

В экспериментах по радиолигандному связыванию изучаемый препарат в дозе 3 мг/кг оказывал влияние на величину рецепторного связывания (B_{max}), отражающую плотность специфических мест связывания как дофаминовых D_2 , так и ГАМК_B-рецепторов, уменьшая её на 27% в случае $[G\text{-}^3H](\text{-})$ сульпирида и увеличивая на 27% для $[G\text{-}^3H](\text{-})$ баклофена (рис. 2). При этом препарат сравнения атомоксетин в дозе 3 мг/кг/день не приводил к значимым изменениям B_{max} для ГАМК_B-рецепторов в ПФК обоих фенотипов мышей, однако корректировал плотность D_2 -рецепторов исключительно в субпопуляции ED-Low [4]. Экспериментальные величины K_d , полученные для контрольных и опытных групп субпопуляций мышей CD-1, не отличались статистически достоверно для всех изучаемых подтипов рецепторов (табл. 2).

Анализ экспериментальных данных, полученных методом ВЭЖХ-ЭД, позволил установить следующие особенности содержания моноаминов и показателей их оборота в ПФК различных фенотипов мышей CD-1. У животных контрольной группы субпопуляции ED-Low общее содержание дофамина (ДА) было снижено в 2,3 раза по сравнению с ED-High. Статистически значимые отличия были обнаружены и для показателей ДОФУК/ДА и ГВК/ДА, отражающих интенсивность внутри- и внеклеточного метаболизма дофамина (табл. 3). Субхроническое введение ГИЖ-290 приводило к избирательной нормализации уровня ДА и соотношения ДОФУК/ДА в ПФК грызунов ED-Low, сопоставимой по значениям с контрольными показателями субпопуляции ED-High.

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И НЕЙРОРЕЦЕПТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ГИЖ-290

Таблица 1. Влияние субхронического введения изучаемых препаратов на показатели поведения субпопуляций аутбредных мышей CD-1 во 2-м тесте “закрытый обогащённый крестообразный лабиринт” (m±SEM)

| Показатель | Экспериментальная группа | ED-high (n) | ED-low (n) |
|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Ноотропная активность | | | |
| F_PtrN | Физраствор | 7,1±0,8 (16) | 7,2±0,6 (13) |
| | ГИЖ-290, 1 мг/кг | 9,1±0,8 (14) | 7,8±0,5 (16) |
| | ГИЖ-290, 3 мг/кг | 8,6±0,9 (14) | 9,3±0,7 [#] (15) |
| | ГИЖ-290, 5 мг/кг | 6,3±0,6 (15) | 7,1±0,5 (13) |
| PatrlN | Физраствор | 1,2±0,1 (16) | 1,1±0,2 (13) |
| | ГИЖ-290, 1 мг/кг | 0,9±0,2 (14) | 1,0±0,0 (16) |
| | ГИЖ-290, 3 мг/кг | 0,9±0,2 (14) | 0,7±0,2 (15) |
| | ГИЖ-290, 5 мг/кг | 1,5±0,1 (15) | 1,3±0,1 (13) |
| Тревожность | | | |
| F_ChTm | Физраствор | 6,5±0,4 (16) | 6,9±0,7 (13) |
| | ГИЖ-290, 1 мг/кг | 7,4±0,5 (14) | 7,5±0,2 (16) |
| | ГИЖ-290, 3 мг/кг | 8,0±0,6 (14) | 8,7±1,1 (15) |
| | ГИЖ-290, 5 мг/кг | 5,8±0,3 (15) | 5,5±0,2 (13) |
| F_GITm | Физраствор | 9,2±1,8 (16) | 9,6±1,3 (13) |
| | ГИЖ-290, 1 мг/кг | 18,1±2,8 [#] (14) | 12,7±1,8 [#] (16) |
| | ГИЖ-290, 3 мг/кг | 12,3±2,6 (14) | 10,1±1,0 (15) |
| | ГИЖ-290, 5 мг/кг | 11,1±2,1 (15) | 11,4±1,8 (13) |
| Двигательная активность | | | |
| T_ChTm | Физраствор | 58,3±3,6 (16) | 56,4±3,9 (13) |
| | ГИЖ-290, 1 мг/кг | 90,8±6,9 [#] (14) | 64,6±11,8 [#] (16) |
| | ГИЖ-290, 3 мг/кг | 52,3±3,5 (14) | 59,2±3,8 (15) |
| | ГИЖ-290, 5 мг/кг | 70,7±5,7 (15) | 74,1±11,8 (13) |
| T_GITm | Физраствор | 52,9±5,1 (16) | 64,3±7,6 (13) |
| | ГИЖ-290 1 мг/кг | 69,4±5,3 [#] (14) | 76,5±6,4 [#] (16) |
| | ГИЖ-290 3 мг/кг | 59±7,6 (14) | 66,3±4,4 (15) |
| | ГИЖ-290 5 мг/кг | 94,3±5,2 [#] (15) | 90,3±6,4 (13) |
| Индекс различения объектов | | | |
| Obj_tR | Физраствор | 354,2±21,8 (16) | 60,4±7,2* (13) |
| | ГИЖ-290, 1 мг/кг | 420,2±70,6 (14) | 388,9±17,3 [#] (16) |
| | ГИЖ-290, 3 мг/кг | 343,1±34,3 (14) | 363,1±50,1 [#] (15) |
| | ГИЖ-290, 5 мг/кг | 172,8±21,9 [#] (15) | 144,1±14,3 [#] (13) |

Примечание: * – статистически значимое отличие между субпопуляциями, *U*-критерий Манна-Уитни, *p*<0,05, # – статистически значимое отличие между контрольной и опытной группами, *U*-критерий Манна-Уитни, *p*<0,05.

Таблица 2. Влияние субхронического введения ГИЖ-290 (3 мг/кг, внутривенно) на показатели радиолигандного связывания *ex vivo* с рецепторами в префронтальной коре субпопуляций мышей CD-1 (m±SEM)

| Субпопуляции мышей CD-1 / Группа в эксперименте | Радиолиганд | | | |
|--|-----------------------------------|---------------------|-----------------------------------|---------------------|
| | [G- ³ H](-)сульпирид | | [G- ³ H](-)баклофен | |
| | Параметры связывания | | | |
| | B _{max} , фмоль/мг белка | K _d , нМ | B _{max} , фмоль/мг белка | K _d , нМ |
| Контроль / ED-high | 635±41 | 42,4±4,4 | 190±7,0 | 47,4±2,3 |
| ГИЖ-290 / ED-high | 486±11 [#] | 43,4±1,6 | 167±4,9 | 49,5±1,9 |
| Контроль / ED-low | 792±45* | 46,6±1,8 | 139±4,0* | 44,9±1,9 |
| ГИЖ-290 / ED-low | 578±34 [#] | 43,5±4,1 | 177±8,0 [#] | 40,0±2,5 |

Примечание: * – статистически значимое отличие между субпопуляциями, *F*-критерий Фишера, *p*<0,05, # – статистически значимое отличие между контрольной и опытной группами, *F*-критерий Фишера, *p*<0,05.

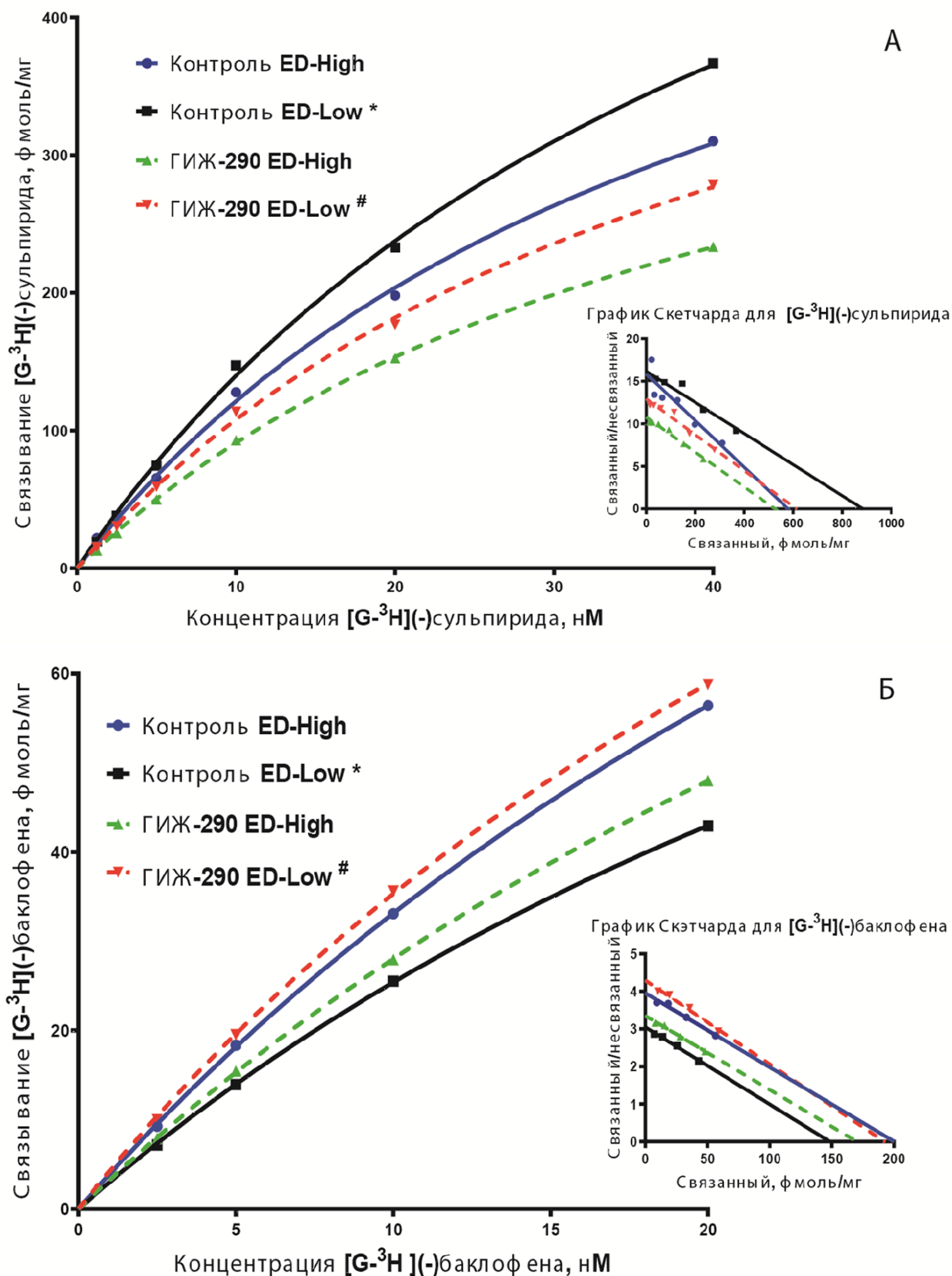


Рисунок 2. Влияние субхронического введения ГИЖ-290 (3 мг/кг) на радиолигандное связывание $[G-^3H](-)$ сульпирида с D_2 -рецепторами (А), $[G-^3H](-)$ баклофена с ГАМК_B-рецепторами (Б) префронтальной коры головного мозга субпопуляций мышей линии CD-1 *ex vivo* (кривая насыщения и график Скэтчарда); * – статистически значимое отличие между субпопуляциями, *F*-критерий Фишера, $p < 0,05$; # – статистически значимое отличие между контрольной и опытной группами, *F*-критерий Фишера, $p < 0,05$.

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И НЕЙРОРЕЦЕПТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ГИЖ-290

Таблица 3. Влияние субхронического введения ГИЖ-290 (3 мг/кг, внутривбрюшинно) на содержание моноаминов, их метаболитов и показателей оборота в префронтальной коре субпопуляций мышей CD-1 (нмоль/г ткани, $m \pm SEM$)

| Показатель/ Группа в эксперименте | Контроль ED-High | ГИЖ-290 ED-High | Контроль ED-Low | ГИЖ 290 ED-Low |
|---------------------------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------------------|
| Моноамины и их метаболиты | | | | |
| НА | 1,71 \pm 0,10 | 1,65 \pm 0,10 | 1,56 \pm 0,07 | 1,71 \pm 0,10 |
| ДА | 1,83 \pm 0,47 | 1,59 \pm 0,44 | 0,78 \pm 0,14* | 1,65 \pm 0,26 [#] |
| ДОФУК | 0,44 \pm 0,09 | 0,43 \pm 0,06 | 0,38 \pm 0,05 | 0,37 \pm 0,08 |
| 3-МТ | 0,06 \pm 0,019 | 0,06 \pm 0,01 | 0,05 \pm 0,004 | 0,06 \pm 0,008 |
| ГБК | 0,75 \pm 0,13 | 0,72 \pm 0,09 | 0,68 \pm 0,10 | 0,81 \pm 0,12 |
| 5-НТ | 2,01 \pm 0,17 | 1,88 \pm 0,16 | 1,93 \pm 0,14 | 2,0 \pm 0,14 |
| 5-ГИУК | 0,9 \pm 0,14 | 0,77 \pm 0,09 | 0,67 \pm 0,12 | 1,14 \pm 0,10 [#] |
| Моноамины и показатели оборота | | | | |
| ДОФУК /ДА | 0,30 \pm 0,06 | 0,48 \pm 0,10 | 0,65 \pm 0,09* | 0,29 \pm 0,05 [#] |
| ГБК/ДА | 0,54 \pm 0,09 | 0,59 \pm 0,10 | 1,07 \pm 0,35* | 0,82 \pm 0,20 |
| 5-ОИУК/5-ОТ | 0,44 \pm 0,05 | 0,40 \pm 0,02 | 0,42 \pm 0,03 | 0,44 \pm 0,026 |

Примечание: * – статистически значимое отличие между субпопуляциями, *U*-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$; # – статистически значимое отличие между контрольной и опытной группами, *U*-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$.

Основными предпосылками для изучения нового производного 4-фенилпирролидона соединения ГИЖ-290 (2,6-диметиланилид (2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил) уксусной кислоты) в тесте на определение его влияния на устойчивость внимания (ЗОКЛ) стали следующие положения: (1) вещество относится к производным рацетам, некоторые из которых (пирацетам [3]) подобно другим ноотропным препаратам (пантогам [4], фенибут [5], семакс [6]) проявляют избирательную эффективность в отношении дефицита внимания в апробированной нами модели [9]; (2) ГИЖ-290 обладает выраженной противосудорожной активностью, при этом улучшает как процесс обучения, так и воспроизведения навыка в водном лабиринте Морриса, а в тесте закрытый крестообразный лабиринт не усиливает тревожность, что в совокупности выгодно отличает его от эффекта препарата сравнения — антиконвульсанта леветирацетама (Кеппра®) [7, 17]; (3) функциональной мишенью противосудорожного действия ГИЖ-290 являются ГАМК_B-рецепторы префронтальной коры мозга [18], впервые охарактеризованные нами в качестве потенциальных маркеров при коррекции уровня внимания [9].

В базовом тесте ЗОКЛ изучаемое вещество в результате 6-кратного введения в дозах 1 мг/кг/сутки, 3 мг/кг/сутки и 5 мг/кг/сутки повышало показатель Obj_tR в субпопуляции с исходно низким уровнем внимания ED-Low, однако наибольшая доза оказывала воздействие и в субпопуляции ED-High. Избирательный поведенческий эффект ГИЖ-290 (3 мг/кг/сутки) сопровождался селективностью действия в отношении рецепторов ГАМК_B-подтипа, плотность которых повышалась до уровней, характерных для мышей ED-High. Таким образом, активация баклофен-чувствительных ГАМК-рецепторов ПФК, отмечаемая при изучении противосудорожного действия ГИЖ-290 [18], воспроизвелась и на модели дефицита внимания. Это может служить дополнительным свидетельством о существовании определенной патогенетической взаимосвязи между синдромом дефицита внимания и судорожными расстройствами, которая наблюдается в клинике [19].

Существуют несколько гипотез, объясняющих эту коморбидность, включающие схожесть генетической предрасположенности и общность патофизиологии. Моделирование СДВ на животных предполагает, что в основе может лежать как аномальность в глутаматергической нейротрансдукции, так и моноаминергическая дисфункция [20-22], поскольку СДВ ассоциируют с дефицитом серого вещества коры мозга, при котором возникает снижение дофаминовой стимуляции, влекущее за собой разрушение нормальных механизмов синаптической пластичности [23].

В наших экспериментах ослабление катехоламинергического компонента в проявлении дефицита внимания у животных ED-Low проявлялось в компенсаторном повышении плотности D₂-рецепторов, ускорении метаболического оборота внутриклеточного (ДА/ДОФУК) и внеклеточного (ДА/ГБК) дофамина. Все эти показатели нормализовались после субхронического введения ГИЖ-290.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, новое производное рацетам ГИЖ-290 (2,6-диметиланилид (2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил) уксусной кислоты), обладающее выраженной противосудорожной активностью, показало себя перспективным средством для избирательной коррекции состояния дефицита внимания. Механизм действия ГИЖ-290 заключается в нормализации рецепторного и метаболического компонентов дофаминергической функции, а также в вовлечении новой функциональной мишени для СДВ — ГАМК_B-рецепторов префронтальной коры мозга.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 0521-2019-0009 “Анализ рецепторных механизмов и поиск средств фармакологической протекции ЦНС при нарушениях мозгового кровообращения и когнитивных расстройствах”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Организация экспериментов соответствовала этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных (Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях: EST № 123 от 18 марта 1986 г, Страсбург; “Правила надлежащей лабораторной практики”, утверждённые приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016). Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 33215-2014 и 33216-2014). Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике НИИ фармакологии имени В.В. Закусова.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Faraone S.V., Banaschewski T., Coghill D., Zheng Y., Biederman J., Bellgrove M.A., Newcorn J.H., Gignac M., Al Saud N.M., Manor I., Rohde L.A., Yang L., Cortese S., Almagor D., Stein M.A., Albatti T.H., Aljoudi H.F., Alqahtani M.M.J., Asherson P., Atwoli L., Bölte S., Buitelaar J.K., Crunelle C.L., Daley D., Dalsgaard S., Döpfner M., Espinet S., Fitzgerald M., Franke B., Gerlach M., Haavik J., Hartman C.A., Hartung C.M., Hinshaw S.P., Hoekstra P.J., Hollis C., Kollins S.H., Kooij J.J.S., Kuntsi J., Larsson H., Li T., Liu J., Merzon E., Mattingly G., Mattos P., McCarthy S., Mikami A.Y., Molina B.S.G., Nigg J.T., Purper-Ouakil D., Omigbodun O.O., Polanczyk G.V., Pollak Y., Poulton A.S., Rajkumar R.P., Reding A., Reif A., Rubia K., Rucklidge J., Romanos M., Ramos-Quiroga J.A., Schellekens A., Scheres A., Schoeman R., Schweitzer J.B., Shah H., Solanto M.V., Sonuga-Barke E., Soutullo C., Steinhausen H.-C., Swanson J.M., Thapar A., Tripp G., Glind G., Brink W., Oord S., Venter A., Vitiello B., Walitza S., Wang Y. (2021) The World Federation of ADHD International Consensus Statement: 208 Evidence-based conclusions about the disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **128**, 789-818. DOI:10.1016/j.neubiorev.2021.01.022
2. Posner J., Polanczyk G.V., Sonuga-Barke E. (2020) Attention-deficit hyperactivity disorder. *The Lancet*, **395**(10222), 1-13. DOI:10.1016/S0140-6736(19)33004-1
3. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Кондрахин Е.А., Васильева Е.В., Салимов Р.М. (2021) Влияние пирacetама на рецепторные системы мозга мышей CD-1 с разным фенотипом устойчивости внимания. *Химико-фармацевтический журнал*, **55**(8), 10-14. [Kovalev G.I., Sukhorukova N.A., Kondrakhin E.A., Vasil'eva E.V., Salimov R.M. (2021) Influence of piracetam on the brain receptor systems in CD-1 mice with different attention stability phenotypes. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **55**(8), 10-14.] DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-8-10-14.
4. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Васильева Е.В., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М. (2021) Влияние пантогама и атомоксетина на устойчивость внимания и распределение дофаминовых D₂ и ГАМК_B-рецепторов у мышей с моделью дефицита внимания. *Биомедицинская химия*, **67**(5), 402-410. [Kovalev G.I., Sukhorukova N.A., Vasil'eva E.V., Kondrakhin E.A., Salimov R.M. (2021) Pantogam and atomoxetine influence on attention stability and distribution of dopamine D₂ and GABA_B receptors in attention deficit mouse model. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **67**(5), 402-410.] DOI: 10.18097/PBMC20216705402
5. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Васильева Е.В., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М. (2021) Анализ поведенческих и нейрорецепторных эффектов атомоксетина и фенибута у мышей CD-1 с различной устойчивостью внимания. *Экспериментальная и клиническая фармакология*, **84**(4), 3-11. [Kovalev G.I., Sukhorukova N.A., Vasil'eva E.V., Kondrakhin E.A., Salimov R.M. (2021) Analysis of behavioral and neuroreceptor effects of atomoxetine and phenibut in CD-1 subpopulations diverging in sustained attention. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*, **84**(4), 3-11.] DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-4-3-11
6. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Кондрахин Е.А., Васильева Е.В., Салимов Р.М. (2021) Субхроническое введение семакса повышает устойчивость внимания у мышей CD-1 через модуляцию D₂-дофаминовых рецепторов префронтальной коры мозга. *Экспериментальная и клиническая фармакология*, **84**(6), 3-10. [Kovalev G.I., Sukhorukova N.A., Kondrakhin E.A., Vasil'eva E.V., Salimov R.M. (2021) Subchronic administration of semax increases attention stability in CD-1 mice via modulation D₂-dopamine receptors in the prefrontal cortex. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*, **84**(6), 3-10.] DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-6-3-10
7. Ковалёв И.Г., Воронина Т.А., Литвинова С.А., Жмуренко Л.А., Мокров Г.В. (2017) Сравнение противосудорожных и мнемотропных свойств новых производных 4-фенилпирролидона, леветирacetама и пирacetама. *Экспериментальная и клиническая фармакология*, **80**(6), 13-18. [Kovalev I.G., Voronina T.A., Litvinova S.A., Zhmurenko L.A., Mokrov G.V. (2017) Comparison of the anticonvulsant and mnemotropic properties of new derivatives of 4-phenylpyrrolidone, levetiracetam and piracetam, in outbred mice and rats. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*, **80**(6), 13-18.] DOI: 10.30906/0869-2092-2017-80-6-13-18
8. Salimov R.M., Kovalev G.I. (2013) Effect of atomoxetine on behavior of outbred mice in the enrichment discrimination test. *J. Behav. Brain Sci.*, **3**(2), 210-216. DOI: 10.4236/jbbs.2013.32022
9. Ковалёв Г.И., Салимов Р.М., Сухорукова Н.А., Кондрахин Е.А., Васильева Е.В. (2020) Нейрорецепторный профиль и поведение субпопуляций мышей CD-1, различающихся устойчивостью внимания. *Нейрохимия*, **37**(1), 1-9. [Kovalev G.I., Salimov R.M., Sukhorukova N.A., Kondrakhin E.A., Vasileva E.V. (2020) Neuroreceptor profile and behavior of CD-1 mice subpopulations with different attention stability. *Neurochemical Journal*, **37**(1), 1-9.] DOI: 10.31857/S1027813320010148
10. Iversen L.L., Glowinski J. (1966) Regional studies of catecholamines in the rat brain. II. Rate of turnover of catecholamines in various brain regions. *J. Neurochemistry*, **13**(8), 671-682. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1966.tb09874.x
11. Breese C.R., Marks M.J., Logel J., Adams C.E., Sullivan B., Collins A.C., Leonard S. (1997) Effect of smoking history on [³H]nicotine binding in human postmortem brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**(1), 7-13.

12. Sun W., Ginovart N., Ko F., Seeman P., Kapur S. (2003) *In vivo* evidence for dopamine-mediated internalization of D₂-receptors after amphetamine: Differential findings with [³H]raclopride versus [³H]spiperone. *Mol. Pharmacol.*, **63**(2), 456-462. DOI: 10.1124/mol.63.2.456
13. Bowers N.G., Hill D.R., Hudson A.L. (1985) [³H](-)Baclofen: improved ligand for GABA_B sites. *Neuropharmacology*, **24**(3), 207-210. DOI: 10.1016/0028-3908(85)90075-9
14. Szekeley A.M., Barbaccia M.L., Costa E. (1987) Effect of a protracted antidepressant treatment on signal transduction and [³H](-)baclofen binding at GABA_B receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **243**(1), 155-159.
15. Waterborg J.H., Matthews H.R. (1984) The Lowry method for protein quantitation. *Methods Mol. Biol.*, **1**, 1-3. DOI: 10.1385/0-89603-062-8:1
16. Кудрин В.С., Мирошниченко И.И., Раевский К.С. (1988) Различия в механизмах ауторецепторной регуляции биосинтеза и высвобождения дофамина в подкорковых структурах головного мозга крыс. *Нейрохимия*, **7**(1), 3-10. [Kudrin V.S., Miroshnichenko I.I., Rayevsky K.S. (1988) Difference in the mechanism of the autoreceptor regulation of dopamine release and biosynthesis in rat brain subcortical regions. *Neurochemical Journal*, **7**(1), 3-10.]
17. Ковалев И.Г., Васильева Е.В., Боков Р.О., Салимов Р.М., Ковалев Г.И. (2017) Изучение эффектов леветиретама и нового производного 4-фенилпирролидона ГИЖ-290 в закрытом крестообразном лабиринте у мышей линий BALB/c и C57BL/6. *Фармакокинетика и фармакодинамика*, **2**, 25-29. [Kovalev I.G., Vasileva E.V., Bokov R.O., Salimov R.M., Kovalev G.I. (2017) Effects of levetiracetam and a new derivative of 4-phenylpyrrolidone GIZh-290 in a closed cross maze in BALB/c and C57BL/6 mice. *Farmakokinetika i Farmakodinamika*, **2**, 25-29.]
18. Ковалев И.Г., Васильева Е.В., Кондрахин Е.А., Воронина Т.А., Ковалев Г.И. (2017) Участие глутаматных и ГАМК-рецепторов в противосудорожном эффекте леветиретама и производного 4-фенилпирролидона (ГИЖ-290) у крыс. *Нейрохимия*, **34**(4), 335-343. [Kovalev I.G., Vasileva E.V., Kondrakhin E.A., Voronina T.A., Kovalev G.I. (2017) The role of glutamate and GABA receptors in the anticonvulsive effects of levetiracetam and a 4-phenylpyrrolidone derivative (GIZh-290) in rats. *Neurochemical Journal*, **34**(4), 335-343.] DOI: 10.7868/S1027813317040057
19. Verrotti A., Moavero R., Panzarino G., di Paolantonio C., Rizzo R., Curatolo P. (2018) The challenge of pharmacotherapy in children and adolescents with epilepsy-ADHD comorbidity. *Clin. Drug. Investig.*, **38**(1), 1-8. DOI: 10.1007/s40261-017-0585-1
20. Jensen V., Rinholm J.E., Johansen T.J., Medin T., Storm-Mathisen J., Sagvolden T., Hvalby O. et al. (2009) N-methyl-D-aspartate receptor subunit dysfunction at hippocampal glutamatergic synapses in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuroscience*, **158**(1), 353-364. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.05.016
21. Howells F.M., Russell V.A. (2008) Glutamate-stimulated release of norepinephrine in hippocampal slices of animal models of attention-deficit/hyperactivity disorder (spontaneously hypertensive rat) and depression/anxiety-like behaviours (Wistar-Kyoto rat). *Brain Res.*, **1200**, 107-115. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.01.033
22. Gilby K.L. (2008) A new rat model for vulnerability to epilepsy and autism spectrum disorders. *Epilepsia*, **49**(Suppl. 8), 108-110. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2008.01851.x
23. Seimon L.D. (2014) Frontal lobe synaptic plasticity in development and disease: modulation by the dopamine D₁ receptor. *Curr. Pharm. Des.*, **20**(32), 5194-5201. DOI: 10.2174/1381612819666140110122307

Поступила в редакцию: 16. 06. 2022.
После доработки: 11. 10. 2022.
Принята к печати: 12. 10. 2022.

BEHAVIORAL AND NEURORECEPTOR EFFECTS OF THE RACETAM DERIVATIVE GIZh-290 IN MOUSE EXPERIMENTAL ATTENTION DEFICIT MODEL

G.I. Kovalev*, N.A. Sukhorukova, E.V. Vasileva, E.A. Kondrakhin, R.M. Salimov, V.B. Narkevich, V.S. Kudrin

Zakusov Research Institute of Pharmacology,
8 Baltiyskaya str., Moscow, 125315 Russia; *e-mail: kovalev@academpharm.ru

Behavioral and neurochemical effects of the new racetam derivative GIZh-290 were studied in a mouse attention deficit model (the ED-Low animals subpopulation selected during preliminary behavioral typing in the “closed enriched cross maze” test). Subchronic administration of GIZh-290 (1 mg/kg, 3 mg/kg and 5 mg/kg, intraperitoneally, for 6 days), increased the initially low level of attention in ED-Low animals; the highest selectivity was observed at a dose of 3 mg/kg. Radioligand analysis showed that at this dose, the drug changed density (B_{max}) of D₂ and GABA_B receptors as markers in the pre-frontal cortex of the ED-Low subpopulation to B_{max} values observed in the ED-High subpopulation. In the prefrontal cortex of the ED-Low rodents treated with GIZh-290 in dose of 3 mg/kg, there was a normalization of tissue concentrations of both dopamine itself (DA) and its intra- and extracellular metabolites (DOPA/DA and HVA/DA). The obtained results indicate the effectiveness of the studied drug for pharmacotherapy of attention deficit in experimental modeling and impact on potential molecular targets identified in the study.

Key words: attention deficit; GIZh-290; “closed enriched cross maze”; D₂-receptor; GABA_B-receptor; HPLC-ED

Funding. The study was performed as a part of the State Assignment no. 0521-2019-009 “Analysis of receptor mechanisms and search for pharmacological protection of the central nervous system in the case of cerebrovascular and cognitive disorders”.

Received: 16.06.2022; revised: 11.10.2022; accepted: 12.10.2022.