

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2016

М. А. Яркова, Г. В. Мокров, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин

АНКСИОЛИТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ОРИГИНАЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛО[1,2-*a*]ПИРАЗИНА, ЛИГАНДОВ TSPO, ЗАВИСИТ ОТ БИОСИНТЕЗА НЕЙРОСТЕРОИДОВ

ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова”, Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8;
e-mail: doctorpharm@mail.ru

В ряду синтезированных в ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” оригинальных производных пирроло[1,2-*a*]пиперазина, лигандов 18 кДа транслокаторного белка (TSPO) выявлены соединения *N*-бензил-*N*-метил-1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиперазин-3-карбоксамид (ГМЛ-1) и *N*-бутил-*N*-метил-1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиперазин-3-карбоксамид (ГМЛ-3), обладающие, при высокой аффинности к TSPO, выраженной анксиолитической активностью. Экспериментами в приподнятом крестообразном лабиринте установлено, что анксиолитический эффект ГМЛ-1 и ГМЛ-3 полностью блокируется ингибиторами ферментов нейростероидогенеза трилостаном и финастеридом.

Ключевые слова: 18 кДа транслокаторный белок; анксиолитическая активность; пирроло[1,2-*a*]пиперазины; нейростероиды.

Из литературы известно, что 18 кДа транслокаторный белок (TSPO) является перспективной мишенью для создания новых препаратов, обладающих широким спектром нейрорепродуктивной активности, в том числе анксиолитической, антидепрессивной, ноотропной и нейропротективной [1].

TSPO локализован на мембране митохондрий стероидпродуцирующих тканей центральной и периферической нервной системы и образует тройной комплекс с вольтаж-зависимым анионным каналом массой 32 кДа (VDAC) и переносчиком адениннуклеотида (ANC) массой 30 кДа [2]. TSPO выполняет ключевую роль в транспорте холестерина с внешней на внутреннюю мембрану митохондрий, что является лимитирующей стадией биосинтеза нейростероидов [1]. Внутри мембраны холестерин под действием фермента P450_{ssc} превращается в прегненолон, который затем диффундирует в цитоплазму. Дальнейший каскад ферментативных реакций, представленных на рисунке, приводит к образованию нейростероидов, включая аллопрегненолон [1].

Нейростероиды являются положительными аллостерическими модуляторами ГАМК_A-рецептора, роль которого в патофизиологии нервной системы хорошо известна [3]. ГАМК_A-рецептор — гетеромерный белковый комплекс, помимо участка связывания нейромедиатора ГАМК содержит несколько сайтов, опосредующих взаимодействие с различными модуляторами. Лигандное связывание ГАМК увеличивает частоту открытия хлорного канала, вызывая гиперполяризацию и тормозное действие. Положительные модуляторы ГАМК_A-рецептора также стимулируют транспорт ионов хлора в нейрон, что определяет их нейрорепро-

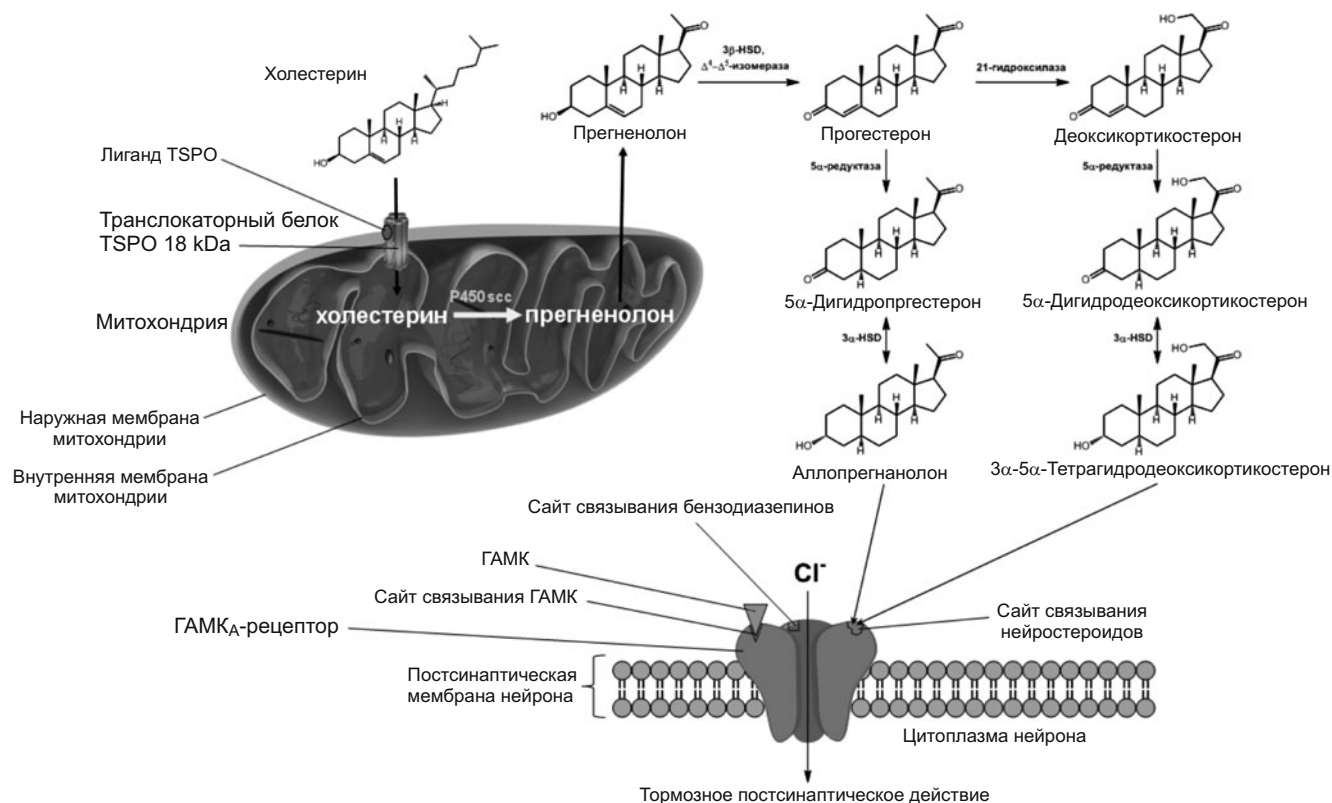
дуктивное влияние. Так, например, бензодиазепиновые транквилизаторы имеют одноименный сайт связывания на ГАМК_A-рецепторе, который располагается в области границы α и γ -субъединиц.

Связывание нейростероидов происходит на границе трансмембранных доменов α и β -субъединиц [4]. Взаимодействуя с ГАМК_A-рецептором, нейростероиды вызывают анксиолитический и другие нейрорепродуктивные эффекты [5, 6].

Ввиду быстрого метаболизма фармакологическое применение аналогов эндогенных нейростероидов ограничено [7]. Поэтому представляется обоснованной задача использования физиологического потенциала нейростероидных гормонов путем стимуляции их синтеза при регуляторном воздействии лигандов на TSPO [1].

Ранее нами была сконструирована и синтезирована группа оригинальных лигандов TSPO, относящихся к классу 1-арилпирроло[1,2-*a*]пиперазин-3-карбоксамидов [8]. Исследование с использованием тестов (“открытое поле” в модификации П. М. Бородина [9] и приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ) у грызунов) выявило анксиолитическую активность у ряда соединений [10, 11]. Наиболее эффективными оказались соединения ГМЛ-1 (*N*-бензил-*N*-метил-1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиперазин-3-карбоксамид) и ГМЛ-3 (*N*-бутил-*N*-метил-1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиперазин-3-карбоксамид), не уступавшие в обоих тестах в интервале доз от 0,1 до 1,0 мг/кг внутрибрюшинно анксиолитической активности диазепам в дозе 1,0 мг/кг.

Радиолигандным методом в экспериментах *in vitro* была продемонстрирована высокая аффинность соединений ГМЛ-1 и ГМЛ-3 по отношению к TSPO. Значения IC₅₀ для ГМЛ-1 и ГМЛ-3 составили $5,4 \cdot 10^{-8}$ и



Механизм нейростероидогенеза и тормозного влияния нейростероидов при лигандном воздействии на TSPO. Лиганд TSPO стимулирует транспорт холестерина с внешней на внутреннюю мембрану митохондрии. Под действием фермента P450_{scc}, расщепляющего боковую цепь холестерина, образуется прегненолон, который диффундирует в цитоплазму. Ферменты 3β-HSD (3β-гидроксистероиддегидрогеназа) и Δ⁴-Δ⁵-изомераза трансформируют прегненолон в прогестерон, который с участием 21-гидроксилазы превращается в деоксикортикостерон. 5α-редуктаза восстанавливает прогестерон и деоксикортикостерон в 5α-дигидропрогестерон и 5α-дигидродеоксикортикостерон. Последние трансформируются в аллопрегнанолон и 3α,5α-тетрагидродеоксикортикостерон соответственно под действием 3α-HSD (3α-гидроксистероиддегидрогеназы). Нейростероиды имеют собственный сайт связывания на ГАМК_A-рецепторе, их модулирующее влияние на ГАМК трансмиссию приводит к усилению тока ионов хлора внутрь нейрона и к тормозному постсинаптическому эффекту.

$5,6 \cdot 10^{-7}$ М соответственно (IC₅₀ для эталонного лиганда TSPO — соединения РК11195 (1-(2-хлорфенил)-N-метил-N-(1-метилпропил)-3-изохинолинкарбоксамид) — составляет $1,1 \cdot 10^{-8}$ М) [10].

Далее с применением селективного блокатора TSPO — соединения РК11195 нами доказана вовлеченность транслокаторного белка TSPO в механизм анксиолитического действия новых соединений. Установлено, что РК11195 полностью блокировал анксиолитический эффект соединений ГМЛ-1 и ГМЛ-3 [11].

Задачей данной работы явилось проведение исследований, подтверждающих зависимость анксиолитического действия ГМЛ-1 и ГМЛ-3 от биосинтеза нейростероидов.

Экспериментальная часть

Соединения ГМЛ-1 и ГМЛ-3 были синтезированы в ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” в соответствии с описанной нами ранее методикой [11].

Трилостан и финастерид получены в компании Sigma-Aldrich (США). Диазепам в виде раствора для инъекций “Релиум” получен в компании Polfa (Польша).

Соединения ГМЛ-1, ГМЛ-3 и диазепам готовили в виде суспензии с Твин-80 и дистиллированной водой и вводили внутривенно. Трилостан и финастерид готовили в виде суспензии с Твин-80 и дистиллированной водой и вводили подкожно.

В исследовании использованы беспородные мыши-самцы CD-1 массой 19 – 25 г. Животные получены из питомника лабораторных животных “Пушино” при филиале Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, содержались в условиях лабораторного вивария в контролируемых условиях окружающей среды (20 – 22 °С и 30 – 70 % относительная влажность, 12-часовой цикл освещения, 10-кратная смена объема воздуха комнаты в 1 ч) в пластмассовых клетках с верхней крышкой из нержавеющей стали с обеспыленной подстилкой из деревянной стружки по 20 мышей в каждой клетке при постоянном доступе к экструдированному брикетированному корму ГОСТ Р 50258-92 [1993] и питьевой воде. Животных распределяли по группам рандомизированно, по критерию массы тела, с отклонением от среднего значения не более чем на ± 10 %. Перед опытом животных выдерживали в экспериментальной комнате в “домашних” клетках в течение 24 ч. При работе с животными соблюдались требования, сформулирован-

ные в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

Исследование влияния ингибиторов ферментов биосинтеза нейростероидов трилостана и финастерида на анксиолитическую активность соединений ГМЛ-1 и ГМЛ-3 проводили в тесте ПКЛ согласно Lister R. G. (1987) [12].

ГМЛ-1 и ГМЛ-3 изучали в дозах 0,5 мг/кг (внутрибрюшинно), выбранных по результатам предыдущих экспериментов [10], трилостан и финастерид вводили подкожно в дозе 10 мг/кг, препарат сравнения диазепам вводили внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг. В эксперименте использовали следующие группы: 1) контрольная группа; 2) группа “ГМЛ-1/ГМЛ-3”; 3) группа “диазепам”; 4) группа “трилостан”; 5) группа “трилостан + ГМЛ-1/ГМЛ-3”; 6) группа “трилостан + диазепам”; 7) группа “финастерид”; 8) группа “финастерид + ГМЛ-1/ГМЛ-3”; 9) группа “финастерид + диазепам”. В каждой группе использовали по 8 животных. ГМЛ-1/ГМЛ-3 и диазепам вводили за 30 мин до эксперимента. Трилостан и финастерид вводили за 60 мин до эксперимента. Контрольным животным внутрибрюшинно вводили дистиллированную воду.

Статистическую обработку полученных результатов проводили, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA, критерий Краскела — Уоллиса) и непараметрический анализ для независимых переменных (*U*-критерий Манна — Уитни).

Результаты и их обсуждение

Установлено, что соединения ГМЛ-1 и ГМЛ-3 в дозах 0,5 мг/кг обладают выраженным анксиолитическим действием в тесте ПКЛ, достоверно увеличивая время пребывания мышей CD-1 в открытых рукавах, уменьшая время пребывания в закрытых рукавах, увеличивая время (%) пребывания в открытых рукавах по отношению к суммарному времени в открытых и закрытых рукавах лабиринта, увеличивая число заходов в открытые рукава и увеличивая число (%) заходов в открытые рукава по отношению к суммарному числу заходов в открытые и закрытые рукава лабиринта по сравнению с контрольной группой (таблица). Трилостан и финастерид в дозах 10 мг/кг, сами по себе не проявляющие каких-либо эффектов в сравнении с контролем, полностью блокировали анксиолитическое действие соединений ГМЛ-1 и ГМЛ-3, изменяя все основные показатели теста ПКЛ до контрольных значений. В свою очередь в аналогичных условиях трилостан и финастерид никак не влияли на анксиолитическую активность диазепама, что выражалось в сохранении всех показателей теста ПКЛ на уровне эффектов диазепама без введения ингибиторов (таблица).

Таким образом установлено, что трилостан, ингибитор фермента 3 β -HSD (3 β -гидроксистероиддегидрогеназы) [13] и финастерид, ингибирующий фермент 5 α -редуктазу [14] (рисунок), блокируют анксиолитические эффекты ГМЛ-1 и ГМЛ-3 в тесте ПКЛ, что до-

Влияние ингибиторов ферментов биосинтеза нейростероидов на анксиолитическую активность соединений ГМЛ-1 и ГМЛ-3 в тесте ПКЛ у мышей CD-1 при внутрибрюшинном введении

Экспериментальная группа	Время, с		Число заходов в		Время в открытых рукавах/сумма времени в открытых и закрытых рукавах, %	Число заходов в открытые рукава/число заходов в открытые и закрытые рукава, %
	в открытых рукавах	в закрытых рукавах	открытые рукава	закрытые рукава		
Контроль	9,50 (14,93)	148,75 (30,56)	0,75 (0,71)	7,75 (1,67)	6,26 (10,75)	8,23 (7,36)
ГМЛ-1 (0,5 мг/кг)	56,13** (15,07)	79,38** (17,32)	3,50*** (0,93)	8,13 (2,64)	41,28** (6,43)	31,42*** (11,47)
ГМЛ-3 (0,5 мг/кг)	50,13** (13,16)	91,88** (25,00)	3,13*** (0,64)	7,50 (2,07)	35,72** (8,85)	30,42*** (9,68)
Диазепам (1 мг/кг)	54,00** (12,88)	75,63** (14,14)	3,50*** (0,93)	7,38 (1,85)	41,49** (6,45)	32,83*** (10,35)
Трилостан (10 мг/кг)	9,38 (12,20)	131,63 (12,61)	0,63 (0,74)	6,50 (1,60)	5,89 (7,61)	7,18 (7,88)
Трилостан (10 мг/кг) + ГМЛ-1 (0,5 мг/кг)	8,50# (13,14)	135,38# (26,69)	0,75# (0,89)	6,63 (1,41)	5,37### (7,93)	8,85# (10,93)
Трилостан (10 мг/кг) + ГМЛ-3 (0,5 мг/кг)	20,13^ (22,16)	147,88^ (53,15)	1,13^ (0,99)	6,13 (1,89)	12,58^ (12,35)	15,52^ (10,90)
Трилостан (10 мг/кг) + диазепам (1 мг/кг)	59,00** (21,20)	109,75* (32,74)	4,25*** (1,04)	6,75 (1,67)	35,58* (14,73)	38,95*** (8,29)
Финастерид (10 мг/кг)	11,00 (6,50)	117,38* (18,24)	1,00 (0,53)	6,75 (2,31)	8,72 (4,85)	12,60 (5,71)
Финастерид (10 мг/кг) + ГМЛ-1 (0,5 мг/кг)	12,88### (11,76)	132,75 (48,51)	1,38### (0,92)	7,63 (1,30)	10,57### (9,97)	15,05# (10,44)
Финастерид (10 мг/кг) + ГМЛ-3 (0,5 мг/кг)	9,75^^ (6,69)	145,25^^ (27,30)	1,25^^ (0,46)	7,88 (1,46)	5,98^^ (3,33)	13,91^^ (5,31)
Финастерид (10 мг/кг) + диазепам (1 мг/кг)	47,88** (11,13)	92,13* (21,91)	3,38** (1,06)	7,50 (3,82)	34,66* (8,51)	33,46** (11,81)

Данные представлены в виде M(SD), где M — среднее арифметическое; SD — стандартное отклонение; в каждой группе было по 8 животных; **p* < 0,05, ***p* < 0,001, ****p* < 0,0001 по сравнению с группой “Контроль”; #*p* < 0,05, ##*p* < 0,001, ###*p* < 0,0001 по сравнению с группой “ГМЛ-1”; ^*p* < 0,05, ^^*p* < 0,001, ^^*p* < 0,0001 по сравнению с группой “ГМЛ-3” (*U*-критерий Манна — Уитни).

казывает вовлеченность нейростероидов в механизм анксиолитической активности новых лигандов TSPO.

Еще в сороковых годах прошлого века Г. Селье продемонстрировал быстрое угнетающее действие прегнановых стероидов на ЦНС, что по временному интервалу исключает геномное действие [15]. Молекулярный механизм, лежащий в основе этого эффекта, опосредованный ГАМК_A рецептором, доказали в работе [16]. Поскольку белок-транслокатор (18 кДа) (TSPO) играет важную роль в процессе синтеза нейростероидов, очевидно его значение в качестве новой фармакологической мишени для разработки соединений с анксиолитическими свойствами [2].

За последние 2 десятилетия синтезированы и фармакологически изучены несколько лигандов TSPO. Производное бензоксазина этифоксин был первым лигандом TSPO, для которого анксиолитическое действие подтверждено в клиническом исследовании [17]. Этифоксин усиливал тоническое торможение в гипоталамических нейронах, опосредованное внесинаптическими ГАМК_A рецепторами, его влияние частично подавлялось ингибитором 5 α -редуктазы финастеридом [18]. Это наблюдение согласовывалось с независимым от надпочечников повышением после введения этифоксина уровней прегненолона, прогестерона, 5 α -дигидропрогестерона и аллопрегненолона в плазме крови и мозге [19]. В то же время оказалось, что этифоксин является лигандом не только TSPO, но и ГАМК_A рецептора [18].

Другое соединение XBD173 (AC-5216, эмапунил) — производное фенилпурина обладает высоким сродством к TSPO, проявило анксиолитические свойства в экспериментальных исследованиях и опосредовано ГАМК [20]. Финастерид предотвращал это действие [20].

Таким образом, результаты настоящей работы соответствуют данным литературы об опосредованности анксиолитического действия лигандов TSPO биосинтезом нейростероидов, регулирующих ГАМК трансмиссию. Можно сделать заключение о перспективности дальнейшей фармакологической разработки ГМЛ-1 и ГМЛ-3 в качестве потенциальных нейропсихотропных препаратов.

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий” на 2015 год, проект “Конструирование, синтез и выявление фармакологических свойств оригинальных лигандов митохондриального транслокаторного белка TSPO”.

ЛИТЕРАТУРА

1. R. Rupprecht, V. Papadopoulos, G. Rammes, et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**(12), 971 – 988 (2010).
2. V. Papadopoulos, M. Baraldi, T. R. Guilarte, et al., *Trends Pharmacol. Sci.*, **27**, 402 – 409 (2006).
3. R. Rupprecht and F. Holsboer, *Trends Neurosci.*, **22**, 410 – 416 (1999).
4. A. M. Hosie, M. E. Wilkins, H. M. da Silva, T. G. Smart, *Nature*, **444**, 486 – 489 (2006).
5. G. Bristot, B. Ascoli, C. Gubert, et al., *Expert Opin Ther. Targets*, **18**(6), 679 – 690 (2014).
6. J. M. Wang, C. Singh, L. Liu, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 6498 – 6503 (2010).
7. S. H. Mellon, W. Gong, MD. Schonemann, *Brain Res. Rev.*, **57**(2), 410 – 420 (2008).
8. С. Б. Середенин, Г. В. Мокров, Т. А. Гудашева, О. А. Деева и др., Патент РФ № 2572076 (2014).
9. П. М. Бородин, Л. Шулер, Д. К. Беляев, *Генетика*, **12**(12), 62 – 71 (1976).
10. С. А. Ярко, Г. В. Мокров, Т. А. Гудашева и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **79**(1), 7 – 11 (2016).
11. G. V. Mokrov, O. A. Deeva, T. A. Gudasheva, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **23**(13), 3368 – 3378 (2015).
12. R. G. Lister, *Psychopharmacology*, **92**(1), 180 – 185 (1987).
13. G. O. Potts, J. E. Creange, H. R. Hardomg, H. P. Schane, *Steroids*, **32**(2), 257 – 267 (1978).
14. R. S. Rittmaster, *J. Androl.*, **18**(6), 582 – 587 (1997).
15. H. Selye, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **46**, 116 – 121 (1941).
16. N. L. Harrison and M. A. Simmonds, *Brain Res.*, **323**, 287 – 292 (1984).
17. N. Nguyen, E. Fakra, V. Pradel, et al., *Hum. Psychopharmacol.*, **21**, 139 – 149 (2006).
18. R. Schlichter, V. Rybalchenko, P. Poisbeau, et al., *Neuropharmacology*, **39**, 1523 – 1535 (2000).
19. M. Verleye, Y. Akwa, P. Liere, et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **82**, 712 – 720 (2005).
20. R. Rupprecht, G. Rammes, D. Eser, et al., *Science*, **325**, 490 – 493 (2009).

Поступила 02.07.16

ANXIOLYTIC ACTIVITY OF ORIGINAL PYRROLO[1,2-*a*]PYRAZINE DERIVATIVES (TSPO LIGANDS) DEPENDS ON NEUROSTEROID BIOSYNTHESIS

M. A. Yarkova*, G. V. Mokrov, T. A. Gudasheva, and S. B. Seredenin

Zakusov State Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia

* e-mail: doctorpharm@mail.ru

Investigation of original derivatives of pyrrolo[1,2-*a*]pyrazine representing ligands of 18 kDa translocator protein (TSPO) revealed compounds with high TSPO affinity and pronounced anxiolytic activity, in particular, N-benzyl-N-methyl-1-phenylpyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-3-carboxamide (GML-1) and N-butyl-N-methyl-1-phenylpyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-3-carboxamide (GML-3). In the elevated plus maze test, the anxiolytic effect of GML-1 and GML-3 was completely blocked by neurosteroidogenic enzyme inhibitors trilostane and finasteride.

Keywords: 18 kDa translocator protein; anxiolytic activity; pyrrolo[1,2-*a*]pyrazines; neurosteroids.