

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРВЫЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Доротенко Артем Романович

**ИССЛЕДОВАНИЕ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-
ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ЭФФЕКТАМ ИНГИБИТОРОВ
ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 10A И АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРОВ,
АССОЦИИРОВАННЫХ СО СЛЕДОВЫМИ АМИНАМИ, 1-ГО ТИПА НА
ТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДЕЛЯХ КОМПУЛЬСИВНОГО ПОВЕДЕНИЯ И
ГИПОДОФАМИНЕРГИИ**

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Суханов Илья Михайлович,
доктор медицинских наук

Санкт-Петербург – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Разработка лекарственного препарата.....	13
<i>1.1.1 Ключевые факторы, влияющие на успех разработки препарата</i>	<i>13</i>
<i>1.1.2 Лекарственная толерантность как одна из возможных причин неудач при разработке лекарственного препарата</i>	<i>14</i>
1.2 Виды лекарственной толерантности к эффектам фармакологических соединений	16
<i>1.2.1 Фармакодинамическая толерантность</i>	<i>17</i>
<i>1.2.2 Фармакокинетическая толерантность</i>	<i>18</i>
<i>1.2.3 Другие виды толерантности</i>	<i>18</i>
1.3 PDE10A в разработке инновационных препаратов для лечения заболеваний ЦНС.....	20
<i>1.3.1 Физиологическая роль PDE.....</i>	<i>20</i>
<i>1.3.2 Тканеспецифичность PDE и терапевтический потенциал ингибиторов PDE22</i>	<i></i>
<i>1.3.3 Особенности PDE10A</i>	<i>26</i>
<i>1.3.4 Доклинический профиль ингибиторов PDE10A</i>	<i>28</i>
<i>1.3.5 Клиническая разработка ингибиторов PDE10A</i>	<i>39</i>
1.4 TAAR1 как потенциальная мишень для фармакотерапии заболеваний ЦНС..	40
<i>1.4.1 Общие сведения о TAAR1</i>	<i>40</i>
<i>1.4.2 Доклинический профиль агонистов TAAR1</i>	<i>44</i>
<i>1.4.3 Клиническая разработка агонистов TAAR1</i>	<i>46</i>
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	48

2.1 Экспериментальные соединения.....	48
2.2 Экспериментальные животные и условия их содержания	49
2.3 Методы изучения эффектов ингибиторов PDE10A	51
2.3.1 Фармакологическая модель – TBZ-индуцированная гипоактивность	51
2.3.2 Фармакогенетическая модель – α MPT-индуцированная гипоактивность/каталепсия.....	55
2.4. Методы изучения эффектов агониста TAAR1	59
2.4.1 Полидипсия, обусловленная режимом пищевого подкрепления (ПОРПП)	59
2.4.2 Полидипсия, обусловленная режимом пищевого подкрепления «Фиксированное время 60 секунд».....	60
2.4.3 Полидипсия, обусловленная режимом пищевого подкрепления «Фиксированный интервал 60 секунд».....	62
2.4.4 Дополнительные эксперименты по оценке эффектов RO5263397.....	63
2.4.5 Резюме проведенных экспериментов с агонистом TAAR1	63
2.5 Описание общих методов оценки в исследовании.....	64
2.6 Статистическая обработка данных	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	67
3.1 Изучение эффектов ингибиторов PDE10A на модели TBZ-индуцированной гипоактивности	67
3.1.1 Пилотные эксперименты	67
3.1.2 Эффекты однократного введения ингибиторов PDE10A	69
3.1.3 Эффекты повторного введения ингибиторов PDE10A	72
3.1.4 Эффекты перекрестного введения ингибиторов PDE10	77
3.1.5 Обсуждение результатов экспериментов с использованием фармакологической модели	79

3.2 Изучение эффектов ингибиторов PDE10A на модели α MPT-индуцированной гипоактивности/каталепсии.....	83
3.2.1 Валидация фармакогенетической модели.....	83
3.2.2 Эффекты однократного введения ингибиторов PDE10A	87
3.2.3 Эффекты повторного введения ингибиторов PDE10A	91
3.2.4 Обсуждение результатов экспериментов с использованием фармакогенетической модели.....	92
3.3 Изучение эффектов агониста TAAR1	96
3.3.1 Полидипсия, обусловленная режимом пищевого подкрепления «Фиксированное время 60 секунд»	97
3.3.2 Полидипсия, обусловленная режимом пищевого подкрепления «Фиксированный интервал 60 секунд».....	102
3.3.3 Дополнительные эксперименты по оценке эффектов RO5263397.....	104
3.3.4 Обсуждение результатов экспериментов с агонистом TAAR1	106
ОБСУЖДЕНИЕ.....	111
ВЫВОДЫ	117
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	119
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	122

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В настоящее время остро стоит проблема успешного перехода инновационного соединения из области доклинических исследований (ДКИ) в позднюю клиническую разработку (II-III фазы клинических исследований, КИ). На практике это приводит к низкой вероятности доказательства эффективности инновационного соединения на уровне КИ, несмотря на успешное прохождение ДКИ. Согласно опубликованным данным, вероятность доказать эффективность соединения на этапе ДКИ составляет 63-66%, при этом шанс убедительно показать эффективность во II фазе КИ уменьшается до 15-29% [37]. Наличие такого внушительного разрыва между ДКИ и КИ эффективности может быть связано, в частности, с тем, что в рамках доклинической разработки эффекты лекарственных средств изучают преимущественно при однократном введении, при этом КИ эффективности инновационных препаратов зачастую подразумевают их применение в течение, как минимум, нескольких недель (до достижения конечных точек) [23]. Таким образом, описанный разрыв может быть объяснён в том числе и изменением эффектов фармакологических агентов при повторном применении, в первую очередь, развитием толерантности. Детальное изучение толерантности на уровне ДКИ может позволить снизить уровень неопределенности и избежать вывода потенциально неэффективного инновационного соединения с новым механизмом действия в КИ. Оценка толерантности на уровне ДКИ является особенно важным для новых психотропных соединений, так как терапия соответствующих патологий осуществляется длительное время и подразумевает многократное применение препаратов [23].

Актуальность темы настоящего исследования обусловлена ограниченностью существующих доклинических данных, описывающих динамику изменения фармакодинамических эффектов инновационных

психотропных соединений при их многократном дозировании.

Степень разработанности проблемы.

Настоящая работа посвящена изучению специфических эффектов после однократного и повторного введения соединений из группы ингибиторов фосфодиэстеразы 10A (PDE10A) и агонистов рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами, 1-го подтипа (TAAR1). Механизм действия соединений первого класса связан с ингибированием фермента, ответственного за гидролиз циклических нуклеозидов в среднеразмерных шипиковых нейронах стриатума (medium-size spiny neurons, MSNs). Эти нейроны играют важнейшую роль в процессах регуляции движений и ряда других функций мозга [129]. Ингибирование PDE10A повышает содержание цАМФ и цГМФ как в MSNs, экспрессирующих D1-дофаминовые рецепторы, так и в MSNs, экспрессирующих D2-рецепторы [129]. Таким образом, функционально действие веществ данного класса соответствует действию антагонистов D2- и агонистов D1-дофаминовых рецепторов [129]. Это означает, что ингибиторы PDE10A на системном уровне могут обладать как антипсихотическим, так и противопаркинсоническим действием [106, 141]. Результаты ряда недавних ДКИ с использованием ингибиторов PDE10A дополнительно подтверждают, что их разработка и применение потенциально может решить ряд медицинских проблем в нозологиях, связанных с нарушением стриарной дофаминовой нейротрансмиссии (болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, шизофрения и пр.) [129]. Как уже упоминалось ранее, в доступной литературе информация о фармакодинамике ингибиторов PDE10A при их повторном применении ограничена, а клинический потенциал соединений данного класса пока не реализован. Так, в условиях проведенных ранее КИ исследователи не смогли доказать эффективность веществ данной группы у пациентов с шизофренией [47, 65, 99, 151].

TAAR1 - перспективная фармакологическая мишень для лечения нейropsychических расстройств [63]. Известно, что TAAR1 способны регулировать активность дофаминергической системы и теоретически влиять на компульсивное поведение, сопровождающее ряд психиатрических патологий

(например, обсессивно-компульсивные расстройства (ОКР) [7, 73]. Для существующих агонистов TAAR1 описан многообещающий доклинический профиль, характеризующийся потенциальным антипсихотическим [124] и антиаддиктивным действиями [81], а также способностью соединений этой группы снижать импульсивность [52]. На данный момент на этапе клинической разработки в качестве новых антипсихотиков находятся два соединения-агониста TAAR1: ралмитаронт (компания Hoffmann-La Roche) и улотаронт (Sunovion Pharmaceuticals) [113].

Цель исследования. Определить риск развития лекарственной толерантности к специфическим и потенциально терапевтическим эффектам ингибиторов PDE10A и агонистов TAAR1 с использованием трансляционных *in vivo* моделей.

Задачи исследования.

1. Изучить основные фармакодинамические эффекты агониста TAAR1 RO5263397 на моделях компульсивного поведения при однократном введении.
2. Изучить эффекты агониста TAAR1 RO5263397 на моделях компульсивного поведения при повторном введении.
3. Изучить неспецифическое влияния агониста TAAR1 RO5263397 на локомоторную активность и питьевое поведение.
4. Изучить локомоторные эффекты ингибиторов PDE10A, MP10 и RO5545965, при однократном введении на фармакологической модели гиподофаминергии.
5. Изучить локомоторные эффекты ингибиторов PDE10A, MP10 и RO5545965, при однократном введении на фармакогенетической модели гиподофаминергии.
6. Изучить эффекты повторного фармакологического ингибирования PDE10A с помощью MP10 и RO5545965 на фармакологической и фармакогенетической моделях гиподофаминергии.
7. Изучить эффекты перекрестного введения ингибиторов PDE10A, MP-10 и RO5545965, на фармакологической модели гиподофаминергии.

Методология и методы исследования.

Для изучения противокомпульсивного действия агониста TAAR1 использовали варианты методики полидипсии, обусловленной режимом пищевого поведения (ПОПП). В основе данного метода лежит компульсивное потребление воды крысами (сток Wistar) при интервальном режиме пищевого подкрепления. Эффекты агониста TAAR1 изучали как при однократном введении животным в широком диапазоне доз, так и при повторном введении в фиксированной дозе в течение 7 дней. Неспецифические эффекты агониста TAAR1, способные повлиять на интерпретацию результатов описанной методики, дополнительно изучали в ходе экспериментов по оценке двигательной активности и питьевого поведения в домашних клетках.

В рамках настоящей работы оценили влияние ингибирования PDE10A на гипокинезию и каталепсию у крыс с пониженным уровнем дофамина. Для моделирования гиподофаминергических состояний у крыс использовали фармакологическую и фармакогенетическую модели. Фармакологическая модель реализована на крысах стока Wistar с использованием тетрабеназина (TBZ), ингибитора везикулярного переносчика моноаминов. Для создания фармакогенетической модели использовали крыс, нокаутных по гену, кодирующему дофаминовый транспортер, (DAT-KO) с последующим введением α -метил-паратирозина (α MPT), ингибитора фермента тирозингидроксилазы. Эксперименты с повторным введением ингибиторов PDE10A для оценки развития толерантности к их эффектам проводили с использованием обеих моделей. Фармакогенетическую модель дополнительно валидировали с использованием стандарта клинической терапии болезни Паркинсона (L-DOPA в комбинации с карбидопой).

Научная новизна.

1. В ходе настоящего исследования получены новые данные о фармакодинамических эффектах *in vivo* агониста TAAR1 RO5263397 при его однократном введении в широком диапазоне доз. Впервые описан противокомпульсивный эффект соединения данной группы и установлено, что к

данному эффекту не развивается толерантность при повторном введении. Это позволяет рассматривать фармакологические агенты данной группы как новые средства для лечения ОКР.

2. Предложена и экспериментально апробирована новая фармакогенетическая модель гиподофаминергических состояний *in vivo*, генетически модифицированные крысы, нокаутные по гену дофаминавого транспортёра, под действием ингибитора тирозингидроксилазы альфа-метил-пара-тирозина. Данная модель может быть использована для поиска новых противопаркинсонических средств.

3. На доклиническом уровне с помощью трансляционных моделей гиподофаминергических состояний подтверждено противопаркинсоническое действие ингибиторов PDE10A. Впервые показано, что к данному действию развивается фармакологическая толерантность при повторном введении, которая может существенно ограничить клиническое использование веществ данного класса.

Научно-практическая значимость.

Теоретическая значимость заключается в получении новых знаний о специфических поведенческих эффектах соединений группы ингибиторов PDE10A и агонистов TAAR1. Для агонистов TAAR1 впервые показана способность снижать компульсивное поведение на модели, характеризующейся высоким уровнем предиктивной и внутренней валидности. Детальное изучение поведенческих эффектов агонистов TAAR1 позволило продемонстрировать специфичность их противокомпульсивного действия.

В ходе проведения экспериментов с ингибиторами PDE10A апробированы методы фармакологической коррекции двигательных проявлений гиподофаминергии, не связанные с воздействием на дофаминергическую нейротрансмиссию. Проведенные эксперименты позволяют определить механизм выявленного противопаркинсонического действия ингибиторов PDE10A, способных проявлять активность, характерную для агонистов D1-подобных рецепторов. При этом доклинические данные демонстрируют наличие

толерантности к эффектам ингибиторов PDE10A, что создает необходимость в последующем изучении молекулярных механизмов, отвечающих за формирование данного феномена.

С практической точки зрения полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейшего проведения комплекса исследований с целью разработки оригинальных нейропсихотропных средств, обладающих агонистическими свойствами в отношении TAAR1 (для лечения ОКР) и инновационных ингибиторов PDE10A (в качестве противопаркинсонических средств). Дополнительно экспериментальные данные позволяют спрогнозировать возможное снижение эффективности при повторном применении ингибиторов PDE10A пациентами как в условиях клинических исследований, так и в условиях реальной клинической практики. Результаты проведенных экспериментов подкрепляют представление о том, что толерантность к эффектам ингибиторов PDE10A существенно ограничивает клиническую разработку соединений данного класса по показаниям, предполагающим многократное их применение, и на текущий момент инициация крупных клинических исследований по данным показаниям не является целесообразным. Однако последующее междисциплинарное изучение толерантности к эффектам ингибиторов PDE10A может помочь сформулировать подходы, позволяющие преодолеть проблемы снижения эффективности данных соединений.

При этом результаты проведенных экспериментов подкрепляют имеющиеся клинические данные в отношении устойчивости фармакологических эффектов агонистов TAAR1 при их многократном применении и позволяют рекомендовать последующее их изучение в условиях клинических исследований для оценки эффективности в отношении ОКР.

Связь с планами НИР. Эксперименты выполнены в рамках соглашений по грантам Российского научного фонда №16-34-01016 и №23-25-00158.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Агонисты рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами, 1-го типа обладают специфическим противокомпульсивным действием *in vivo*.

Последующее изучение терапевтических свойств соединений данной группы может позволить разработать первый в классе оригинальный препарат для терапии обсессивно-компульсивных расстройств.

2. На доклиническом уровне к специфическому противокомпульсивному действию агонистов рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами, 1-го типа не развивается толерантность. Полученные данные позволяют спрогнозировать низкий риск развития толерантности к противокомпульсивному действию веществ данной группы в условиях клинических исследований.

3. Ингибиторы фосфодиэстеразы 10А являются новым классом средств с экспериментально подтвержденной противопаркинсонической активностью, механизм действия которых не связан с влиянием на дофаминергическую нейротрансмиссию.

4. К стимулирующему действию ингибиторов фосфодиэстеразы 10А на двигательную активность развивается толерантность, что позволяет спрогнозировать риски, связанные с недостижением эффективности при многократном применении соединений данной группы в условиях клинических исследований и рутинной медицинской практики.

Личный вклад автора состоит в разработке дизайна исследования, проведении экспериментов, систематизации и обработке результатов, сборе и анализе литературных данных. При активном участии соискателя сформулированы положения, выносимые на защиту и выводы, подготовлены публикации по результатам диссертационного исследования.

Апробация. Основные положения диссертационной работы были представлены на:

- конференции 30th ECNP Congress, Париж, 2017;
- конференции ECNP Workshop for Junior Scientists in Europe, Ницца, 2018;
- ежегодной XXVI научной сессии Института фармакологии им. А.В. Вальдмана, Санкт-Петербург, 2022 год;
- X Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований лекарственных средств и

клинических испытаний медицинских изделий», Санкт-Петербург, 2023 год.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах перечня ВАК РФ, 4 из которых входят в международные базы Web of Science, Scopus. Дополнительно по теме диссертации опубликовано 3 тезиса в материалах международных научных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 137 листах машинописного текста, содержит 14 таблиц, иллюстрирована 21 рисунком. Список литературы включает 162 источника, из них 4 – отечественные и 158 – иностранные.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1 Разработка лекарственного препарата

1.1.1 Ключевые факторы, влияющие на успех разработки препарата

За последние десятилетия, несмотря на выдающиеся достижения в области исследования и разработки препаратов (R&D) (от внедрения высокопроизводительного скрининга молекул и до открытий в области изучения патофизиологии заболеваний), а также общее увеличение инвестиций в R&D, количество новых препаратов, регистрирующихся ежегодно, остается примерно на одном и том же уровне. При этом, судя по всему, одним из ключевых барьеров на пути разработки лекарственных препаратов является проблема трансляции инновационного соединения из области ДКИ в позднюю клиническую разработку (II-III фазы КИ). Об этом свидетельствуют результаты анализа успешности разработки лекарственных препаратов на разных стадиях их изучения, проведенного на основании опубликованных данных AstraZeneca и других фармацевтических компаний в индустрии (таблица 1)[37].

Таблица 1. Обзор успешности проектов в фармацевтической индустрии на основании данных компании AstraZeneca и данных по индустрии 2005-2010

Стадия	Вероятность успеха*		Причина закрытия проектов			
	AstraZeneca	Медиана по индустрии	Безопас-ть	Эффектив-ть	ФК / ФД	КПС
ДКИ	66 %	63 %	82 %	6 %	3 %	9 %
I фаза КИ	59%	48 %	62 %	15 %	15 %	8 %
II фаза КИ	15 %	29 %	35 %	57 %	-	8 %
III фаза КИ	60 %	67 %	12 %	88 %	-	-

Примечания: вероятность успеха – вероятность перехода на следующую, более позднюю, стадию разработки. Информация в таблице основана на ранее опубликованных данных [37]. ФК/ФД – фармакокинетика/фармакодинамика,

КПС – коммерческий потенциал и стратегия.

Несмотря на то, что при проведении ДКИ шанс получить многообещающие данные и перейти на этап клинической разработки довольно высок (63–66 %), вероятность преодоления «барьера II фазы» остается крайне низкой (15–29 %).

Как видно из таблицы 1, основной причиной закрытия КИ II фаз (57 % случаев) является отсутствие доказательства эффективности исследуемого препарата. Это означает, что для решения проблемы успешности перехода оригинального соединения из области ДКИ в позднюю клиническую разработку в первую очередь важны факторы, способные повлиять на показатели эффективности препарата. Одним из таких факторов потенциально является лекарственная толерантность.

1.1.2 Лекарственная толерантность как одна из возможных причин неудач при разработке лекарственного препарата

В соответствии с определением лекарственная толерантность – это снижение величины ФД эффекта препарата после его повторного применения [68]. С точки зрения фармакологии лекарственная толерантность может быть описана как сдвиг кривой «доза-эффект» вправо, при котором более высокая доза препарата (по сравнению с исходной) необходима для достижения прежнего эффекта [97]. Для пациентов, вынужденных принимать препараты длительное время, толерантность выражается в снижении эффективности терапии заболевания, что может повлечь за собой повышение дозы препаратов, изменении стратегии лечения и/или смену используемых препаратов [152].

С позиции разработки лекарственного препарата толерантность также является проблемой, которая требует детального рассмотрения. Как было описано ранее, подавляющее большинство оригинальных молекул с новым механизмом действия, вовлеченных в позднюю клиническую разработку, не доходят до этапа регистрации по причинам недоказанной эффективности. В большинстве случаев это связывают с недостаточным пониманием патофизиологии заболевания или не валидными доклиническими моделями [37], при этом лекарственная толерантность также может служить причиной отсутствия эффективности

соединения. Известно, что изучению лекарственной толерантности в условиях ДКИ исследователи уделяют меньшее внимание, чем изучению фармакодинамики при однократном введении соединений, тем самым оставляя неопределенность в отношении рисков возникновения толерантности в условиях клинических исследований. При проведении анализа длительности введения исследуемых соединений животным в опубликованных *in vivo* исследованиях было показано, что в подавляющем большинстве случаев в публикациях описываются результаты экспериментов лишь с однократным введением изучаемого соединения, что не позволяет оценить устойчивость фармакодинамических эффектов при повторном дозировании [23].

Описанный тренд в отношении проведения преимущественно «острых» экспериментов особенно заметен для ДКИ в области психофармакологии, что выглядит непоследовательно по следующим причинам [23]:

- Для ряда препаратов (например, некоторых классов антидепрессантов [100]) развитие терапевтического эффекта наблюдается постепенно и требует многократного их применения;
- Проблема лекарственной толерантности довольно характерна для препаратов (например, опиоидных анальгетиков [111], антиконвульсантов [97]), оказывающих эффекты в центральной нервной системе (ЦНС);
- Лечение пациентов с нейropsychическими патологиями как в условиях клинических исследований, так и в условиях рутинной клинической практики требует длительного применения препарата для соответствующего контроля заболевания. Например, лечение как минимум в течение 4-х недель необходимо для оценки конечных точек эффективности в клинических исследованиях препаратов для лечения шизофрении [158].

Также существует множество примеров классов соединений, находившихся в разработке в качестве потенциальных антипсихотиков, характеризующихся сомнительной эффективностью в КИ, для которых на доклиническом уровне имеются данные, свидетельствующие о наличии толерантности: агонисты mGlu2/3 и 5-HT_{2C}, ингибиторы глицинового переносчика 1 типа и

фосфодиэстеразы 10А, агонисты рецептора нейротензина [23].

В соответствии с вышеперечисленным можно сделать вывод о том, что для препаратов, влияющих на ЦНС, лекарственная толерантность является вероятной причиной недостижения эффективности при применении у пациентов и детальное изучение данного феномена на уровне ДКИ может позволить значимо снизить уровень неопределенности и избежать вывода потенциально неэффективного инновационного соединения (в особенности обладающего новым механизмом действия) в КИ.

1.2 Виды лекарственной толерантности к эффектам фармакологических соединений

Лекарственная толерантность – гетерогенный феномен, не поддающийся классификации по определённому признаку (например, по механизму ее возникновения, времени возникновения или ее продолжительности). Наиболее часто используемая классификация толерантности включает в себя следующие типы [68]:

- а) фармакодинамическая (функциональная),
- б) фармакокинетическая (метаболическая),
- с) «выученная» толерантность:
 - поведенческая (behavioral),
 - ситуативная толерантность (conditioned),
- д) «острая» толерантность (тахифилаксия [23]),
- е) перекрестная толерантность.

Перечисленные выше типы относят к так называемой приобретенной толерантности. Отдельно выделяют исходную невосприимчивость (innate tolerance), характеризующуюся низкой чувствительностью к воздействию препарата уже при первом его введении, и сенситизацию к эффектам препарата (reverse tolerance) [68]. Эти типы не включены в классификацию, приведенную выше, так как их определения не совсем соответствуют понятию лекарственной толерантности, обозначающую снижение эффекта только при последующих введениях препарата в сравнении с первым.

С точки зрения оценки рисков для клинической разработки лекарственного препарата наибольшее значение имеет изучение фармакодинамического типа толерантности.

1.2.1 Фармакодинамическая толерантность

ФД (функциональная) толерантность зависит от фармакологических свойств соединения и базируется на адаптивных изменениях в органах и тканях, на которые воздействует данное соединение. Эти изменения влияют на взаимодействие молекулы с мишенью, что вызывает снижение фармакодинамического эффекта при повторном введении при сохранении исходных плазменных концентраций исследуемого соединения [23, 68]. В качестве примера подобных изменений можно привести изменение количества, плотности или чувствительности рецепторов, с которыми взаимодействует препарат после его многократного введения. Так для препаратов из класса бензодиазепинов, реализующих свои фармакодинамические эффекты за счет потенцирования ГАМКергической нейротрансмиссии, модулируя активность ГАМК_A-рецепторов, основными причинами снижения эффективности при их длительном применении являются: снижение числа и плотности ГАМК_A-рецепторов [79] и снижение аффинности при аллостерическом взаимодействии бензодиазепиновых препаратов с ГАМК_A-рецептором [14, 79]. Молекулярные механизмы развития толерантности к наркотическим анальгетикам также включают в себя снижение числа опиоидных рецепторов за счет их понижающей регуляции или усиления процессов интернализации с их последующей внутриклеточной деградацией [153, 161].

Отдельно стоит обратить внимание, что ФД толерантность (в отличие от ФК) развивается не «к препарату» (т.е. метаболизм, выведение и прочие фармакокинетические характеристики соединения не изменяются), а к определенному эффекту. Причем к различным фармакодинамическим эффектам соединения толерантность может развиваться в разной степени. Так, например, для опиоидных анальгетиков, агонистов μ -опиоидных рецепторов, описано, что для анальгезии, вызванной введением морфином, толерантность значительно

более выражена в сравнении с другими эффектами, такими как миоз и снижение моторики желудочно-кишечного тракта [54]. Это может быть связано с тем, что исходная экспрессия мишени, на которую воздействует препарат (опиоидных рецепторов в случае опиоидных анальгетиков) в разных органах и тканях может отличаться, предрасполагая к развитию толерантности для тех эффектов, которые возникают при взаимодействии препарата с рецептором в ткани с наименьшей их плотностью [34].

Повышение дозы препарата может позволить снизить проявления толерантности, но лишь в краткосрочной перспективе. Для данного типа толерантности стратегия ее преодоления зависит от нозологии. Например, для борьбы с толерантностью к бензодиазепиновым препаратам используется постепенное снижение их дозы с регулярной заменой на препараты другого фармакологического класса с отличным механизмом действия [57].

1.2.2 Фармакокинетическая толерантность

Под ФК (метаболической) толерантностью понимают состояние, при котором снижение эффекта препарата связано с уменьшением его концентраций в месте действия. Чаще всего снижение концентраций препарата связано с усилением его метаболизма и выведения. В психофармакологии классическим примером фармакокинетической толерантности является снижение эффективности при длительном применении барбитуратов и других противоэпилептических препаратов (карбамазепин, фенитоин), которые стимулируют выработку и метаболическую активацию ферментов печени семейства цитохрома P450, способных разрушать препараты данных классов и усиливать их выведение [68, 97].

В сравнении с ФД толерантностью снижение эффективности препарата, вызванное ФК причинами, в большинстве случаев можно преодолеть за счет постепенного увеличения дозы используемого препарата [97] или за счет сочетанного использования с препаратами, ингибирующими метаболические ферменты [86].

1.2.3 Другие виды толерантности

Перекрестная толерантность возникает, когда повторное введение препарата X способно вызвать снижение эффектов препарата Y. По сути, перекрестная толерантность может иметь как ФД (в случае, если препараты X и Y имеют схожий механизм действия и взаимодействуют с одной и той же мишенью), так и ФК природу (в случае, если препараты X и Y имеют схожую химическую структуру и пути метаболизма/элиминации).

Несмотря на то, что перекрестная толерантность не имеет большого значения для прогнозирования рисков, связанных с эффективностью препарата при его разработке, изучение данного феномена важно с точки зрения рутинной медицинской практики. Так известно, что развитие толерантности к эффектам морфина также приводит и к развитию толерантности к эффектам других представителей фармакологического класса наркотических анальгетиков вне зависимости от схожести химической структуры [117]. Это создает ряд трудностей для клиницистов при расчете эквивалентных доз в случае необходимости замены одного наркотического анальгетика другим при ведении пациентов с хроническим болевым синдромом [24]. Ещё одной клинической проблемой, связанной с развитием перекрестной ФК толерантности, является риск снижения эффективности препаратов, используемых для сопутствующей терапии. Так, например, длительный прием антиконвульсантов сопровождается усилением метаболической активности микросомальных ферментов печени. Их активация может влиять на (ускорять) печеночный клиренс ряда антилейкемических препаратов. В конечном счёте это может привести к снижению эффективности химиотерапии острого лимфобластного лейкоза и трагичным последствиям [121].

Помимо перекрестной толерантности к особым типам толерантности можно отнести «острую» толерантность и «выученную» толерантность. Под «острой» толерантностью понимается стремительное снижение эффектов препарата при его многократном применении в течение короткого промежутка времени (в течение нескольких часов) в высоких дозах [68, 97]. Для разного класса соединений данный промежуток времени варьирует, но чаще всего ограничивается 24 часами.

В качестве синонимичного понятия в литературе также встречается термин «тахифилаксия», в основном применяемый для описания резкого снижения эффектов симпатомиметиков (амфетамин, эфедрин) и гистаминоблокаторов I-го поколения при их повторяющемся приеме [23, 32, 97]. Для данного класса препаратов характерно развитие толерантности уже в течение нескольких часов, в то время как для некоторых бензодиазепиновых анксиолитиков (диазепам) ее возникновение описано спустя 24 часа после применения в высоких дозах [6]. С точки зрения практической медицины «острая» толерантность имеет ограниченное значение и рассматривается преимущественно в ключе применения миорелаксантов у пациентов с необходимостью длительного угнетения мышечного тонуса (например, при остром респираторном дистресс-синдроме) [76]. Для ведения таких пациентов разработаны специализированные рекомендации, позволяющие избежать толерантности в основном за счет своевременной смены миорелаксанта [112].

«Выученная» толерантность характеризуется снижением величины эффектов препарата благодаря компенсаторным механизмам, приобретенным в результате прошлого опыта. В ходе многократного использования препарата «выученная» толерантность может достигаться за счет развития специальных навыков, позволяющих компенсировать эффекты данного препарата (поведенческая толерантность). Ситуативный подтип «выученной» толерантности отличается тем, что снижение воздействия препарата связано с адаптивной реакцией организма, обусловленной стимулами внешней среды, в отсутствие которых толерантность к эффектам данного препарата не наблюдается [68]. На доклиническом уровне «выученная» толерантность описана для препаратов различных классов, однако степень влияния данного феномена на клиническую эффективность представляется незначительной [23].

1.3 PDE10A в разработке инновационных препаратов для лечения заболеваний ЦНС

1.3.1 Физиологическая роль PDE

Существует множество сигнальных систем, с помощью которых клетки

получают информацию из внешней среды для формирования специфического физиологического ответа. цАМФ (аденозин-3',5'-циклофосфат) и цГМФ (гуанозин-3',5'-циклофосфат) опосредованные сигнальные системы – одни из первых таких систем, которые были подробно изучены и описаны [104]. В этих системах цАМФ и цГМФ представляют собой вторичные посредники, которые служат в качестве молекул, принимающих участие во внутриклеточной регуляции множества различных физиологических функций, таких как пролиферация и дифференцировка клеток, экспрессия генов, метаболические процессы (липолиз, липогенез, стероидогенез, синтез гликогена, секреция инсулина и пр.), процессы сокращения гладкомышечных клеток различных тканей, зрительной фототрансдукции, реакции ольфакторного эпителия и многие другие [36]. Отдельное внимание стоит уделить процессам, которые модулируются вышеперечисленными циклическими нуклеотидами в центральной нервной системе (ЦНС). В ЦНС цАМФ и цГМФ принимают участие в передаче сигналов, опосредованных нейротрансмиттерами, которые, в свою очередь, регулируют нейрональную активность и в итоге влияют на поведение организма. Так с нарушением метаболизма циклических нуклеотидов связывают нарушения памяти и обучения, а также возникновение расстройств эмоциональной сферы [156].

Текущий уровень знаний позволяет достаточно подробно описать процесс передачи информации в сигнальных системах, опосредованных циклическими нуклеотидами. В классическом представлении при взаимодействии агониста с рецептором, сопряженным с G-белком (GPCR), вследствие изменения конформации рецептора происходит активация внутриклеточного G-белка с последующим изменением концентрации вторичного посредника. В случае цАМФ/цГМФ-опосредованных сигнальных систем, при активации G-белка может наблюдаться как снижение, так и увеличение концентраций циклических нуклеотидов посредством стимуляции или снижения активности специфических ферментов – циклаз (аденилатциклазы и гуанилатциклазы) [89]. В случае увеличения продукции цАМФ и цГМФ инициируется нисходящий сигнальный

каскад, включающий в себя протеинкиназы А и G (соответственно), соответствующие ионные каналы и прочие внутриклеточные посредники, в итоге приводящий к запуску определенного физиологического процесса [104].

При увеличении концентраций циклических нуклеотидов в сигнальный каскад также вовлекаются и внутриклеточные ферменты из семейства фосфодиэстераз циклических нуклеотидов (PDE) [104]. Функция PDE заключается в гидролизе 3'-фосфодиэфирной связи циклических нуклеотидов, что приводит к снижению активности соответствующих сигнальных путей и, как следствие, снижению интенсивности связанных с ним физиологических эффектов. Все описанные PDE могут быть отнесены к I, II или III классам. В организме млекопитающих встречаются PDE I класса, характеризующиеся наличием HD домена (имеющие в составе гистидин-аспартатные аминокислотные последовательности) на карбоксильном конце, обеспечивающие высокую аффинность к цАМФ и/или цГМФ. Все ферменты этого класса делят на 11 семейств в соответствии с гомологией нуклеотидной последовательности, схожестью структуры, специфичностью к субстрату и особенностями экспрессии в различных тканях и органах [116].

1.3.2 Тканеспецифичность PDE и терапевтический потенциал ингибиторов PDE

Интенсивный поиск и изучение молекул, способных влиять на активность PDE, как основных ферментов катаболизма циклических нуклеотидов, связан в первую очередь с их уникальным свойством тканеспецифичной экспрессии. Благодаря различию в паттернах экспрессии PDE различных семейств стала возможным разработка препаратов, селективно влияющих на биологические процессы в области интереса. На данный момент наибольший клинический интерес представляют ингибиторы PDE различных семейств. Сводная информация об особенностях экспрессии семейств PDE и описанных ингибиторах представлена в Таблице 2.

Как видно из таблицы 2, на данный момент наиболее изученными мишенями являются PDE5 и PDE4.

Таблица 2. Семейства PDE: тканеспецифичность и терапевтический потенциал ингибиторов PDE

Семейств о PDE	Особенности экспрессии	Селективны е ингибиторы ФДЭ	Показания	Источни к
PDE1	Головной мозг (1A5, 1A6, 1C), полосатое тело (1B1) гладкая мускулатура, сердце (1C), яички (1A10)	D: - A: -	D: - A: -	[48], [109], [56], [56]
PDE2	Головной мозг (2A3), сердце (2A3)	D: - A: -	D: - A: -	[116], [126]
PDE3	Сердце (3A2), гладкая мускулатура сосуда (3A2), гладкая мускулатура кавернозных тел, адипоциты, тромбоциты	D: PCS-499 A: cilostazol, levosimendan, anagrelide, enoximone, inamrinone, milrinone, olprinone, inamrinone	D: Диабетическая нефропатия A: Облитерирующий тромбангиит, перемежающаяся хромота, эссенциальная тромбоцитемия, ХСН	[116], [45]
PDE4	В большинстве тканей, преимущественно в Т-клетках, эозинофилах, нейтрофилах, моноцитах	D: ART-648, difamilast, Hemay-005, Hemay-808, lotamilast, PF-07038124, UNI-500 A: apremilast, roflumilast, crisaborole, drotaverine, ibudilast, irsogladine	D: Себорея, Буллёзный пемфигоид A: Псориаз, атопический дерматит, болезнь Бехчета, ХОБЛ, спазмы гладкой мускулатуры	[116], [150]
PDE5	В большинстве тканей (5A1, 5A2), сердце (5A3),	D: AR-1001, fadanafil, TPN-171,	D: Болезнь Альцгеймера	[116], [93]

	гладкая мускулатура (в т ч кавернозных тел) (5A3)	TPN-729 A: tadalafil, sildenafil, avanafil, mirodenafil, udenafil, vardenafil	A: Эректильная дисфункция, ДГПЖ, легочная артериальная гипертензия	
PDE6	Палочки сетчатки (6A, 6B), колбочки сетчатки (6C)	D: CTxPDE-6b A:	D: пигментный ретинит A:	[116], [39]
PDE7	В большинстве тканей (7A1), почки (7A2), сердце, поперечнополосатые мышечные клетки (7A2), головной мозг (7B)	D: - A: -	D: - A: -	[116], [69]
PDE8	Печень (8A), яички (8A), щитовидная железа (8A)	D: - A: -	D: - A: -	[116], [58]
PDE9	Селезенка (8A), тонкий кишечник (8A), головной мозг (8A), простата (8A), почки (8A), плацента (8A)	D: BI-409306, irsenontrine maleate, tovinontrine A: -	D: Психозы, шизофрения, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменция с тельцами Леви, серповидноклеточная анемия A: -	[116], [59]
PDE10	Полосатое тело головного мозга (10A), тестикулы (10A)	D: CPL-50003602, МК-8189, NOE-105, PF-02545920 (MP-10), TAK-063, Lu AF11167 A: -	D: Психозы, шизофрения, дискинезия (вызванная приемом препаратов), синдром Туретта, болезнь Гентингтона A: -	[116], [60]
PDE11	Простата (11A4),	D: -	D: -	[116],

	яички (11A4)	A: -	A: -	[159]
--	--------------	------	------	-------

Примечания: D – в разработке (только КИ II-III фаз)/разрабатываемые показания; A – одобренные к применению у человека/одобренные показания; ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких; ХСН – хроническая сердечная недостаточность; ДГПЖ – доброкачественная гиперплазия предстательной железы. Данные по разрабатываемым и зарегистрированным ингибиторам PDE взяты из ресурса GlobalData.com.

История исследования ингибиторов PDE5 началась с разработки силденафила, впервые зарегистрированного в FDA в 1998 году. Силденафил в форме цитрата стал первым эффективным пероральным средством для лечения эректильной дисфункции, что, в связи с имеющейся неудовлетворенной медицинской потребностью, сделало привлекательными ингибиторы PDE5 для изучения и дальнейшей разработки [8]. На данный момент препараты данного фармакологического класса являются препаратами первой линии терапии эректильной дисфункции, зарегистрировано около 5 препаратов ингибиторов PDE5 в различных лекарственных формах, а также разработаны новые показания (например, легочная артериальная гипертензия) [8].

Подробное изучение PDE4 и паттерна экспрессии данного фермента позволило разработать и зарегистрировать ряд препаратов для лечения воспалительных заболеваний легких и кожи. Рофлумиласт на данный момент является единственным ингибитором PDE4 для лечения хронической обструктивной болезни легких [118]. В условиях крупных клинических исследований было показано, что применение рофлумиласта снижает число обострений и улучшает показатели легочной функции (объем форсированного выдоха за 1-ю секунду) [31]. На данный момент также ведется активная разработка ингаляционных форм рофлумиласта для преодоления трудностей в применении препарата, связанных с его узким терапевтическим индексом. Помимо рофлумиласта в мире на данный момент зарегистрировано еще как минимум два других соединения, способных селективно ингибировать PDE4: крисаборол (для лечения атопического дерматита) и апремиласт (для лечения

псориаза) [40].

Отчасти именно клинический и коммерческий успех ингибиторов PDE5 и PDE4 послужил стимулом к изучению терапевтического потенциала ингибиторов других PDE, в том числе PDE10A.

1.3.3 Особенности PDE10A

PDE10A – семейство фосфодиэстераз, способных осуществлять гидролиз как цАМФ, так и цГМФ и характеризующихся экспрессией преимущественно в ЦНС. Данное семейство обнаружено независимо тремя лабораториями в 1999 году. Первоначально была опубликована нуклеотидная последовательность человеческой PDE10 варианта A1, вскоре эти данные были дополнены последовательностями PDE10A для мышей и других грызунов [19]. Полученные для этих видов животных данные о последовательности генов, кодирующих PDE10A, свидетельствуют о консервативности белка PDE10A у млекопитающих и, соответственно, высокой степени гомологии, достигающей 95% для цельной молекулы и 98% для каталитического центра фермента [62].

Распределение PDE10A отличается высоким уровнем специфичности в отношении головного мозга и тестикул. В головном мозге стоит отметить высокий уровень экспрессии в областях полосатого тела: хвостатое ядро и скорлупа [61]. Анализ с использованием методов количественной полимеразной цепной реакции микросрезов головного мозга крысы показал, что мРНК PDE10A обнаруживается в полосатом теле в количествах, на порядок превышающих таковые в других отделах головного мозга (Таблица 3).

Большинство опубликованных данных об экспрессии PDE данного семейства получено в исследованиях на крысах, однако позднее показано, что паттерн экспрессии PDE10 у млекопитающим не имеет существенных межвидовых различий [19].

Таблица 3. Количественное распределение мРНК PDE10A в тканях крысы

Ткань	Количества мРНК ФДЭ10А (относительно префронтальной кору)
ЦНС	

Головной мозг в целом	1.1
Префронтальная кора	1
Полосатое тело	13.1
Гиппокамп	0.62
Мозжечок	0.54
Кора	0.89
Таламус	0.34
Спинной мозг	0.18
Периферические ткани	
Печень	0.0004
Легкие	0.0024
Тестикулы	0.5
Сердце	0.033
Почки	0.013

Примечания: количества мРНК PDE10A были измерены с использованием количественной ПЦР и представлено относительно экспрессии в префронтальной коре. Информация в таблице основана на ранее опубликованных данных [130].

В полосатом теле PDE10A (мРНК и собственно белок) обнаруживается преимущественно в среднеразмерных шипиковых нейронах (medium-sized spinal neurons, MSNs), составляющих 90–95% от всей популяции нейронов этой структуры мозга [83]. MSNs играют важную роль в процессах регуляции движений и ряда других функций мозга и их принято разделять на 2 популяции в зависимости от преимущественно экспрессируемого типа дофаминовых рецепторов – D1 или D2 [129]. D1-экспрессирующие MSNs являются частью “прямого” стриато-таламо-кортикального пути и их активация в конечном счете приводит к усилению сигнала, передаваемого в корковые структуры. D2-содержащие нейроны, входящие в состав “непрямого” пути, имеют противоположную функцию. Активация D1-рецепторов приводит к увеличению концентрации циклических нуклеотидов в нейронах и последующему увеличению их активности, в то время как активация D2-рецепторов опосредует обратный эффект [30, 129].

В случае ингибирования PDE10A происходит повышение содержания цАМФ и цГМФ в обоих типах нейронов стриатума, что функционально соответствует блокаде D2- и активации D1-рецепторов [129]. Таким образом, ингибиторы PDE10A могут работать одновременно как функциональные D2-антагонисты и D1-агонисты и на системном уровне обладать как антипсихотическим, так и противопаркинсоническим действием [106, 141]. Такой уникальный механизм действия определяет возможность клинического использования ингибиторов PDE10A, с одной стороны, в качестве антипсихотических препаратов со сниженным риском развития экстрапирамидных расстройств, а с другой – как противопаркинсонических средств, не вызывающих психотические эпизоды.

1.3.4 Доклинический профиль ингибиторов PDE10A

В связи с уникальными особенностями распределения PDE10A представляет собой перспективную мишень для изучения. Опубликовано множество исследований, описывающих фармакологические эффекты ингибиторов PDE10A *in vivo*. Ниже приведены и обобщены основные поведенческие эффекты ингибиторов PDE10A, представленные в доступной научной литературе (Таблица 4).

Таблица 4. Доклинический in vivo профиль ингибиторов PDE10A

Методика	Объект изучения / модель	Эффект ингибиторов PDE10A	Вещества	Ссылки
Оценка массы тела	Крысы Wistar	Нет эффекта (при повторном введении препарата)	MT-3014	[144]
Оценка уровня пролактина плазмы крови	Крысы Wistar	Нет эффекта в дозах 30-кратно превышающих дозы, вызывающие фармакологические эффекты		
	Крысы Sprague-Dawley	Не влияет на уровень пролактина при совместном введении с галоперидолом и оланзапином	TAK063	[143]
		Не влияет на уровень пролактина во всем диапазоне изучаемых доз.	JNJ-42314415 PQ-10 TP-10 MP-10	[105]
Оценка температуры тела	Крысы Wistar	Гипотермия наблюдалась в высоких дозах после введения JNJ-42314415 (24.7 мг/кг) и MP-10 (15.2 мг/кг).		
Оценка локомоторной активности	Крысы Wistar / пренатальная экспозиция алкоголем (модель аутизма)	Снижение гиперактивности (открытое поле)	Папаверин	[131]
	Крысы Wistar / пренатальная экспозиция вальпроевой кислотой (модель аутизма)	Снижение гиперактивности (открытое поле): числа пересечений линий, заходов в центральный сектор		[98]
	Крысы Wistar / МК-801-индуцированная гиперактивность	Снижение локомоторной активности у интактных животных в дозе более 1.0 мг/кг. Снижение МК-801-зависимой гиперактивности в дозе более 0.3 мг/кг (открытое поле)	MT-3014	[145]
		Снижение гиперактивности в дозах 1-3	T-251	[144]

	30	мг/кг (локомоторные боксы)		
	Крысы Wistar / скополамин-индуцированная гиперактивность	Снижение гиперактивности, более эффективное в сравнении с D2 антагонистами (локомоторные боксы)	JNJ-42314415 PQ-10 TP-10 MP-10	[105]
	Крысы Wistar / PCP-индуцированная гиперактивность	Снижение гиперактивности (локомоторные боксы)		
	Крысы Wistar / d-амфетамин-индуцированная гиперактивность	Снижение гиперактивности, менее эффективное в сравнении с D2 антагонистами (локомоторные боксы)		
	Мыши ICR	Нет эффекта в дозах 0,1 и 0,3 мг/кг (локомоторные боксы)	ТАК-063	[132]
	Мыши ICR / МК-801-индуцированная гиперактивность	Снижение гиперактивности в дозах как при однократном (0.1-1 мг/кг), так и при повторном введении в течение 15 дней (0.5 мг/кг). Величина эффекта не отличается от однократного введения (локомоторные боксы)		[140]
	Мыши NMRI / d-амфетамин-индуцированная гиперактивность	Снижение гиперактивности (открытое поле)	JNJ-42314415 PQ-10 TP-10 MP-10	[106]
	Мыши NMRI / SCH-23390-индуцированная гипоактивность	Обращение гипоактивности, вызванной SKF-82958, к нормальным значениям (открытое поле)		
	Мыши NMRI / галоперидол-индуцированная гипоактивность	Нет эффекта, тенденция к обращению гипоактивности, вызванной галоперидолом, в малых (открытое поле)		
	Мыши C57BL/6J / МК-801- и метамфетамин-индуцированная гиперактивность	Снижение гиперактивности в дозах 1-30 мг/кг (локомоторные боксы)	T-609 T-773	[70]

	Крысы Sprague-Dawley ³¹	Нет эффекта в дозах 0,1 и 0,3 мг/кг (локомоторные боксы)	ТАК063	[132]
	Крысы Sprague-Dawley / МК-801- и метамфетамин-индуцированная гиперактивность	Снижение гиперактивности при введении препарата. Комбинация субэффективных доз препарата и антипсихотиков снижает гиперактивность (локомоторные боксы)		[143]
		Снижение гиперактивности (локомоторные боксы)	ТАК063	[148]
		Снижение гиперактивности (1-10 мг/кг) (локомоторные боксы)	MP10	[142]
		Снижение гиперактивности в дозах 1.0-10.0 мг/кг	Соединение 13a	[41]
	Крысы Sprague-Dawley / РСР-индуцированная гиперактивность	Снижение гиперактивности (открытое поле)	соединение 73 соединение 77	[35]
		Снижение гиперактивности (1-3 мг/кг) (открытое поле)	SEP-39	[82]
		Снижение гиперактивности (0.3-3 мг/кг), эффект 3 мг/кг более выражен в сравнении с рисперидоном (локомоторные боксы)	AMG579	[77]
	Мыши R6/2 Tg / модель болезни Гентингтона	Увеличение локомоторной активности (открытое поле)	ТАК-063	[71]
	Крысы Wistar / МК-801-индуцированная гиперактивность	Снижение гиперактивности в дозах как при однократном, так и при повторном введении в течение 14 дней. Величина эффекта не отличается от однократного введения (открытое поле)	THPP-1	[134]
	Макак-резус / амфетамин-индуцированная гиперактивность	Снижение гиперактивности, потенцирование эффектов атипичных антипсихотиков (датчик-акселерометр)		[149]

Моделирование моторных нарушений	Макак-крабед / МРТР-индуцированный паркинсонизм	Снижение числа дискинезий, вызванных применением L-Dopa, при однократном и повторном применении, величина эффекта сопоставима с амантадином.	MR1916	[20]
	Макак-резус	Не вызывает моторных нарушений в диапазоне доз до 1 мг/кг (шкала MDS, тест Klüver Board, шкала DENS), не влияет на удержание позы (Perch тест).	FRM-6308	[103]
	Капуцин-фавн	Вызывает значимые экстрапирамидные нарушения в дозе 3 мг/кг	MP-10	[26]
Тест подвешивания за хвост	Мыши R6/2 Tg / модель болезни Гентингтона)	Уменьшение числа животных с нарушением рефлекса разведения конечностей	ТАК-063	[71]
		Снижение продолжительности проявления нарушенного рефлекса разведения конечностей	TP-10	[67]
Тест Ротарод	Мыши C57BL/6J / МРТР-индуцированный паркинсонизм	Увеличение продолжительности нахождения животного на стержне	MP10	[85]
	Мыши R6/2 Tg (модель болезни Гентингтона)	Нет эффекта	ТАК-063	[71]
		Предотвращение возникновения дефицита	TP-10	[67]
Тест на шесте	Мыши C57BL/6J / МРТР-индуцированный паркинсонизм	Снижение времени спуска с шеста	MP10	[85]
Оценка каталепсии	Крысы Wistar	Вызывает незначительную каталепсию в дозах от 1.0 до 30 мг/кг (тест с перекладиной)	MT-3014	[145]
		Не вызывают каталепсию (тест с перекладиной)	T-251	[144]
		Не вызывают каталепсию. При сочетанном применении с D1 антагонистом	JNJ-42314415 PQ-10	[41]

	33	наблюдается каталепсия, кривая «доза-эффект» имеет колоколообразную форму со снижением каталепсии в более высоких дозах. Дозозависимое снижение каталепсии, вызванной галоперидолом и ингибитором VMAT.	TP-10 MP-10	
	Крысы Sprague-Dawley	Не вызывает каталепсию (тест с перекладиной)	MR1916	[9]
		Не вызывает каталепсию, не влияет на каталепсию, вызванную галоперидолом и оланзапином (тест с перекладиной)	TAK063	[143]
		Вызывает каталепсию в дозе 3 мг/кг (тест с перекладиной)		[140]
		Вызывает каталепсию в дозе 1 мг/кг, D1 антагонист (SCH23390) потенцирует данный эффект (тест с перекладиной)	PDM-042	[10]
		Не вызывает каталепсию в дозах 2, 4 и 6 мг/кг (тест с решеткой)	Lu AF33241	[120]
		Вызывает каталепсию в дозах 1–10 мг/кг. В дозах менее 1 мг/кг – каталепсия не наблюдается (тест с перекладиной)	SEP-39	[82]
	Крысы Sprague-Dawley	Не вызывают каталепсию. При сочетанном применении с галоперидолом увеличивает проявления каталепсии (тест с решеткой)	MP10	[66]
Y-образный лабиринт	Крысы Wistar / пренатальная экспозиция алкоголем (модель СДВГ)	Увеличивает относительное число спонтанных чередований рукавов	Папаверин	[131]
	Крысы Wistar / пренатальная экспозиция вальпроевой кислотой (модель аутизма)	Увеличивает относительное число спонтанных чередований рукавов	Папаверин	[98]

	Мыши ICR / РСР-индуцированный дефицит	Снижает общее число входов в рукава	ТАК-063	[132]
Приподнятый крестообразный лабиринт	Крысы Wistar / пренатальная экспозиция алкоголем (модель СДВГ)	Увеличение относительного времени, проведенного в открытом рукаве, и относительного числа входов в открытый рукав	Папаверин	[131]
	Крысы Wistar / пренатальная экспозиция вальпроевой кислотой (модель аутизма)		Папаверин	[98]
Радиальный лабиринт	Крысы Long-Evans	Снижение числа ошибок, вызванных введением МК-801	ТАК-063	[132]
Преимпульсное ингибирование	Крысы Wistar / МК-801-индуцированный дефицит	Увеличивает преимпульсное ингибирование	MT-3014	[145]
			T-251	[144]
	Мыши C57BL/6J	Нет эффекта	T-609	[70]
		Увеличивает преимпульсное ингибирование	T-773	[142]
			ТАК063	
		Нет эффекта	MP10	
	Мыши ICR / МК-801-индуцированный дефицит	Увеличивает преимпульсное ингибирование в комбинации с субэффективными дозами антипсихотиков	ТАК063	[143]
	Крысы Sprague-Dawley / РСР-индуцированный дефицит	Увеличивает преимпульсное ингибирование	соединение 73	[35]
			соединение 77	
Условный рефлекс избегания	Крысы Wistar	Подавляет реакцию избегания	соединение 13a	[41]
			MT-3014	[145]
			T-251	[144]
	Крысы Sprague-Dawley	Подавляет реакцию избегания. При комбинированном применении с рисперидоном в субэффективных дозах	Lu AF33241	[120]
			MR1916	[9]

	35	подавляет реакцию избегания.		
		Дозозависимо подавляет реакцию избегания	Соединение 13a	[41]
	Крысы Wistar		THPP-1	[134]
Изучение поведения, индуцированного введением апоморфина	Мыши Swiss-Albino	Дозозависимое снижение вертикализации (sniffing) и climbing. Соотношение этих элементов поведения соответствует профилю действия атипичных антипсихотиков.	Соединение 13a	[41]
	Крысы Wistar	Снижение апоморфин-индуцированной ажитации	JNJ-42314415 PQ-10	[106]
	Крысы Wistar	Снижение апоморфин-индуцированной стереотипии	TP-10 MP-10	[105]
Реакции самовведения этанола	Крысы Wistar	Снижение реакции самовведения этанола и сахара без влияния на способность нажатия на педаль	TP-10	[96]
Реакция условнорефлекторного предпочтения места	Крысы Wistar	Предпочтение места при введении вещества в сравнении с растворителем не отмечалась		
Тест вынужденного плавания	Мыши NMRI / МК-801-индуцированная неподвижность	Снижение вызванной неподвижности	MP-10 WEB 3 WEB 6	[90]
Тест распознавания новых объектов	Крысы Long-Evans / МК-801-индуцированный дефицит	Увеличение времени изучения нового объекта	MT-3014	[9]
	Крысы Sprague-Dawley		MR1916	[9]
		Увеличение времени изучения нового объекта. Совместное введение с D1-	PDM-042	[10]

	36	антагонистом снижает данный эффект.		
	Крысы Long-Evans	Увеличение времени изучения нового объекта	T-773	[70]
	Крысы Wistar / МК-801-индуцированный дефицит		T-251	[144]
	Крысы Long-Evans		TAK-063	[132]
	Капюшонные крысы Листера / субхроническое введение PCP)		SEP-39	[82]
	Крысы Wistar / МК-801-индуцированный дефицит		Lu AF33241	[120]
	Крысы Wistar / скополамин-индуцированный дефицит		PQ-10 BAY 60-7550	[122]
	Крысы Wistar	Нет эффекта		
	Крысы Wistar	Увеличение времени изучения нового объекта	THPP-1	[134]
Тест поиска объекта	Макак-резус (кетамин-индуцированный дефицит)	Увеличение относительного числа успешного нахождения объекта с первого раза	THPP-1	[134]
Тест 5-ти отверстий	Крысы Long-Evans	Увеличение относительного числа успешных откликов в дозах 0.1-0.3 мг/кг. Увеличение числа пропусков и снижение числа преждевременных нажатий (0.3 мг/кг)	TAK-063	[132]
Тест на переключаемость внимания	Крысы Sprague-Dawley	Увеличение когнитивной гибкости (0.3 мг/кг). Совместное введение с D1-антагонистом не снижает эффект.	MP-10	[114]
Тест с горячей пластиной	Крысы Wistar / пренатальная экспозиция вальпроевой кислотой (модель аутизма)	Снижение длительности латентного периода одергивания/облизывания лапы	Папаверин	[98]

Оценка судорожной активности	Мыши R6/2 Tg / модель болезни Гентингтона	Снижение числа судорог	ТАК-063	[71]
------------------------------	---	------------------------	---------	------

Примечания: СДВГ – синдром дефицита внимания с гиперактивностью, РСР – фенциклидин, МРТР – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин. Папаверин является неспецифичным ингибитором PDE10A, также обладающим значимой аффинностью и к PDE других семейств.

Как видно из таблицы выше, для ингибиторов PDE10A получены обширные доклинические данные. Результаты большей части приведенных публикаций свидетельствуют о том, что ингибиторы PDE10A обладают эффектами, характерным для антипсихотиков и способны:

а) Подавлять условный рефлекс избегания и увеличивать преимпульсное ингибирование как при изолированном применении, так и в комбинации с субэффективными дозами антипсихотических препаратов;

б) Снижать локомоторную активность при применении у интактных животных и гиперактивность, вызванную введением веществ со свойствами психостимуляторов.

При этом в сравнении с существующими антипсихотиками ингибиторы PDE10A выгодно отличаются сниженным потенциалом развития экстрапирамидных расстройств (так как введение соединений данного класса практически не вызывает каталепсию), гиперпролактинемии, а также метаболических нежелательных явлений, в первую очередь связанных с увеличением массы тела.

Помимо потенциальной антипсихотической активности существуют позитивные данные об эффектах ингибиторов PDE10A на различных моделях болезни Паркинсона. Так сочетанное применение ингибиторов PDE10A и L-DOPA (стандарт терапии болезни Паркинсона) у макак после введения MPTP способствует снижению проявлений дискинезии, характерных при использовании L-DOPA, без снижения противопаркинсонических эффектов [20]. На MPTP модели у мышей использование ингибитора PDE10A также приводило к снижению моторных нарушений, что характеризовалось увеличением времени нахождения животного на стержне в тесте Ротарод и снижением времени спуска в тесте на шесте [85].

На доклинических моделях болезни Гентингтона введение ингибиторов PDE10A сопровождалось снижением проявлений локомоторного дефицита у генетически модифицированных мышей с встроенным человеческим аномальным HTT геном (ген, кодирующий гентингтин):

- a) Ингибиторы PDE10A увеличивают двигательную активность животных в открытом поле [71];
- b) Ингибиторы PDE10A предотвращают развитие моторных нарушений в тесте Ротарод и тесте подвешивания за хвост [67, 71];
- c) Ингибиторы PDE10A снижают число судорог [71].

В ряде публикаций также описаны прокогнитивные эффекты ингибиторов PDE10A, проявляющиеся в виде:

- a) Увеличения времени изучения нового объекта в тесте распознавания новых объектов у интактных крыс и крыс после применения психостимуляторов [9, 10, 70, 82, 120, 132, 144, 145];
- b) Увеличения шанса обнаружения объекта в тесте поиска объекта у макак после применения кетамина [134];
- c) Увеличения числа успешных ответов в тесте 5-ти отверстий (5-Choice-Serial-Reaction Time Task) для оценки внимания у крыс [132];
- d) Увеличение когнитивной гибкости в тесте на переключаемость внимания у крыс [114].

Несмотря на внушительный объем позитивных данных, полученных на различных моделях *in vivo*, в условиях последующей клинической разработки предпочтение было отдано лишь ограниченному числу показаний – болезнь Гентингтона, болезнь Паркинсона и шизофрения.

1.3.5 Клиническая разработка ингибиторов PDE10A

Как было сказано ранее, PDE10A представляет собой перспективную мишень для разработки препаратов с антипсихотическим и противопаркинсоническим действием [154]. Известно, что в разработку данного класса соединений вовлечено более 15 фармацевтических компаний, а на этап клинических исследований были выведены более 12 молекул-кандидатов. Несмотря на существование ряда экспериментальных данных, убедительно демонстрирующих эффективность ингибиторов PDE10A на доклинических моделях (раздел 1.3.4), применение данных фармакологических веществ в условиях контролируемых КИ пока не увенчалось успехом [65].

Так, например, проверка клинической эффективности МР-10 (длительность терапии – 4 недели) у пациентов с шизофренией не выявила значимых улучшений течения заболевания при сравнении с плацебо [151]. Еще одно КИ эффектов МР-10 (длительность терапии – 12 недель) было остановлено по причине малой вероятности достижения эффективности [47]. Японская фармацевтическая компания Takeda при испытании другого ингибитора PDE10A, TAK-063, также не смогла достичь первичных конечных точек при оценке антипсихотического потенциала изучаемой молекулы у целевой популяции [99], а компания H. Lundbeck A/S приостановила разработку собственного соединения данного класса (Lu AF11167) по причине недостижения эффективности в коррекции негативных симптомов шизофрении у пациентов в КИ II фазы (код КИ: NCT03793712; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03793712>).

Клинические данные эффективности ингибиторов PDE10A по другим показаниям также не оправдали ожиданий. Фармацевтической компанией Pfizer было проведено исследование II фазы в отношении применения МР-10 (длительность курса – 26 недель) у пациентов с болезнью Гентингтона для снижения симптомов заболевания, в рамках которого не было получено убедительных доказательств эффективности соединения [46].

Одним из возможных объяснений вышеописанной череды неудач КИ ингибиторов PDE10A может быть развитие толерантности к их клинически значимым эффектам при повторном применении. Основные результаты доклинических исследований, представленных в разделе 1.3.4, и на основании которых и строились предположения о потенциальной активности ингибиторов PDE10A, были получены в экспериментах с однократным применением соединений. Именно поэтому неопределенность в отношении потенциала развития толерантности ингибиторов PDE10A является одной из предпосылок для реализации настоящей исследовательской работы.

1.4 TAAR1 как потенциальная мишень для фармакотерапии заболеваний ЦНС

1.4.1 Общие сведения о TAAR1

Следовые амины представляют собой эндогенные производные аминокислот, которые по структуре схожи с биогенными аминами, такими как адреналин, норадреналин, дофамин, серотонин [162]. Данные соединения (например, тирамин, фенилэтиламин и триптамин) присутствуют в организме млекопитающих в крайне низких, следовых концентрациях – <10 нг/г ткани, что в 100 раз меньше в сравнении с концентрациями нейротрансмиттеров-катехоламинами [21]. Такие различия в концентрациях связаны с тем, что следовые амины, в отличие от катехоламинов, не способны накапливаться в везикулах нейронов, они быстро диффундируют в синаптическую щель и далее разрушаются под действием моноаминоксидаз (МАО) [21, 22].

Следовые амины в физиологических концентрациях не обладают выраженным фармакологическим действием, тем не менее известно, что введение высоких дозы данных соединений приводит к развитию симпатомиметических эффектов [12, 29, 42]. Данный феномен, так называемый «сырный» синдром имеет клиническое значение. Он может развиваться у пациентов, принимающих антидепрессанты из группы ингибиторов МАО, при употреблении в пищу продуктов с исходно высоким содержанием следовых аминов (некоторые сорта сыра, шоколад и пр.) [25]. В условиях блокады МАО концентрация следовых аминов в плазме крови достигает высоких значений и данные соединения способны проявлять своё симпатомиметическое действие, что на клиническом уровне проявляется резким повышением артериального давления [33, 50, 87].

Рецепторы к следовым аминам относятся к числу родопсиноподобных рецепторов типа А из большого семейства рецепторов, сопряжённых с G-белком (GPCR) [162]. У млекопитающих TAAR впервые были описаны в 2001 году двумя независимыми исследовательскими коллективами, которые смогли идентифицировать новый рецептор и выявить высокую аффинность к нему веществ из группы следовых аминов (тирамина, фенилэтиламина и триптамина), амфетаминов и 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина [27, 28]. Согласно современной номенклатуре для обозначения обнаруженных рецепторов используют термин «рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами» (trace

amine-associated receptors, TAAR) [95].

Всего выделяют 9 подтипов TAAR, разделённых на 3 типа: I (TAAR1-4), II (TAAR5), III (TAAR6-9). Более подробная информация о классификации TAAR у млекопитающих приведена в таблице 5.

TAAR1 представляет собой наиболее изученный и наиболее распространенный тип рецепторов данной группы у позвоночных [63].

Таблица 5. Классификация TAAR1

Тип	Подтип	Mus musculus	Rattus norvegicus	Pan troglodytes	Homo sapiens
I	1	+	+	+	+
	2	+	+	+/-	+
	3	+	+	+/-	+/-
	4	+	+	+/-	+/-
II	5	+	+	+	+
III	6	+	+	+	+
	7	a,c-f + b +/-	a-e,g,h + f,i +/-	+/-	+/-
	8	a-c +	a-c +	+/-	+
	9	+	+	+/-	+

Примечания: + — обнаружен ген, +/- — есть псевдоген, a-i — паралогичные гены. Информация в таблице основана на ранее опубликованных данных [94, 162].

TAAR1 широко распространены в периферических органах и тканях. В ходе иммуногистохимических исследований экспрессия данного подтипа рецепторов показана в стенке тонкого кишечника, в клетках плаценты и β -клетках островков Лангерганса поджелудочной железы [108, 119, 137]. Описанный профиль экспрессии TAAR1 в периферических тканях также подтвержден с использованием метода ПЦР с обратной транскрипцией [80, 84]. Роль периферически экспрессируемых TAAR1 до конца не изучена. Однако на сегодняшний день известно, что введение высокоселективных агонистов TAAR1

(RO5166017) способно оказывать определённое влияние на секрецию инсулина и глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1) у животных [119]:

- под влиянием RO5166017 у животных наблюдалось усиление секреции инсулина, причем данный эффект отсутствовал у мышей без TAAR1;
- инфузия RO5166017 усиливала продукцию GLP1 у мышей.

В связи с этим можно предположить, что TAAR1 представляет интерес в качестве фармакологической мишени для разработки новых препаратов для лечения метаболических расстройств, например, сахарного диабета 2-го типа.

Но основной локализацией TAAR1 является, конечно же, ЦНС, где мРНК и белок TAAR1 обнаружены в миндалевидном теле, базальных ганглиях, структурах лимбической системы, префронтальной коре, мозжечке, черной субстанции и вентральной области покрышки среднего мозга [63].

Физиологическое значение активации центральных TAAR1 активно изучали в последние годы. Известно, что TAAR1 способны образовывать функциональные гетеродимеры с D2-подобными дофаминовыми рецепторами, традиционной мишенью в психофармакологии, и модулировать дофаминергическую нейротрансмиссию [51].

В основе бета-аррестин-зависимого пути передачи внутриклеточного сигнала лежит образование комплекса из бета-аррестина 2, протеинкиназы В и внутриклеточной фосфолипазы А2 [17]. Настоящий комплекс способен активировать киназу гликогенсинтазы 3 (GSK3), фермент, регулирующий активность белков-мишеней [18, 53]. Также известно, что бета-аррестин является важным посредником одного из механизмов инактивации GPCR [128, 133]. Хотя изначально для TAAR1 в экспериментах *in vitro* показана незначительная способность оказывать угнетающее действие на сигнальные пути, ассоциированные с бета-аррестином, однако в более поздних экспериментах показано, что гетеродимеризация TAAR1 с D2-подобными дофаминовыми рецепторами (D2), описанная ранее, приводит к резкому увеличению сродства TAAR1 к бета-аррестину 2 [72]. Таким образом, при активации TAAR1-D2 комплекса наблюдается подавление GSK3 сигналинга и снижение активности

дофаминергической системы за счёт снижения выброса дофамина из пресинаптического нейрона [11].

Описанная взаимосвязь TAAR1 и D2-подобных дофаминовых рецепторов гипотетически позволяет рассматривать агонисты TAAR1 в качестве инновационных препаратов для лечения шизофрении и болезней зависимости [113]. Теоретически использование агонистов TAAR1 может иметь ряд преимуществ в сравнении с имеющимися антипсихотиками, как в ключе безопасности (сниженный потенциал развития экстрапирамидных расстройств и метаболических осложнений), так и в ключе эффективности (потенциально более высокая активность в отношении негативных симптомов или у пациентов с коморбидными патологиями, связанными со злоупотреблением психоактивных веществ) [113]. На этом же базисе строятся и предпосылки к тому, что TAAR1 агонисты могут обладать противокомпульсивным действием, что с точки зрения практической медицины дает возможность усилить вторую линию терапии ОКР, заменив антагонисты D2-подобных дофаминовых рецепторов [125].

На основании имеющихся теоретических предпосылок TAAR1 и их агонисты представляют особенный интерес для сферы разработки лекарственных препаратов, что подтверждается многочисленными как доклиническими, так и клиническими данными.

1.4.2 Доклинический профиль агонистов TAAR1

С момента синтеза первых агонистов TAAR1 проведено и опубликовано множество исследований *in vivo*, описывающих их основные фармакологические эффекты. В фокусе настоящей работы находятся преимущественно поведенческие эффекты агонистов TAAR1, позволяющие оценить терапевтический потенциал данных соединений при лечении нейropsychических патологий.

Известно, что в экспериментах на грызунах агонисты TAAR1 демонстрировали активность, характерную для антипсихотических средств, что проявлялось в их способности:

а) Обращать гиперактивность, вызванную введением психостимуляторов (кокаин, амфетамин, NMDA-антагонисты), у крыс и у мышей

[5, 63];

b) Усиливать ингибирующее действие существующих антипсихотиков на локомоторную активность у животных после введения кокаина [5, 63];

c) Обращать гиперактивность у генетически модифицированных мышей с частичным выключением гена, кодирующего NR1 субъединицу NMDA-рецепторов (генетическая модель психозоподобных состояний) [5, 63];

d) Увеличивать преимпульсное ингибирование у мышей [63, 102];

Для TAAR1 агонистов также описаны эффекты, позволяющие спрогнозировать вероятный антиаддиктивный потенциал данной группы соединений:

a) Агонисты TAAR1 снижают действие психостимуляторов (кокаин, амфетамин, метамфетамин, фенциклидин, L-687,414, никотин) на двигательную активность у мышей и крыс [2];

b) Агонисты TAAR1 подавляют реакцию внутривенного самовведения целого ряда психоактивных соединений с аддиктивным потенциалом (никотин, кокаин, метамфетамин, морфин) [2];

c) Фармакологическая активация TAAR1 сопровождается снижением развития и экспрессии сенситизации к действию психоактивных веществ с аддиктивным потенциалом (метамфетамин, кокаин, никотин) [2]

d) Фармакологическая активация TAAR1 сопровождается снижением экспрессии условнорефлекторного предпочтения места, ассоциированного с действием психоактивных веществ с аддиктивным потенциалом [2].

В ряде источников опубликованы результаты исследований, свидетельствующих в пользу прокогнитивного действия агонистов TAAR1:

a) В тесте на переключаемость внимания у крыс агонисты TAAR1 снижают дефицит, вызванный фенциклидином [124];

b) В тесте поиска объекта у приматов агонисты TAAR1 увеличивают относительное число успешного нахождения объекта [123, 124];

Несмотря на обширный текущий уровень знаний о поведенческих эффектах агонистов TAAR1 некоторые потенциально прогнозируемые свойства соединений

данной группы экспериментально слабо изучены и недостаточно освещены в доступной литературе. Например, практически отсутствуют данные о влиянии агонистов TAAR1 на компульсивное поведение, усиление которого характерно для ОКР. В связи с этим одной из задач настоящей исследовательской работы являлась оценка эффектов соединения данного класса на классической доклинической модели компульсивного поведения (изучение компульсивного питья у крыс).

1.4.3 Клиническая разработка агонистов TAAR1

Перспективность разработки агонистов TAAR1, как фармакологического класса, подтверждается недавно полученными клиническими данными. На сегодняшний день имеются данные об эффективности препарата улотаронт (SEP-363856, компания Sunovion Pharmaceuticals), совмещающего в себе свойства полного агониста TAAR1 и парциального агониста 5-HT_{1A} [43], для которого в условиях КИ II фазы (с длительность терапии 4 и 26 недель) было показано достоверное снижение выраженности позитивных и негативных симптомов у пациентов с острым обострением шизофрении в сравнении с плацебо [38, 88]. Данное соединение рассматривается в качестве потенциально прорывной терапии со стороны Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) и на данный момент активно изучается в рамках III фазы клинических исследований [44].

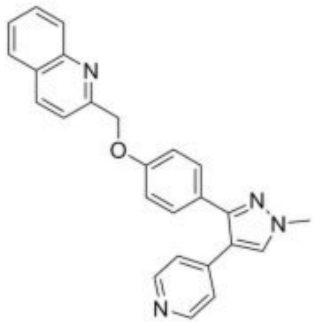
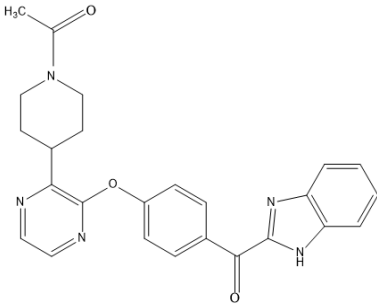
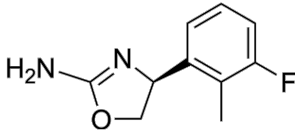
Ралмитаронт, TAAR1 агонист, разрабатываемый другой фармацевтической компанией (F. Hoffmann-La Roche), также сейчас находится на клиническом этапе разработки. Для изучения ралмитаронта FDA одобрено проведение двух КИ, одно из которых призвано оценить эффективность соединения у пациентов с острым обострением шизофрении или шизоаффективным расстройством (код КИ: NCT04512066; <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04512066>), а другое спланировано с целью оценить влияние ралмитаронта на негативные симптомы шизофрении как при применении в качестве монотерапии, так и в комбинации с D₂ или D₂/5HT_{2A} антагонистами (код КИ: NCT03669640; <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03669640>).

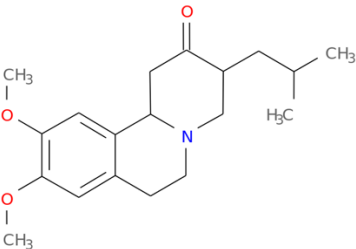
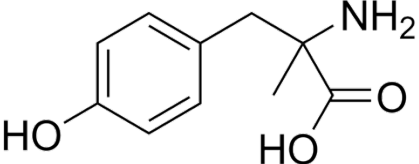
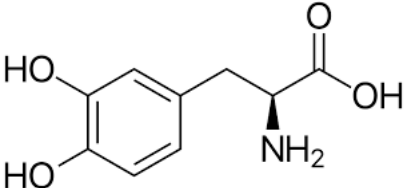
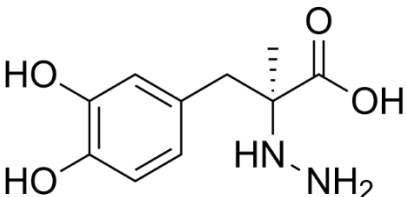
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Экспериментальные соединения

Обобщенная информация об использованных в исследовании фармакологических агентах приведена в таблице 6.

Таблица 6 – Использованные фармакологические агенты

#	Название	Структурная формула	Производитель, каталожный №	V дозирования
1	MP-10	 Активность в отношении PDE10A – IC₅₀=0,42 нМ	Sun-Shine Chem, 898562-94-2	1 мл/кг
2	RO5545965	 Активность в отношении PDE10A – IC₅₀=2,5 нМ	F. Hoffmann-La Roche, Ltd., н/п	1 мл/кг
3	RO5263397	 Активность в отношении TAAR1 EC₅₀=17 нМ	F. Hoffmann-La Roche, Ltd., 1357266-05-7	1 мл/кг

4	Тетра-беназин		Biosynth Carbosynth, 58-46-8	2 мл/кг
5	α MPT		Sigma-Aldrich, 7361-31-1	2 мл/кг
6	L-DOPA		Fluka analytical, 59- 92-7	20 мл/кг
7	Карбидопа		Sigma-Aldrich, 38821-49-7	5 мл/кг

Примечания: Все вещества (за исключением RO5545965) вводили животным внутривенно. RO5545965 вводили внутримышечно.

2.2 Экспериментальные животные и условия их содержания

Эксперименты по изучению эффектов ингибиторов PDE10A выполнены на:

а) 343 самцах крыс стока Wistar из колонии Отдела психофармакологии Института фармакологии им. А. В. Вальдмана (ПСПбГМУ). Животных использовали при проведении экспериментов, результаты которых приведены в разделе 3.1;

б) 85 самках крыс, нокаутных по гену, кодирующему дофаминовый транспортер, (DAT-KO) из колонии Отдела психофармакологии Института фармакологии им. А. В. Вальдмана (ПСПбГМУ), которая была заложена в 2019 г. Путем скрещивания четырех DAT-KO-самцов (СпбГУ, Институт трансляционной биомедицины) и самок стока Wistar Han (исходно – питомник лабораторных животных «Рапполово»). Крыс данной линии использовали при проведении

экспериментов, результаты которых приведены в разделе 3.2.

Эксперименты по изучению эффектов агониста TAAR1 (раздел 3.3) выполнены на 64 самцах крыс стока Wistar, полученных из питомника «Рапполово» (Санкт-Петербург, Россия).

Всех животных содержали в условиях контролируемой влажности воздуха (30-70%) и температуры ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) в помещении с автоматически регулируемым световым режимом (12 ч свет – с 8 ч утра/12 ч темнота) в стандартных пластмассовых клетках со стальными проволочными крышками в группах по 3-5 особей (клетки типа TIV (Tecniplast, Italy)). Для экспериментов, описанных в разделах 2.4.2 и 2.4.3, крыс содержали поодиночке в клетках типа TIII (Tecniplast, Italy). В качестве подстилочного материала использовали древесный наполнитель.

Информация об экспериментальных животных приведена в таблице 7.

Все экспериментальные процедуры выполняли в светлую фазу светового цикла. Организация и проведение экспериментов осуществляли в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, а также в соответствии с требованиями локальных руководств [1, 4]. Экспериментальные протоколы одобрены локальным этическим комитетом ПСПбГМУ им. И.П. Павлова. В методиках с пищевым подкреплением суточное потребление корма грызунами было ограничено до 14-16 г, чтобы поддерживать их массу на уровне примерно 85% от исходной. При оценке питьевого поведения доступ крыс к воде составлял 1 час в день, в остальных экспериментах животные пили без ограничений.

Таблица 7 – Животные, использованные в работе

Линия / сток	По л	Генети- ческая модифика- ция	Иссле- дован- ное соеди- нение	Питом- ник	Критерий отбора	N
Wistar	♂	-	PDE10A	Рапполово (Россия)	Возраст: 2-4 месяца Масса тела: > 200 г	343
Wistar Han	♀	Выключен ген DAT (DAT-KO)	PDE10A	ПСПбГМУ (Россия)	Масса тела: > 200 г	85
Wistar	♂	-	TAAR1	Рапполово (Россия)	Возраст: 3-4 месяца	64

Примечания: PDE10A – эксперименты с ингибиторами PDE10A, TAAR1 – эксперименты с агонистом TAAR1.

2.3 Методы изучения эффектов ингибиторов PDE10A

В рамках настоящей работы изучали действия ингибиторов PDE10A на гипокинезию и каталепсию у крыс с пониженным уровнем дофамина при однократном и повторном введении. Для моделирования гиподофаминергических состояний у животных использовали фармакологическую (TBZ-индуцированная гипоактивность) и фармакогенетическую (α MPT-индуцированная гипоактивность/каталепсия) модели. Эксперименты с повторным введением ингибиторов PDE10A для оценки развития толерантности к их эффектам проводили с использованием обеих моделей.

2.3.1 Фармакологическая модель – TBZ-индуцированная гипоактивность

В рамках экспериментального дня для моделирования гипоактивности TBZ вводили крысам стока Wistar в дозе 3 мг/кг за 30 минут до начала оценки локомоторной активности. Инъекцию ингибитора PDE10A (RO5545965 или MP-10) или соответствующего растворителя выполняли за 60 минут до введения животным TBZ и за 90 минут до старта оценки локомоторной активности в установке «Актометр» (более подробная информация об экспериментальной установке и процедуре изучения локомоторной активности приведена в разделе 2.5). Локомоторную активность оценивали на протяжении 60 минут после

помещения животного в экспериментальную установку.

В экспериментах с однократным введением ингибиторов PDE10A эффекты МР-10 изучали в диапазоне доз от 0,3 до 5 мг/кг, RO5545965 – от 0,1 до 0,9 мг/кг. Для изучения зависимости «доза-эффект» МР-10 проведено два эксперимента ($n=36$ и $n=48$), для RO5545965 – один эксперимент ($n=36$). В каждом эксперименте все животные были разделены на четыре группы: три экспериментальные (подразумевающие введение ингибитора PDE10A в разных дозах) и контрольная группа, крысы которой получали соответствующий растворитель.

Каждый эксперимент с повторным введением ингибиторов PDE10A состоял из периода предшествующего дозирования и одного экспериментального дня. В периоде предшествующего дозирования ингибитор PDE10A или растворитель вводили один раз в день с временным интервалом между введениями равным 24 ± 4 часа. Процедуры, предусмотренные в рамках экспериментального дня, проводили аналогично таковым в экспериментах с однократным введением. Всех животных в отдельном эксперименте делили на три группы:

- Группа 1: растворитель – в периоде предшествующего дозирования, растворитель – в условиях экспериментального дня;
- Группа 2: растворитель – в периоде предшествующего дозирования, ингибитор PDE10A – в условиях экспериментального дня;
- Группа 3: ингибитор PDE10A – в периоде предшествующего дозирования, ингибитор PDE10A – в условиях экспериментального дня.

Для оценки развития толерантности (изучение эффектов повторного применения) к стимулирующему действию МР-10 использовали дозу 3 мг/кг. Эта доза была выбрана как минимальная, для которой показано статистически значимое увеличение локомоторной активности при однократном введении соединения. Для МР-10 проведено два эксперимента с различной длительностью периода предшествующего дозирования (количество дней дозирования соединения без учета экспериментального дня) составившего 4 ($n=33$) и 9 ($n=84$) дней. Эффекты повторного применения RO5545965 изучали в эксперименте с

использованием максимальной дозы (0,9 мг/кг) и с длительностью периода предшествующего дозирования в 9 дней (n=72).

Для оценки потенциала развития перекрестной толерантности к стимулирующему действию ингибиторов PDE10A был спланирован отдельный эксперимент на 36 крысах, разделенных на 4 независимые группы (для каждой группы n=9):

- Группа 1: растворитель – в периоде предшествующего дозирования, растворитель – в условиях экспериментального дня;
- Группа 2: МР-10 (3 мг/кг) – в периоде предшествующего дозирования, МР10 (3 мг/кг) – в условиях экспериментального дня;
- Группа 3: МР-10 (3 мг/кг) – в периоде предшествующего дозирования, RO5545965 (0,9 мг/кг) – в условиях экспериментального дня.
- Группа 4: растворитель – в периоде предшествующего дозирования, RO5545965 (0,9 мг/кг) – в условиях экспериментального дня.

Принципы проведения процедур, предусмотренных в рамках периода предшествующего дозирования (длительность 9 дней) и экспериментального дня, проводили аналогично таковым в экспериментах с повторным введением.

Общая информация обо всех проведенных экспериментах с использованием фармакологической модели приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Фармакологическая модель. Резюме проведенных экспериментов

#	Экспериментальные группы	n	Период предш. Дозирования	Ослепление	Рандомизация	Регистрация preclinicaltrials.eu
1	Растворитель	9	-	Применялось	Простая	РСТЕ0000173
	МР-10 0,3 мг/кг	9				
	МР-10 1 мг/кг	9				
	МР-10 3 мг/кг	9				
2	Растворитель	12	-	Применялось	Простая	-
	МР-10 1 мг/кг	12				
	МР-10 3 мг/кг	12				
	МР-10 5 мг/кг	12				
3	Растворитель	9	-	Приме-	Простая	РСТЕ0000182

	RO 0,1 мг/кг	9		нялось		
	RO 0,3 мг/кг	9				
	RO 0,9 мг/кг	9				
4	Растворитель	11	4 дня	Применялось	Простая	РСТЕ0000181
	MP-10 (однократно) 3 мг/кг	11				
	MP-10 (многократно) 3 мг/кг	11				
5	Растворитель	25	9 дней	Применялось	Простая	РСТЕ0000218
	RO (однократно) 0,9 мг/кг	23				
	RO (многократно) 0,9 мг/кг	24				
6	Растворитель	28	9 дней	Применялось	Блоковая	РСТЕ0000244
	MP-10 (однократно) 3 мг/кг	28			я	
	MP-10 (многократно) 3 мг/кг	28				
7	Растворитель (9 дней) – растворитель (экспер. День)	9	9 дней	Применялось	Простая	-
	MP-10 (9 дней) – MP-10 (экспер. День)	9				
	MP-10 (9 дней) – RO (экспер. День)	9				
	Растворитель (9 дней) – RO (экспер. День)	9				

Примечания: RO – RO5545965.

В качестве мер по снижению субъективности при проведении экспериментов с ингибиторами PDE10A использовали рандомизацию (простая и блоковая) и ослепление экспериментатора, осуществляющего введение соединений. Протоколы экспериментов регистрировали до их начала на ресурсе preclinicaltrials.eu. Исходя из того, что единовременное вовлечение всех животных в эксперимент было ограничено количеством экспериментальных установок, допускалось разделение общей выборки на подгруппы. Все эксперименты проведены на независимых группах. Количество животных в группах было рассчитано, исходя из данных о величине эффекта, полученной в пилотных экспериментах с применением ингибиторов PDE10A. В ходе планирования тестов

с ингибиторами PDE10A также было получено экспериментальное подтверждение способности TBZ (3 мг/кг) вызывать значимую гипоактивность у животных.

2.3.2 Фармакогенетическая модель – α MPT-индуцированная гипоактивность/каталепсия

С использованием настоящей модели изучали способность ингибиторов PDE10A влиять на двигательные нарушения у DAT-КО животных, вызванные введением α MPT (в дозе 250 мг/кг; доза выбрана на основании ранее опубликованных литературных данных [136]). Для валидации данной фармакогенетической модели DAT-КО животным после α MPT инъектировали комбинацию препаратов стандартной терапии болезни Паркинсона (предшественник дофамина L-DOPA в комбинации с ингибитором периферической декарбоксилазы ароматических аминокислот карбидопой). Внутривентрикулярные инъекции L-DOPA (в диапазоне доз от 10 мг/кг до 40 мг/кг) и карбидопы (в дозе 10 мг/кг) выполняли последовательно. Далее проводили две сессии измерения локомоторной активности (длительностью 30 минут каждая), а также измеряли выраженность каталепсии между ними. Исходную оценку локомоторной активности (в течение 60 минут) и уровня каталепсии у животных осуществляли до введения α MPT. В эксперименте по валидации модели все животные были разделены на четыре группы: три экспериментальные (подразумевающие введение L-DOPA в комбинации с карбидопой в разных дозах) и контрольная группа, крысы которой получали растворитель.

Эффекты однократного введения MP-10 оценивали в ходе аналогичного теста (n=35), но после введения соединения проводили три сессии измерения локомоторной активности (длительностью 60 минут каждая) с измерением уровня выраженности каталепсии между ними (см. таб. 4). Для изучения эффектов повторного применения MP-10 был спланирован отдельный эксперимент (n=13) с длительностью периода предшествующего дозирования равного 4 дням, в котором исследуемое соединение вводили в дозе 3 мг/кг. В условиях экспериментального дня животным, находящимся под действием α MPT, вводили

MP-10, а через 1,5 часа однократно оценивали выраженность каталепсии. В этом эксперименте всех животных разделили на три группы:

- Группа 1: растворитель – в периоде предшествующего дозирования, растворитель – в условиях экспериментального дня;
- Группа 2: растворитель – в периоде предшествующего дозирования, MP10 – в условиях экспериментального дня;
- Группа 3: MP10 – в периоде предшествующего дозирования, MP10 – в условиях экспериментального дня.

Эффекты однократного и повторного применения RO5545965 (0,3 мг/кг) изучали в пятидневном эксперименте (n=12). Оценку его действия на локомоторную активность и уровень каталепсии осуществляли после введения соединения в заранее обозначенные временные промежутки (см. таб. 4).

В экспериментах с применением L-DOPA+кабидопа и MP-10 дополнительно проводили нейрохимическую оценку образцов головного мозга животных. Для этого после эвтаназии (методом цервикальной дислокации) животным с помощью гильотины проводили декапитацию с последующей диссекцией на льду стриатума и фронтальной коры головного мозга. Хранение биообразцов осуществляли в жидком азоте при -80°C . Непосредственно перед анализом биообразцы гомогенизировали в 0,1М хлорной кислоте (из расчета 20 мкг на мг ткани) с добавлением 3,4-дигидроксibenзиламина (100 нг/мл) в качестве внутреннего стандарта. Гомогенат центрифугировали в течение 10 минут при 10000G и температуре $+4^{\circ}\text{C}$, супернатант фильтровали с использованием фильтров из поливинилиденфторида (размер пор мембраны 0,22 мкм, производитель: Millipore, Burlington, MA, USA) и затем оценивала). Концентрации дофамина в супернатанте анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе с электрохимической детекцией (Eicom, HTEC-500, Japan), углеродным электродом WE-3G (Eicom, Tokyo, Japan) и использованным потенциалом +650 мВ. Разделение осуществляли с применением колонки с обращенной фазой CA-50DS (150 × 2.1 mm, Eicom, Japan) на скорости потока 200 мкл/мин. Мобильная фаза

(рН 4,31) состояла из 100 мМ фосфатного буфера, 0,17 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 1,8 мМ октансульфоновой кислоты и 19,5% метанола (v/v). Объем инъекции – 10 мкл.

Общая информация обо всех проведенных экспериментах с использованием фармакогенетической модели приведены в таблице 9.

Таблица 9 – Фармакогенетическая модель. Резюме проведенных экспериментов

#	Экспериментальные группы	n	Период предш. Дозирования	Последовательность манипуляций
1	Растворитель	7	-	<u>До введения αМРТ:</u> 1. Оценка локомоторной активности (60 мин) 2. Оценка каталепсии <u>После введения αМРТ:</u> 1. Оценка локомоторной активности (60 мин) 2. Оценка каталепсии <u>После введения L-DOPA+карбидопа/растворителя:</u> 1. Оценка локомоторной активности (30 мин) 2. Оценка каталепсии 3. Оценка локомоторной активности (30 мин)
	L-DOPA+карбидопа 10+10 мг/кг	7		
	L-DOPA+карбидопа 20+10 мг/кг	7		
	L-DOPA+карбидопа 40+10 мг/кг	9		
2	Растворитель	9	-	<u>До введения αМРТ:</u> 1. Оценка локомоторной активности (60 мин) 2. Оценка каталепсии <u>После введения αМРТ:</u> 1. Оценка локомоторной активности (60 мин) 2. Оценка каталепсии <u>После введения МР-10/растворителя:</u> 1. Оценка локомоторной активности
	МР-10 1 мг/кг	9		
	МР-10 3 мг/кг	9		
	МР-10 5 мг/кг	8		

				(60 мин, через 30 мин после введения) 2. Оценка каталепсии 3. Оценка локомоторной активности (60 мин, через 1,5 ч от введения) 4. Оценка каталепсии 5. Оценка локомоторной активности (60 мин, через 2,5 ч мин от введения) 6. Оценка каталепсии
3	Растворитель	4	4 дня	1. Введение αМРТ 2. Ожидание 30 мин 3. Введение МР-10 4. Ожидание 1,5 ч 5. Оценка каталепсии
	МР-10 (однократно) 3 мг/кг	5		
	МР-10 (многократно) 3 мг/кг	4		
4	Растворитель	4	4 дня	1. Введение αМРТ 3. Введение RO5545965 (через 30 мин от введения αМРТ) 4. Оценка локомоторной активности (30 мин) 5. Оценка каталепсии (через 1,5 ч от введения RO) 6. Оценка локомоторной активности (через 2 ч от введения RO) 7. Оценка каталепсии (через 2,5 ч от введения RO) 8. Оценка локомоторной активности (через 3 ч от введения RO) 9. Оценка каталепсии (через 3,5 ч от введения RO)
	RO (однократно) 0,3 мг/кг	4		
	RO (многократно) 0,3 мг/кг	4		

Примечания: RO – RO5545965.

Эксперименты с L-DOPA в комбинации с карбидопой проведены с ослеплением экспериментатора, осуществляющего введение соединений. Все эксперименты, описанные в разделе 2.3.2, выполнены с использованием простой рандомизации. Биоаналитическая часть экспериментов проведена с ослеплением исследователя, осуществляющего пробоподготовку и анализ ВЭЖХ. Исходя из того, что единовременное вовлечение всех животных в эксперимент ограничено количеством экспериментальных установок, допускалось разделение общей выборки эксперимента на подгруппы. Все эксперименты проведены на

независимых группах. Более подробная информация об экспериментальной установке и процедуре изучения локомоторной активности, а также описание методики для оценки каталепсии приведены в разделе 2.5.

2.4. Методы изучения эффектов агониста TAAR1

2.4.1 Полидипсия, обусловленная режимом пищевого подкрепления (ПОРПП)

Для изучения действие RO5263397 на компульсивное поведение у крыс использовали различные варианты ПОРПП. В основе данного метода лежит компульсивное потребление воды крысами, находящимися в интервальном режиме пищевого подкрепления. Эксперименты по оценке ПОРПП проводили в четырех стандартных оперантных установках для крыс (MED Associates, Inc., East Fairfield, VT). Каждая установка была оборудована:

- камерой Скиннера (30,5 x 24,1 x 29,2 см; модель ENV-007), помещенной в звукоизолирующую оболочку;
- вентилятором, размещенным в оболочке, который обеспечивает циркуляцию воздуха и «белый шум»;
- выдвигающейся педалью (модель ENV-112BM), расположенной в камере на высоте 4,5 см от пола;
- генератором звука (модель ENV-223AM), расположенном в камере под верхней стенкой;
- лампой (2,5 Вт, 4 В; модель ENV-215M), расположенной в камере под верхней стенкой;
- приемником для пищевых пеллет (модель ENV-200R2MA), расположенном в камере на высоте 2 см от пола и соединенным с автоматической кормушкой (модель ENV-203-45);
- бутылочкой с водой, носик которой был расположен в камере на высоте 3 см (модель ENV-250RM). Носик бутылочки сопряжен с устройством, что позволяет детектировать сигнал при его касании.

Для сбора и записи данных использовали компьютер IBM, дополнительно оборудованный интерфейсом Med-PC. Весы (Лабораторные весы серии BM,

Невские весы, Россия) использовали для взвешивания бутылочек и определения объема выпитой воды.

2.4.2 Полидипсия, обусловленная режимом пищевого подкрепления «Фиксированное время 60 секунд»

Перед тем, как приступить к экспериментальным сессиям, животных приучали к нестандартному для них типу корма – пищевым пеллетам (Formula A/I, P.J. Noyes, Inc., Ланкастер, Нью-Гэмпшир, США). Для выработки полидипсии проводили экспериментальные сессии в режиме пищевого подкрепления “фиксированное время 60 секунд” (ФВ60), в ходе которых на протяжении часовой экспериментальной сессии одну пищевую пеллету автоматически подавали в поддон каждые 60 секунд независимо от поведения животного. Получение пеллеты сопровождалось предъявлением звукового стимула (4,5 кГц).

Фармакологические тесты с применением агониста TAAR1 (RO5263397) инициировали после выработки полидипсии и достижения критерия ее устойчивости – отличие в объеме выпитой воды достигает не более 10% в течение двух последовательных дней. Для фармакологических тестов проводили экспериментальные сессии аналогичные таковым для выработки полидипсии.

В рамках каждой экспериментальной сессии оценивали следующие параметры:

- объем воды, выпитой за сессию;
- число касаний носика бутылочки;
- длительность питья;
- латентный период первого касания носика бутылочки.

Эффекты однократного применения RO5263397 оценивали в диапазоне доз от 1 до 10 мг/кг в эксперименте (n=15), где введение исследуемого соединения осуществлялось по схеме «Латинский квадрат». Фармакологические тесты выполняли два раза в неделю с временным интервалом, составляющим не менее 72 часов. Для изучения эффектов повторного введения RO5263397 использовали две независимые группы: животным из первой вводили RO5263397 (n=8), животным из второй – растворитель (n=8). В эксперименте с повторным

20:00		0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
21:00	2,67	2,84	2,84	2,84	2,84	2,84	2,84	
22:00	2,12	2,26	2,26	2,26	2,26	2,26	2,26	
23:00	1,68	1,79	1,79	1,79	1,79	1,79	1,79	
24:00	1,33	1,42	1,42	1,42	1,42	1,42	1,42	
1:00	1,06	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	
2:00	0,84	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	
3:00	0,67	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	
4:00	0,53	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	
5:00	0,42	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	
6:00	0,33	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	
7:00	0,26	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	
8:00	0,21	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	

Примечания: серым выделены часы, когда ожидаемые концентрации препарата в сыворотке крови превышали 0,67 мкг/мл.

2.4.3 Полидипсия, обусловленная режимом пищевого подкрепления «Фиксированный интервал 60 секунд»

Для последующего изучения компульсивного питья и оценки пищедобывающего поведения использовали режим подкрепления “фиксированный интервал 60 секунд” (ФИ60), при котором животное получало пищевую пеллету только при нажатии на педаль по прошествии 60 секунд с предыдущего подкрепления. Данный эксперимент проводили в экспериментальной установке, описание которой было приведено ранее (раздел 2.4.1), на животных, которых использовали в предыдущем тесте (раздел 2.4.2). Все животные были предварительно обучены нажимать на педаль в оперантной камере.

В рамках каждой экспериментальной сессии оценивали те же параметры, что и в тестах с режимом подкрепления ФИ60, за исключением дополнительного параметра – число нажатий.

Фармакологические тесты были инициированы после достижения критерия устойчивости полидипсии (раздел 2.4.2). С использованием режима подкрепления

ФИ60 был проведен эксперимент (n=15) с однократным введением RO5263397, в ходе которого оценивали эффекты соединения в диапазоне доз от 1 до 10 мг/кг. Введение различных доз RO5263397 в рамках фармакологических тестов осуществляли по схеме «Латинский квадрат». Временной интервал между тестами был аналогичен таковому в предыдущем эксперименте (раздел 2.4.2).

2.4.4 Дополнительные эксперименты по оценке эффектов RO5263397

Дополнительно проведены контрольные эксперименты, в ходе которых оценивали влияние RO5263397 на локомоторную активность крыс и потребление ими воды в домашних клетках.

Эффекты однократного применения RO5263397 (1-10 мг/кг) на двигательную активность животных изучали в ходе эксперимента (n=10), где введение исследуемого соединения осуществлялось по схеме «Латинский квадрат». Двигательную активность крыс оценивали в течение 60 минут, фармакологические тесты инициировали после периода адаптации к экспериментальным установкам (длительностью 3 недели). Более подробная информация об экспериментальной установке и процедуре изучения локомоторной активности приведены в разделе 2.5.

Для оценки влияния RO5263397 на питьевое поведение было спланировано два эксперимента:

- с однократным введением соединения (n=8) в дозах от 1 до 10 мг/кг по схеме «Латинский квадрат»,
- при повторном введении соединения (n=15), где дозы и режим введения исследуемого соединения были идентичны эксперименту с многократным применением RO5263397, описанному в разделе 2.4.2.

Целью обоих экспериментов было изучить питьевое поведение крыс в домашних клетках. В тесте с однократным введением RO5263397 оценивали объём воды, выпиваемой за час животными, находящимися на питьевой депривации; в эксперименте с повторным применением RO5263397 – объём воды, выпитой животными за ночь.

2.4.5 Резюме проведенных экспериментов с агонистом TAAR1

Общая информация обо всех экспериментах суммирована в таблице 11.

Эксперименты с TAAR1 агонистом были проведены без ослепления экспериментаторов и без использования рандомизации. Исходя из того, что единовременное вовлечение всех животных в эксперимент было ограничено количеством экспериментальных установок, допускалось разделение общей выборки эксперимента на подгруппы.

Таблица 11 – Резюме проведенных экспериментов с TAAR1 агонистом

#	Эксперимент	n	Изучаемые дозы	Депривация
1	Оценка эффектов однократного введения RO5263397 на ПОРПП ФВ60	15*	0, 1, 3, 6, 10 мг/кг	Пища
2	Оценка эффектов однократного введения RO5263397 на ПОРПП ФИ60	15*	0, 1, 3, 6, 10 мг/кг	Пища
3	Оценка эффектов повторного введения RO5263397 на ПОРПП ФВ60	16	- 0 мг/кг bid (растворитель) - 12 мг/кг bid	Пища
4	Оценка эффектов однократного введения RO5263397 на локомоторную активность	10*	0, 1, 3, 6, 10 мг/кг	—
5	Оценка эффектов однократного введения RO5263397 на потребление воды в домашних клетках	8*	0, 1, 3, 6, 10 мг/кг	Вода
6	Оценка эффектов повторного введения RO5263397 на потребление воды в домашних клетках	15	- 0 мг/кг bid (растворитель) - 12 мг/кг bid	—

Примечания: *дозирование животных в экспериментах проводили по схеме Латинский квадрат.

2.5 Описание общих методов оценки в исследовании

Для измерения локомоторной активности использовали установку «Актометр» (ООО «Ритек», Санкт-Петербург), состоящую из двух блоков, в каждом из которых расположено 5 идентичных камер (25 см × 35,5 см × 34 см) с прозрачными стенками. Каждый блок представляет собой вентилируемую

светонепроницаемую конструкцию, обеспечивающую локомоторным камерам шумоизоляцию и постоянное внутренне освещение интенсивностью 30–40 люкс. Каждый из 10 локомоторных боксов оборудован тремя парами инфракрасных датчиков, расположенных на высоте 5 см от пола, для измерения горизонтальной активности. Сбор данных осуществляли с помощью специального программного обеспечения (MED-PC software, MED Associates, Inc., East Fairfield, VT). После помещения животных в локомоторный бокс оценивали количество последовательных пересечений двух пар инфракрасных датчиков (горизонтальная активность). В качестве дополнительного параметра двигательной активности также оценивалась вертикальная активность, отражающая количество пересечений вспомогательных 8 пар датчиков, расположенных на высоте 14 см от пола.

Для оценки уровня каталепсии использовали тест «перекладина» [13]. При проведении настоящего теста передние лапы крысы помещали на горизонтальную деревянную перекладину (1 см в диаметре), расположенную на высоте 10 см от пола, и в течение 3-х мин фиксировали время нахождения животного в вынужденной «позе лектора». Время в «позе лектора» начинали отсчитывать от момента помещения передних лап животного на перекладину и до момента, когда крыса касалась передней лапой пола или когда обе нижние лапы переставали касаться пола. Максимальный период времени нахождения в «позе лектора» был ограничен 180 с.

2.6 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных и визуализацию полученных данных проводили с использованием программ SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., США), IBM SPSS Statistics 21 (IBM, США) и R software (пакеты “emmeans” (v 1.7.4.1) и “lmerTest” (v 3.1.3)). Статистическую значимость влияния исследуемых факторов на поведенческие показатели оценивали с помощью тестов Краскела-Уоллиса или смешанной модели дисперсионного анализа (mixed ANOVA) на данных после рангового преобразования. Парные сравнения (mixed ANOVA: тесты Даннетта и Тьюки; тест Краскела-Уоллиса: тест Данна) проводили только при условии, что

статистически значимые различия выявлены процедурой дисперсионного анализа. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Результаты проведенных экспериментов представлены на рисунках в виде блочных диаграмм – “ящичков с усами”, отражающих в центре ящичков среднее значение (пунктир) и медиану (сплошная линия); 25% и 75% квартили (нижняя и верхняя кромки ящичка), 10-й и 90-й процентиля (нижняя и верхняя засечки усов), либо как среднее арифметической $\pm$ стандартная ошибка среднего. Часть данных, полученных в тесте «перекладина», также представлены в виде графика Каплана-Мейера.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Изучение эффектов ингибиторов PDE10A на модели TBZ-индуцированной гипоактивности

3.1.1 Пилотные эксперименты

Как можно видеть на Рисунке 1 введение TBZ в дозе 3 мг/кг приводило к статистически значимому (тест Манна-Уитни: $P < 0,01$) снижению горизонтальной двигательной активности у крыс стока Wistar (Рисунок 1А). Эти наблюдения позволили обосновать дальнейшее использование данной дозы TBZ для моделирования гипоактивности у крыс.

В ходе проведения двух пилотных экспериментов с ингибиторами PDE10A выявлен их стимулирующий эффект у животных с гипоактивностью, вызванной введением TBZ (Рисунок 1В и С). Полученные результаты использованы для определения размера выборки для подтверждающих экспериментов с MP-10 и RO5545965.

В случае $\alpha = 0,01$ (уровень значимости) и $1 - \beta = 0,8$ (статистическая мощность) требуемый размер выборки получился 12 крыс/группа. Если взять $\alpha = 0,05$ (уровень значимости) и $1 - \beta = 0,8$ (статистическая мощность), необходимое число животных в группе получилось равным 9 крысам.

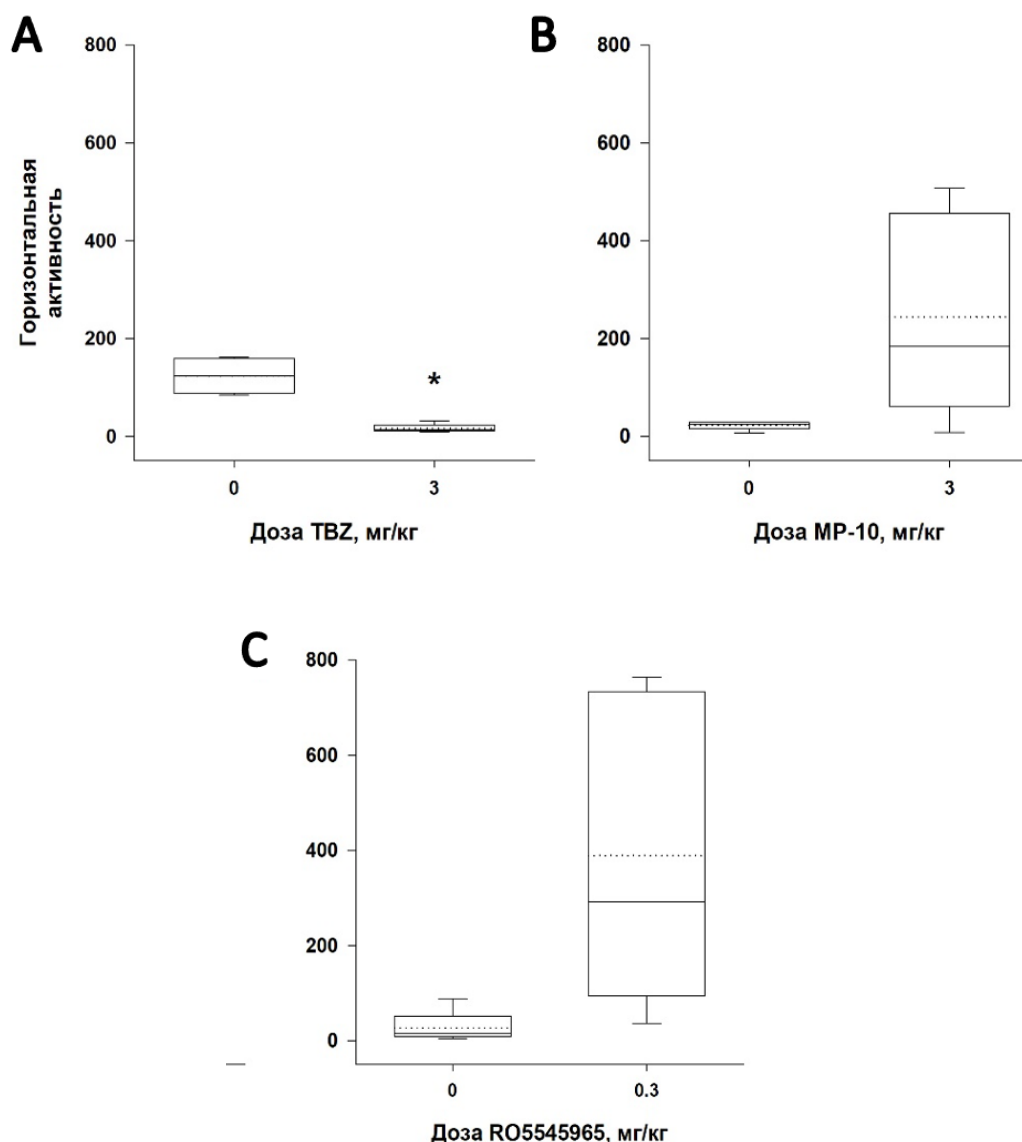


Рисунок 1 – Действие TBZ (3 мг/кг, в/б) на горизонтальную двигательную активность крыс стока Wistar. * – $P < 0.05$ (тест Манна-Уитни) относительно группы с растворителем (0 мг/кг). В и С) Действие МР-10 (3 мг/кг, в/б) и RO5545965 (0,3 мг/кг, п/о) на горизонтальную двигательную активность крыс стока Wistar, находящихся под действием TBZ.

Данные представлены в виде блочных диаграмм – «ящичков с усами», отражающих в центре ящичков среднее значение (пунктирная линия) и медиану (сплошная линия); 25%/75% квантили (нижняя и верхняя кромки ящичка), 10-й и 90-й процентиля (нижняя и верхняя засечки усов).

3.1.2 Эффекты однократного введения ингибиторов PDE10A

В условиях подтверждающих экспериментов продемонстрировано статистически значимое дозозависимое увеличение двигательной активности животных после применения ингибиторов PDE10A (Рисунок 2). В тесте с МР-10 (диапазон доз от 1 до 5 мг/кг) статистический анализ выявил значимый эффект фактора «доза» (тест Краскела-Уоллиса: $H=11,9$; $df=3$; $p=0,008$). При *post hoc* сравнениях (тест Даннета) обнаружено статистически значимое увеличение горизонтальной активности после введения соединения в дозах 3 и 5 мг/кг ($p<0,05$) (рисунок 2В). В отдельном эксперименте с применением МР-10 в меньшем диапазоне доз (от 0,3 до 3 мг/кг) также показан статистически значимый эффект соединения (тест Краскела-Уоллиса: $H=15,0$; $df=3$; $p=0,002$), но при этом эффект дозы 3 мг/кг не достиг статистической значимости (тест Даннета). Интересно, что введение наименьшей дозы (1 мг/кг) вызывало статистически значимое подавление горизонтальной активности животных (рисунок 2А).

Схожие результаты были получены и при проведении экспериментов с другим ингибитором PDE10A – RO5545965. Введение RO5545965 сопровождалось статистически значимым ослаблением гипокинетического действия TBZ (тест Краскела-Уоллиса: $H=14,2$; $df=3$; $p=0,003$). При проведении сравнений с данными, полученными после введения растворителя, выявлен статистически значимый эффект (тест Даннета; $p<0,05$) наибольшей дозы изучаемого соединения (0,9 мг/кг) (рисунок 2С).

На рисунке 3 приведены вспомогательные результаты касательно эффектов ингибиторов PDE10A на вертикальную активность животных. Приведенные результаты дополнительно иллюстрируют увеличение двигательной активности после введения обоих ингибиторов PDE10A.

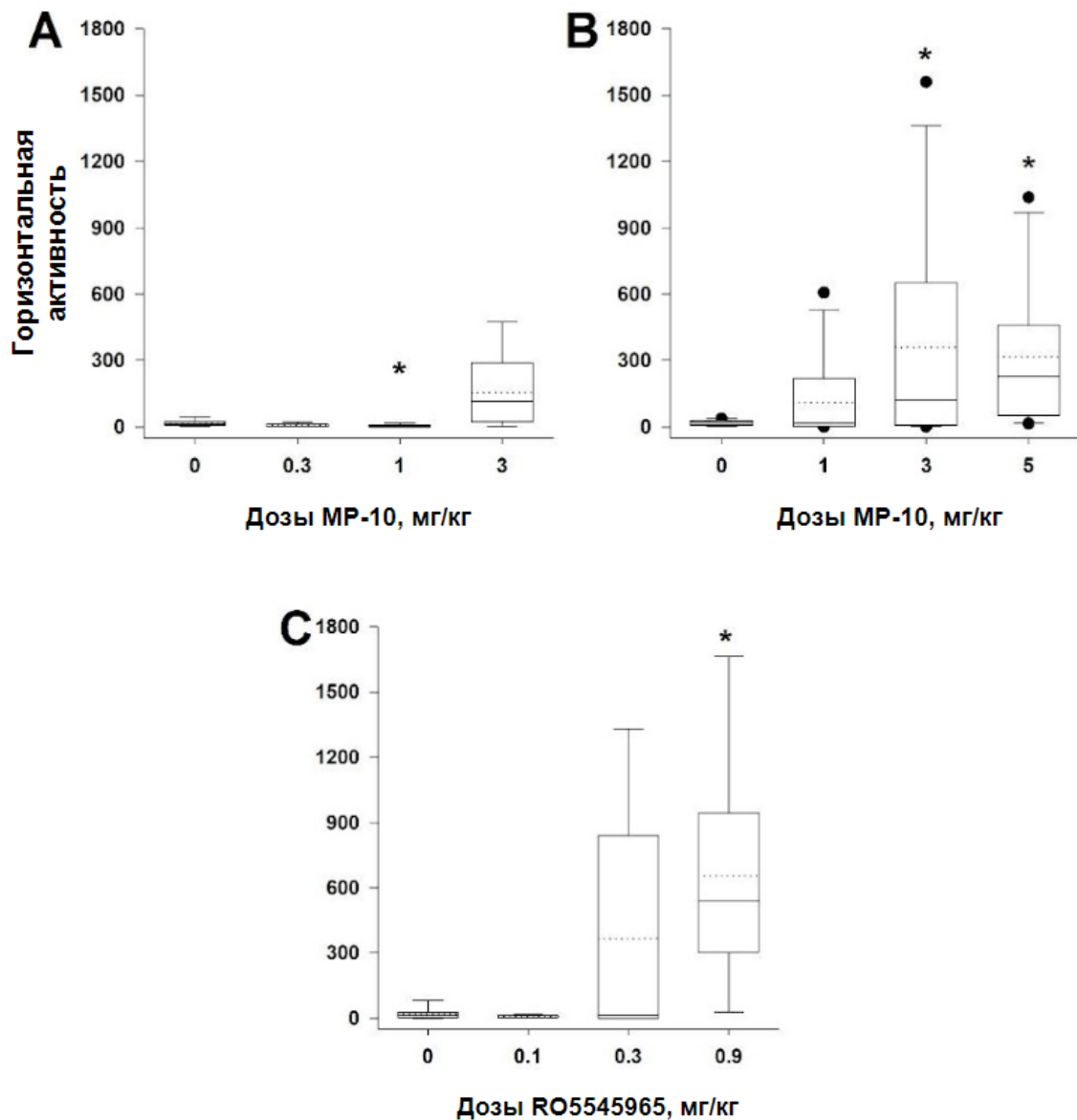


Рисунок 2 – Эффекты однократного применения ингибиторов PDE10A (А, В – для МР-10, С – для RO5545965) на горизонтальную активность у животных на модели TBZ-индуцированной гипоактивности (фармакологическая модель). * – $P < 0.05$ (тест Даннета) относительно группы с растворителем (0 мг/кг).

Данные представлены в виде блочных диаграмм – «ящичков с усами», отражающих в центре ящичков среднее значение (пунктирная линия) и медиану (сплошная линия); 25%/75% квантили (нижняя и верхняя кромки ящичка), 10-й и 90-й процентиля (нижняя и верхняя засечки усов).

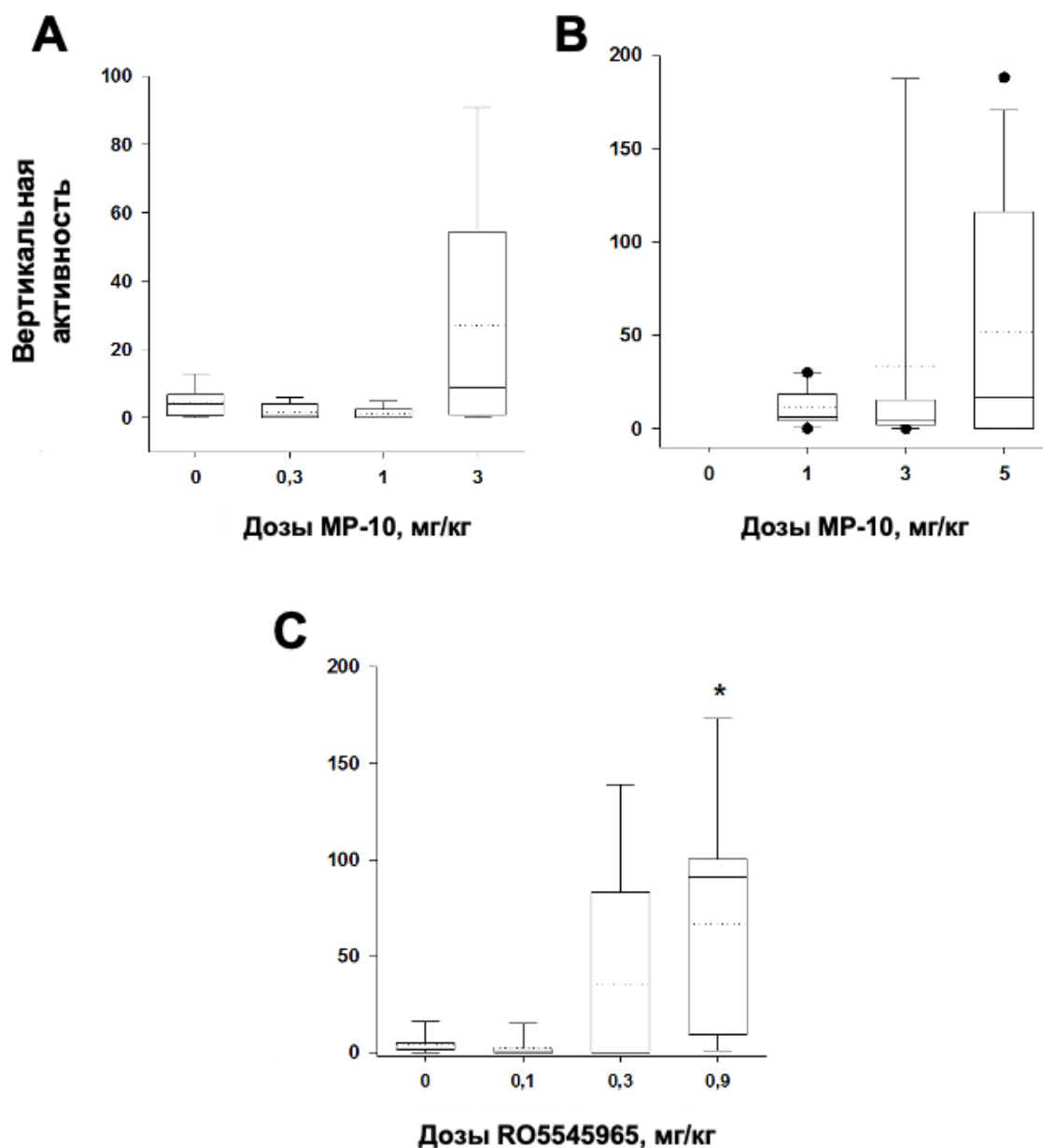


Рисунок 3 – Эффекты однократного применения ингибиторов PDE10A (А, В – для МР-10, С – для RO5545965) на вертикальную активность у животных на модели TBZ-индуцированной гипоактивности (фармакологическая модель).

Данные представлены в виде блочных диаграмм – «ящичков с усами», отражающих в центре ящичков среднее значение (пунктирная линия) и медиану (сплошная линия); 25%/75% квантили (нижняя и верхняя кромки ящичка), 10-й и 90-й процентиля (нижняя и верхняя засечки усов).

3.1.3 Эффекты повторного введения ингибиторов PDE10A

На основании проведенных экспериментов с однократным введением ингибиторов PDE10A были получены данные для последующего изучения их эффектов при многократном введении. Например, были определены дозы для повторного введения в условиях периода предшествующего дозирования, соответствующие минимальным дозам, для которых было показано статистически значимое увеличение локомоторной активности (MP-10 – в дозе 3 мг/кг, RO5545965 – в дозе 0,9 мг/кг).

Как описано в разделе 2.3.1, эффекты многократного введения MP-10 изучали в условиях двух экспериментов длительностью 5 и 10 дней. Как можно видеть на рисунке 4А, однократное введение MP-10 приводило к статистически значимому увеличению горизонтальной активности (тест Краскела-Уоллиса: $H=15,8$; $df=2$; $p<0,001$). При этом повторное введение соединения сопровождалось снижением его стимулирующей активности (тест Тьюки: группа однократного введения vs группа растворителя – $p<0,05$; группа повторного введения vs группа растворителя – n.s.). Оценка данных на протяжении локомоторной сессии в динамике показала, что животные, независимо от кратности введения MP-10, демонстрировали сопоставимый уровень двигательной активности первые 10 минут от начала экспериментальной сессии (рисунок 4В). В точке «15 минут» от помещения животных в локомоторные боксы и последующих наблюдается стремительное снижение стимулирующей активности MP-10 в группе повторного введения (рисунок 4В). Дисперсионный анализ на данных после рангового преобразования подтвердил достоверное влияние факторов «группа» ($F(2,29)=14,6$; $p<0,001$), «время» ($F(11,49)=21,2$; $p<0,001$) и их взаимодействие ($F(22,49) = 2,2$; $p=0,01$).

Результаты эксперимента с повторным пятидневным введением MP-10 (3 мг/кг) позволили провести расчёт размера выборки для подтверждающих экспериментов с десятидневным введением ингибиторов PDE10A. Размер выборки определяли с помощью языка программирования R, основываясь на двух независимых наборах данных с однократным введением MP-10 и RO5545965.

Принимая во внимание отсутствие в литературе и среди наших результатов данных о развитии сенситизации к действию ингибиторов PDE10A, мы использовали односторонние критерии. Для $\alpha=0,025$ и $\beta=0,8$ требуемый размер выборки определили как 25 крыс/группа. Дополнительно, используя полученные в эксперименте с пятидневным введением различия между группами «однократно МР-10» и «повторно МР-10», для $\alpha=0,025$ и $\beta=0,8$ требуемый размер выборки, чтобы получить желаемый эффект, оказался равен 41 крыса/группа. Хотя при размере выборки 25 крыс/группа мощность составляла всего 0,59 мы решили принять во внимание, что в подтверждающих экспериментах у животных в два раза дольше период получения вещества (10 дней vs 5 дней). Также на определение финального размера выборки в эксперименте с десятидневным введением МР-10 повлиял блочный дизайн рандомизации. Каждый блок включал 21 крысу, соответственно, 4 блока (84 животных, 28 крыс/группа) ближе к вычисленному нами размеру выборки (25 крыс/группа), чем 3 блока (63 животных, 21 крыса/группа).

В ходе эксперимента с десятидневным введением МР-10 подтверждены результаты опыта с пятидневным введением данного ингибитора PDE10A. Обнаружены статистически значимые различия между экспериментальными группами (тест Краскела-Уоллиса: $H=23,3$; $df=2$, $p<0,001$), связанные со снижением стимулирующей активности при многократном введении исследуемого соединения (рисунок 4Е). В сравнении с предшествующим менее продолжительным экспериментом кривые «горизонтальная активность – время» иллюстрируют различия между группами повторного и однократного введения МР-10, уже с момента начала экспериментальной сессии (рисунок 4F). Животные, которым осуществляли введение МР-10 в течение 10 дней, демонстрировали уровень двигательной активности сопоставимый с контрольной группой, не получавшей исследуемое соединение (влияние межгруппового фактора «группа» ($F(2,81)=25,8$; $p<0,001$), внутригруппового фактора «время» ($F(11,134)=17,7$; $p<0,001$), а также их взаимодействия ($F(22,134) = 2,2$; $p=0,003$)).

При изучении эффектов повторного введения RO5545965 в десятидневном

эксперименте продемонстрировано аналогичное изменение активности соединения – снижение горизонтальной активности у животных в группе повторного введения в сравнении с группой однократного введения (тест Краскела-Уоллиса: $H=15,7$; $df=2$; $p<0,001$) (рисунок 4C). При этом, как видно на рисунке 4D, динамика двигательной активности во времени и паттерн снижения стимулирующей активности в группе повторного применения RO5545965 аналогичны таковым в пятидневном тесте с MP-10, т.е. в первой половине экспериментальной сессии наблюдается довольно схожий уровень активности между обоими группами исследуемого препарата (однократное и повторное введения) с последующим выраженным снижением в группе повторного введения (влияние межгруппового фактора «группа» ($F(2,68)=25,7$; $p<0,001$), внутригруппового фактора «время» ($F(11,98)=8,45$; $p<0,001$), а также их взаимодействия ($F(22,98)=2,0$; $p=0,001$)).

На рисунке 5 приведены вспомогательные результаты касательно эффектов повторного введения ингибиторов PDE10A на вертикальную активность животных.

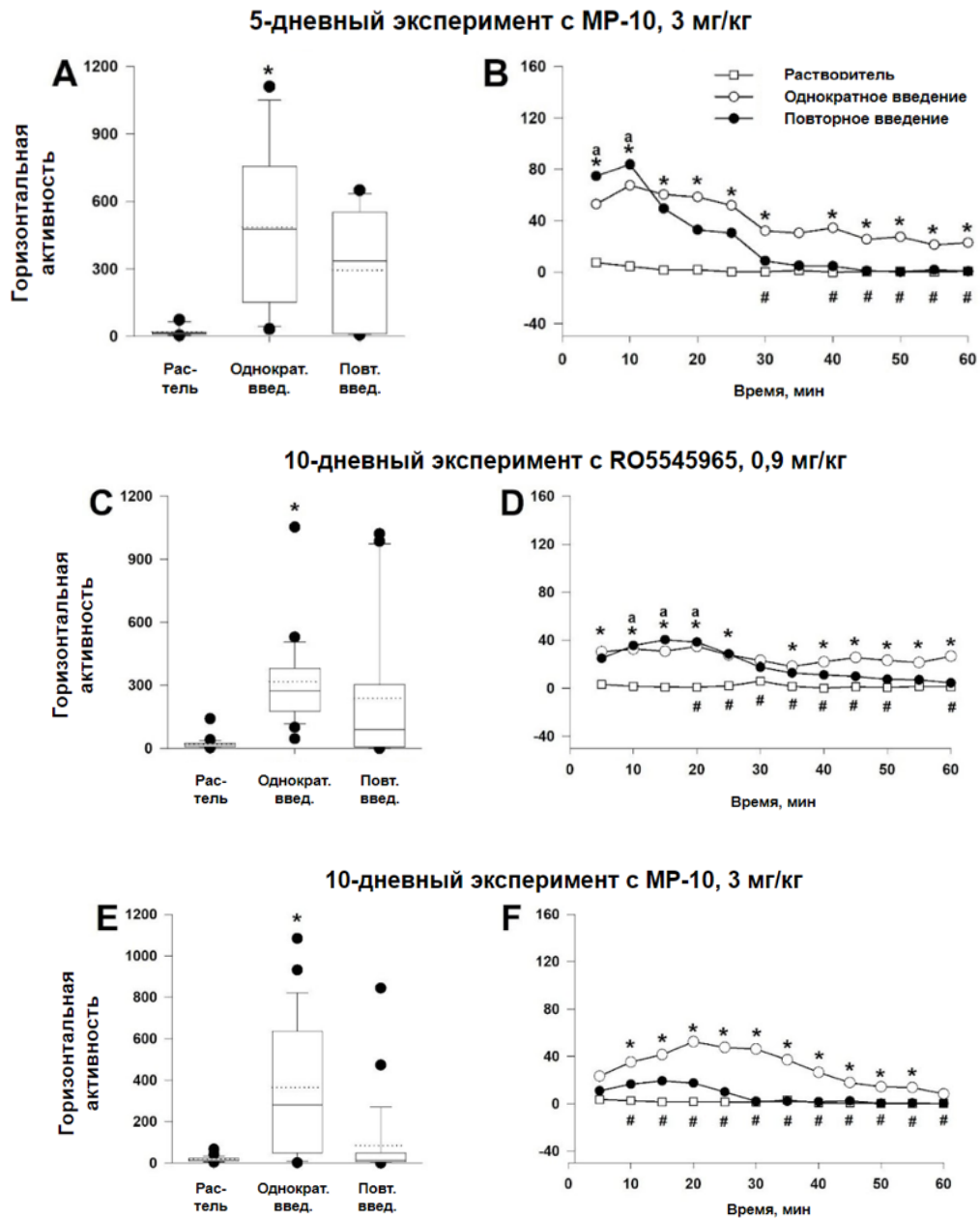
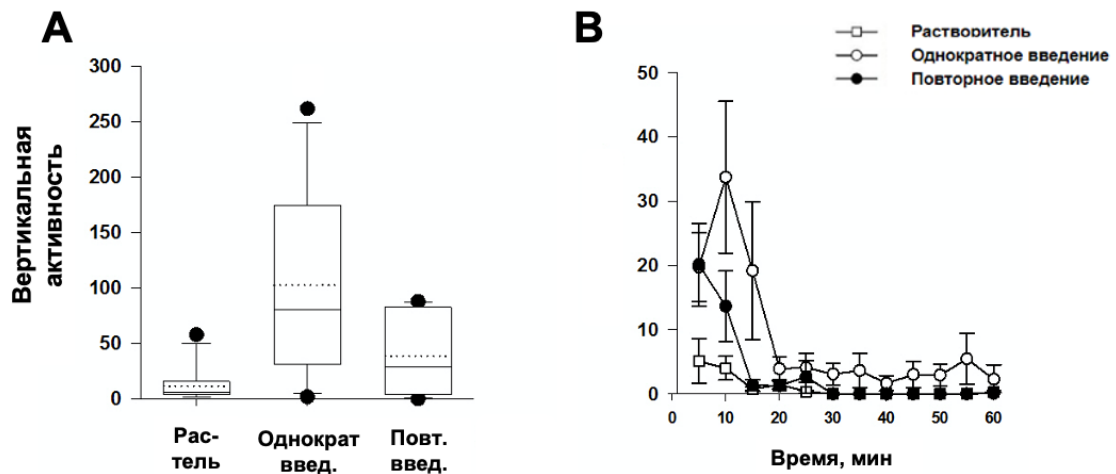


Рисунок 4 – Эффекты повторного введения ингибиторов PDE10A на горизонтальную активность у животных на модели TBZ-индуцированной гипоактивности (фармакологическая модель). * – $p < 0,05$ (А, С, Е: тест Тьюки; В, D, F: тест Бонферрони) ‘однократное введение’ vs. ‘растворитель; а – $P < 0.05$ (тест Бонферрони) ‘повторное введение’ vs. ‘растворитель’; # – $P < 0.05$ (тест Бонферрони) ‘повторное введение’ vs. ‘однократное введение’.

Данные на рисунках А, С, Е представлены в виде блочных диаграмм – «ящичков с усами», отражающих в центре ящичков среднее значение (пунктирная линия) и медиану (сплошная линия); 25%/75% квартили (нижняя и верхняя кромки

ящика), 10-й и 90-й проценти́ли (нижняя и верхняя засечки усов). Данные на рисунках B, D, F представлены в виде средних арифметических.

5-дневный эксперимент с MP-10, 3 мг/кг



10-дневный эксперимент с RO5545965, 0,9 мг/кг

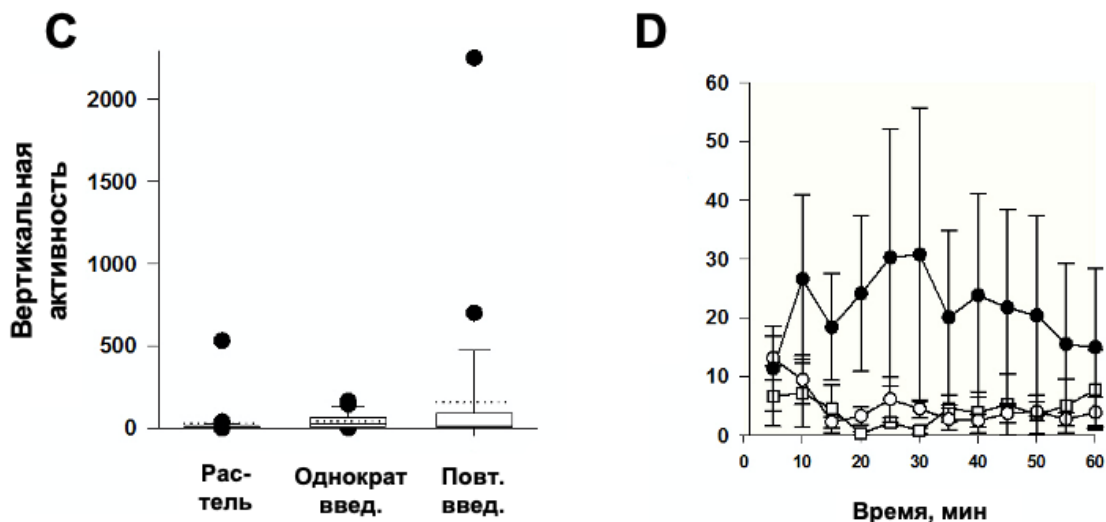


Рисунок 5 – Эффекты повторного введения ингибиторов PDE10A на вертикальную активность у животных на модели TBZ-индуцированной гипоактивности (фармакологическая модель).

Данные на рисунках A, C представлены в виде блочных диаграмм – «ящиков с усами», отражающих в центре ящиков среднее значение (пунктирная линия) и медиану (сплошная линия); 25%/75% квантили (нижняя и верхняя кромки ящика), 10-й и 90-й проценти́ли (нижняя и верхняя засечки усов). Данные на рисунках B, D представлены в виде средних арифметических.

3.1.4 Эффекты перекрестного введения ингибиторов PDE10

На основании результатов ранее проведенных экспериментов с однократным/повторным введением ингибиторов PDE10A был спланирован десятидневный эксперимент для оценки действия исследуемых соединений RO5545965 и MP-10 при их перекрестном введении.

Как и в предыдущих экспериментах обнаружены статистически значимые различия между экспериментальными группами (тест Краскела-Уоллиса: $H=9,26$; $df=3$, $p<0,05$), связанные со выраженной стимулирующей активностью при однократном введении RO5545965 (группа 4). Как видно на рисунке 6, уровень горизонтальной активности животных в группе 4 значимо отличается от такового в контрольной группе, не получавшей ингибиторы PDE10A (тест Данна с поправкой Бенджамини — Хохберга, $p=0,047$). При этом, данный показатель у животных в группе 3 (MP-10 – в периоде предшествующего введения, RO5545965 – в условиях экспериментального дня) достоверно не отличается от группы растворителя и животных после десятидневного введения MP10 (тест Данна с поправкой Бенджамини — Хохберга, $p=0,646$ и $p=0,471$ соответственно).

На рисунке 7 приведены вспомогательные результаты касательно эффектов перекрестного введения ингибиторов PDE10A на вертикальную активность животных.

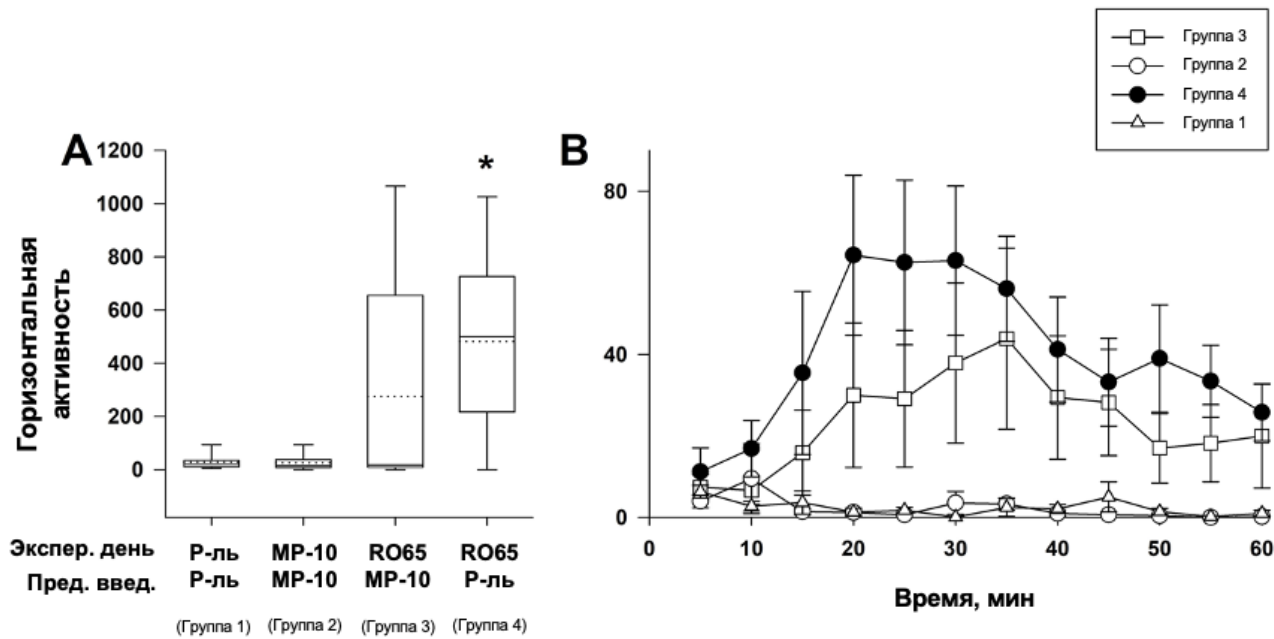


Рисунок 6 – Эффекты ингибиторов PDE10A в условиях перекрестного введения на горизонтальную активность у животных на модели TBZ-индуцированной гипоактивности (фармакологическая модель). * – $p < 0,05$ (теста Данна с поправкой Бенджамини — Хохберга).

Данные на рисунке А представлены в виде блочных диаграмм – «ящичков с усами», отражающих в центре ящичков среднее значение (пунктирная линия) и медиану (сплошная линия); 25%/75% квантили (нижняя и верхняя кромки ящичка), 10-й и 90-й процентиля (нижняя и верхняя засечки усов). Данные на рисунке В представлены в виде средних арифметических.

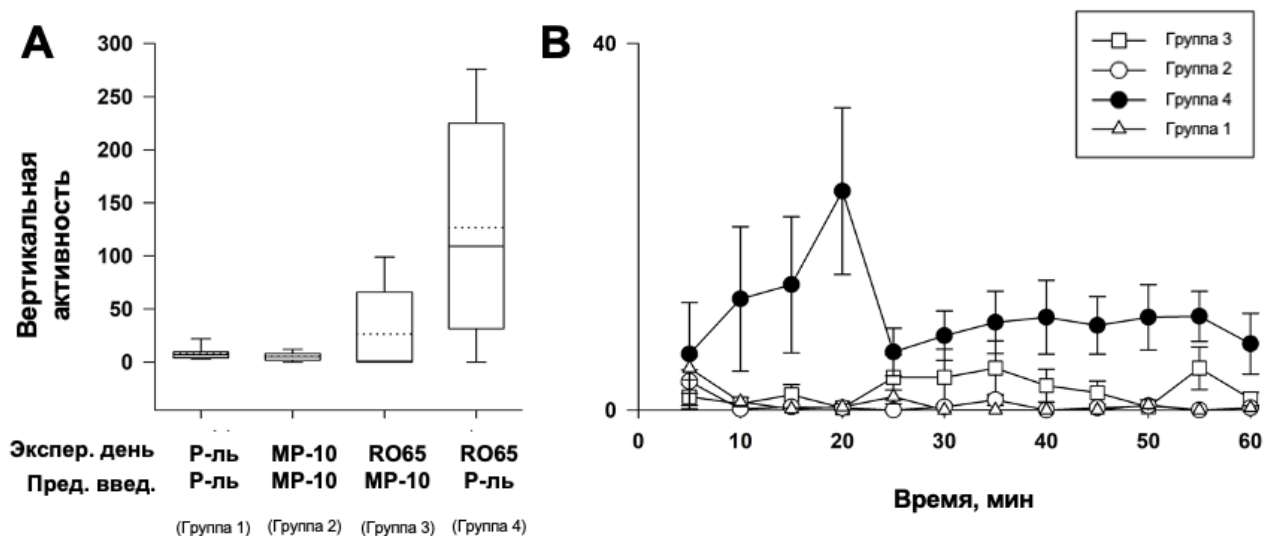


Рисунок 7 – Эффекты ингибиторов PDE10A в условиях перекрестного введения на вертикальную активность у животных на модели TBZ-индуцированной гипоактивности (фармакологическая модель).

Данные на рисунке А представлены в виде блочных диаграмм – «ящичков с усами», отражающих в центре ящичков среднее значение (пунктирная линия) и медиану (сплошная линия); 25%/75% квантили (нижняя и верхняя кромки ящичка), 10-й и 90-й процентиля (нижняя и верхняя засечки усов). Данные на рисунке В представлены в виде средних арифметических.

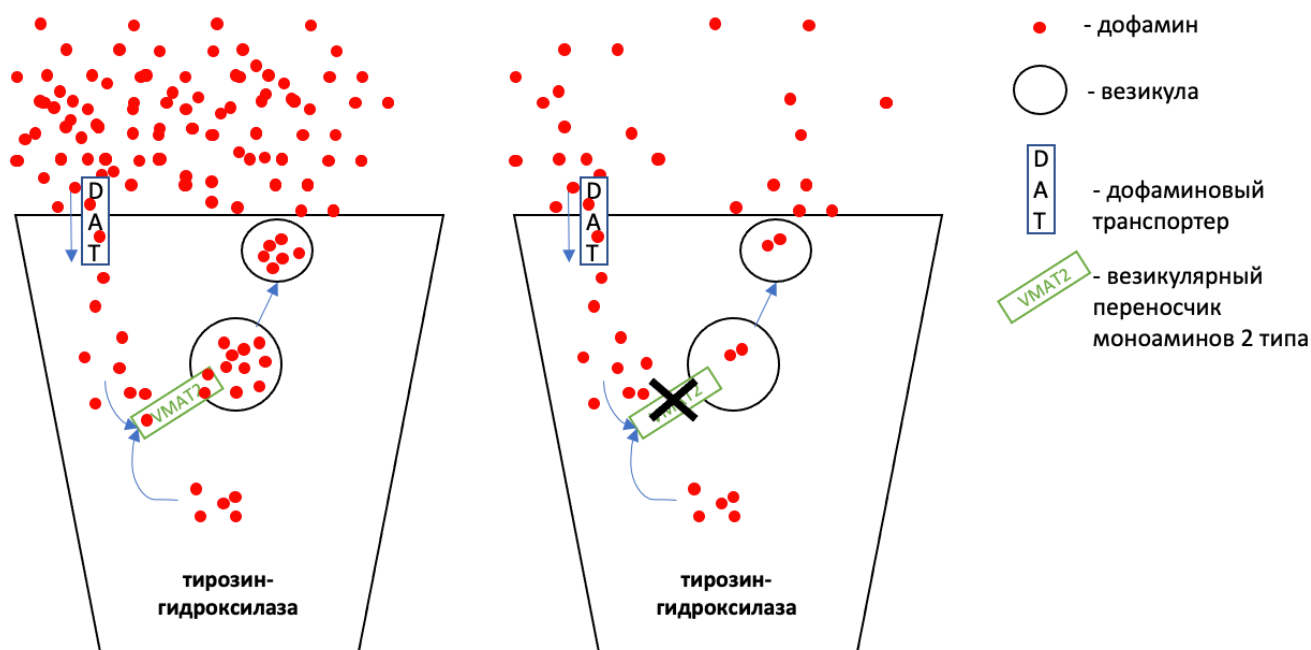
3.1.5 Обсуждение результатов экспериментов с использованием фармакологической модели

На основании результатов проведенных экспериментов можно сделать вывод, что оба ингибитора PDE10A (MP-10 – в дозах 3 и 5 мг/кг, RO5545965 – в дозе 0,9 мг/кг) обладают стимулирующим действием на двигательную активность животных, находящихся под воздействием TBZ. При этом введение малых доз ингибиторов PDE10A вызывало усиление гипокинетического действия TBZ.

На первый взгляд полученные результаты представляются парадоксальными, в связи с тем, что опубликованные доклинические и клинические данные свидетельствуют преимущественно о седативных эффектах

соединений данной группы [107]. Известно, что ингибиторы PDE10A способны подавлять локомоторную активность как у интактных животных, так и у животных с гиперактивностью, вызванной введением блокаторов дофаминавого транспортера (амфетамин, метафетамин и др.) или антагонистов глутаматных-рецепторов NMDA-подтипа (МК-801, фенциклидин) (подробнее см. раздел 1.3.4. и таблицу 4). Такой профиль фармакологической активности является вполне прогнозируемым для ингибиторов PDE10A, выступающих в роли функциональных антагонистов D2-подобных рецепторов. Однако, в связи с особенностями экспрессии PDE10A, соединения данного класса также способны активировать «прямой» путь, частью которого являются D1-экспрессирующие MSNs, и проявлять активность, характерную для агонистов D1-подобных рецепторов [129]. При этом D2-опосредованные эффекты ингибиторов, связанные с модуляцией «непрямого» пути, значительно более выражены и именно их фенотипические проявления наблюдаются у животных с нормальной или повышенной дофаминергической передачей [16, 146].

В настоящем исследовании стимулирующие эффекты изучаемых соединений на двигательную активность детектированы у животных в условиях гиподофаминергии, вызванной введением TBZ, ингибитора везикулярного переносчика моноаминов 2 типа (VMAT2). VMAT2 играет ключевую роль в процессе транспорта моноаминов (в том числе дофамина) в везикулы, предназначенные для последующего хранения нейротрансмиттеров и предотвращения их утилизации внутриклеточными ферментами. Применение TBZ блокирует данный процесс, что ускоряет метаболизм и деградацию моноаминов и приводит к значительному снижению внутриклеточного дофамина [157] (рисунок 8). Таким образом, именно в условиях сниженной концентрации дофамина стало возможным выявить стимулирующую активность MP-10 и RO5545965.



Wistar

Wistar + TBZ

Рисунок 8 – Фармакологическая модель – принцип формирования гиподофаминергического состояния. TBZ блокирует везикулярный переносчик моноаминов 2 типа, что приводит к снижению транспорта моноаминов в везикулы и последующему их разрушению. TBZ – тетрабеназин.

Полученные результаты соотносятся с данными, опубликованными в отношении других ингибиторов PDE10A (JNJ-42314415, TP-10, PQ-10), которые свидетельствуют о способности данной группы соединений снижать двигательную гипоактивность, вызванную Ro-4-1284 (блокатор VMAT2), галоперидолом (антагонистом D2-подобных рецепторов) и SCH-23390 (антагонистом D1-подобных рецепторов) [106].

Также проведенные эксперименты позволяют зафиксировать общий тренд в отношении снижения величины специфических фармакодинамических эффектов ингибиторов PDE10A при их повторном введении в течение 5-10 дней. Данное наблюдение применимо как для MP-10, так и для RO5545965 и свидетельствует в пользу выработки фармакологической толерантности к стимулирующим (D1-опосредованным) эффектам у соединений данного класса. В целом для соединений, применяющихся при состояниях, ассоциированных с

гиподофаминергией, для снижения проявлений двигательных нарушений проблема лекарственной толерантности стоит довольно остро. Классическим примером является снижение клинической эффективности L-DOPA при длительном лечении болезни Паркинсона, возникающей за счет развития толерантности к стимулирующим эффектам данного препарата [64, 75, 115]. Схожая проблема характерна и для экспериментальных противопаркинсонических средств, таких как агонисты D1-рецепторов [92, 160]. Для данной группы соединений к их выраженным стимулирующим эффектам на двигательную активность развивается толерантность, что ограничивает их последующее клиническое изучение и разработку [101].

Интересно, что многократное введение ингибиторов PDE10A, по всей видимости, не приводит к развитию толерантности к их D2-опосредованным эффектам. Об этом свидетельствуют как собственные экспериментальные данные, подтверждающие устойчивость нарушений (характерных для D2-антагонистов) оперантного поведения, вызванного введением MP-10 (3 мг/кг) (данные не приведены), так опубликованные данные, указывающие на устойчивость эффектов ингибиторов PDE10A при их повторном применении (в течение 14 и 15 дней) у животных с гиперактивностью, вызванной введением психостимуляторов [134, 140].

Отдельного внимания заслуживают результаты, полученные в ходе проведения предварительного эксперимента по изучению перекрестной толерантности к экспериментально-терапевтическим эффектам ингибиторов PDE10A. Нами были получены пилотные данные о наличии перекрестной толерантности к стимулирующему действию изучаемых соединений (MP10 и RO5545965) на фармакологической модели паркинсонизма. Эти данные позволяют предположить, что показанная ранее толерантность вероятно носит не фармакокинетический, а фармакодинамический характер. К сожалению, полученные нами данные на текущем этапе не позволяют идентифицировать механизм развития лекарственной толерантности, для этого требуется проведение

отдельных *in vitro* для оценки экспрессии и активности PDE разных изоформ в стриатуме, что позволит исследовать характер адаптационных изменений и их возможное влияние на формирование толерантности.

Полученные результаты опубликованы в работе с соавторами [3].

3.2 Изучение эффектов ингибиторов PDE10A на модели α MPT-индуцированной гипоактивности/катаlepsии

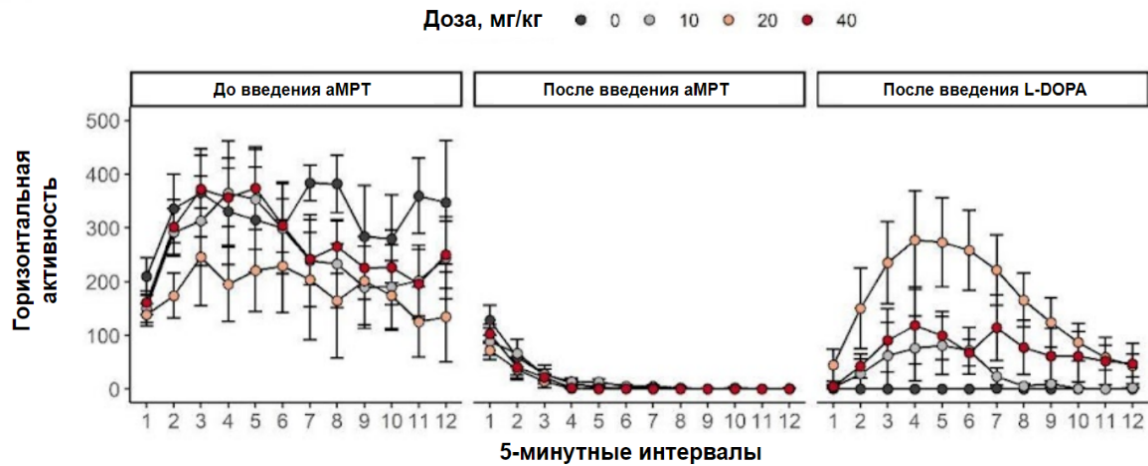
3.2.1 Валидация фармакогенетической модели

Для валидации фармакогенетической модели гиподопаминергических состояний проведены эксперименты с однократным введением комбинации препаратов стандартной терапии болезни Паркинсона (L-DOPA+карбидопа).

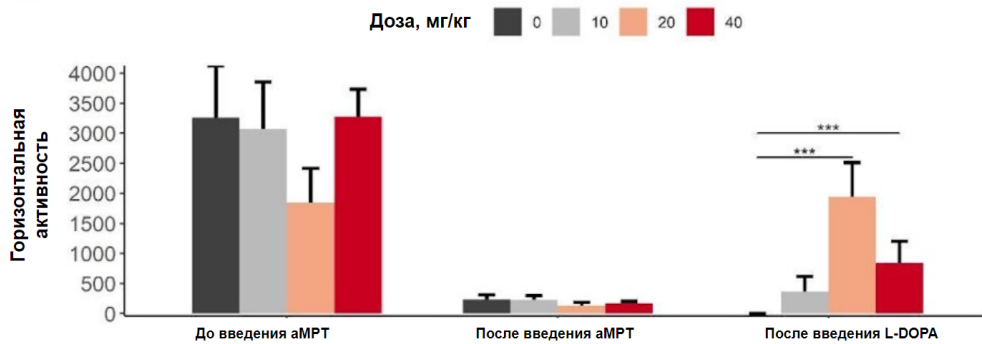
В полном соответствии с ранее опубликованными данными [136] введение α MPT DAT-КО животным приводило к тотальному падению уровня двигательной активности (рисунок 9А, В). При проведении дисперсионного анализа не обнаружено значимого влияния фактора «доза» ($F(3,26)=2,024$; $p=0,135$), при этом влияние фактора «фаза» (до введения α MPT, после введения α MPT и L-DOPA) ($F(2,52)=60,073$; $p<0,001$) и его взаимодействие с фактором «доза» ($F(6,52)=6,725$; $p<0,001$) достигали статистической значимости. Введение комбинации L-DOPA+карбидопа (20+10 и 40+10 мг/кг) приводило к обращению гипоактивности и достоверному увеличению горизонтальной двигательной активности животных (тест Данна, $p<0,001$) (рисунок 9В).

После введения α MPT помимо гипокинезии у животных также наблюдали проявления катаlepsии, детектированные в тесте «перекладина». Иными словами, введение α MPT приводило к увеличению времени нахождения животных в «позе лектора» во всех экспериментальных группах (рисунок 9С). При этом последующее введение комбинации L-DOPA+карбидопа приводило к обращению катаlepsии и значимому снижению времени нахождения в «позе лектора» во всех изучаемых дозах (тест Данна, $p<0,001$). Дисперсионный анализ выявил значимое

A



B



C

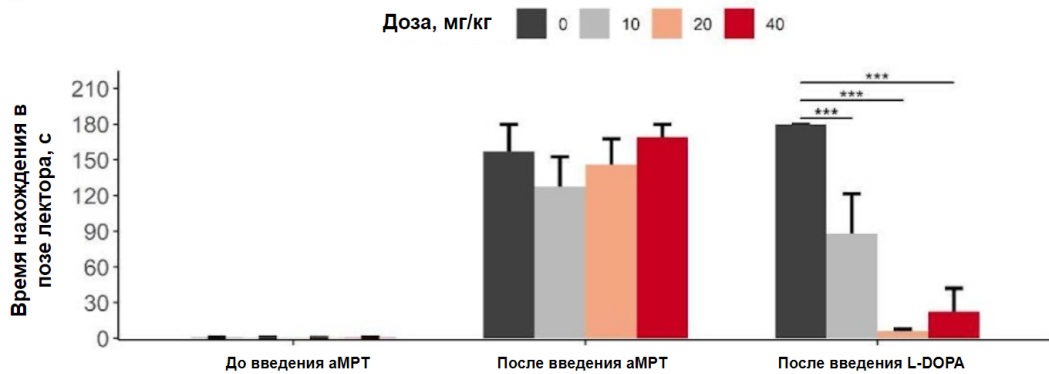


Рисунок 9 – Эффекты однократного введения комбинации L-DOPA+карбидопа на локомоторную активность (A, B) и уровень каталепсии (C) у DAT-KO крыс на модели αMPT-индуцированной гипоактивности/каталепсии (фармакогенетическая модель). *** – $p < 0.001$ (тест Данна) относительно группы с растворителем (0 мг/кг).

Данные на рисунках представлены в виде среднего арифметического $\pm$ стандартная ошибка среднего.

влияние факторов «доза» ($F(3,78)=6,561$; $p<0,001$) и «фаза» ($F(2,78)=152,747$; $p<0,001$), а также значимое влияния их взаимодействия ($F(6,78)=6,465$; $p<0,001$) (рисунок 9С).

Дополнительный анализ выживаемости для данных, полученных в ходе теста «перекладина», показал отсутствие значимых различий между экспериментальными группами до введения α MPT ($\chi^2=0,8$; $df=3$; $p=0,9$). Последующее введение α MPT приводило к увеличению вероятности нахождения в исходной позе, значимых различий между экспериментальными группами зафиксировано не было ($\chi^2=3,4$; $df=3$; $p=0,3$). Применение комбинации L-DOPA+карбидопа демонстрировало снижение вероятности нахождения в исходной позе ($\chi^2=16,3$, $df=3$, $p=0,001$). Попарные сравнения подтвердили статистически значимое снижение для доз 20+10 и 40+10 мг/кг в сравнении с растворителем. В графическом виде данные анализа выживаемости приведены на рисунке 10.

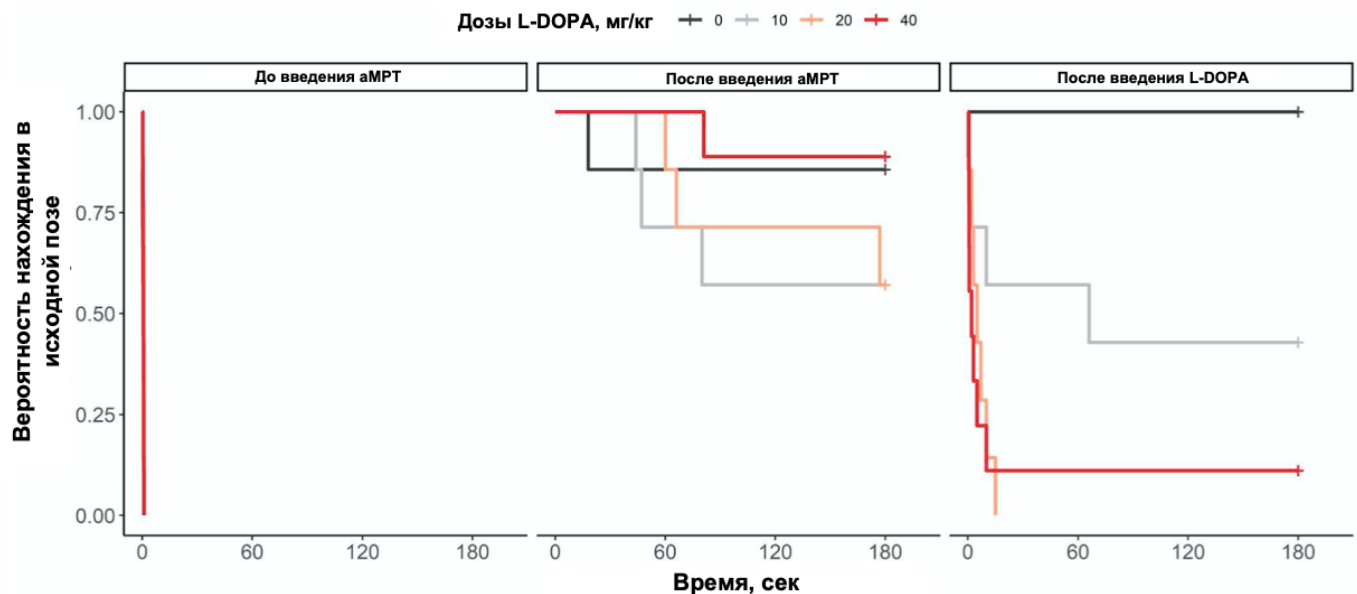


Рисунок 10 – Эффекты однократного введения комбинации L-DOPA+карбидопа на уровень каталепсии у DAT-KO крыс на модели α MPT-индуцированной гипоактивности/каталепсии (фармакогенетическая модель).

Данные о времени нахождения в «позе лектора» приведены в виде графика

Каплана-Мейера.

Для подтверждения того, что применение α MPT у DAT-KO крыс вызывает критическое снижение дофамина в структурах головного мозга, в рамках биоаналитической части исследования проводили оценку содержания дофамина в стриатуме и фронтальной коре у животных после окончания поведенческих тестов. Данные представлены на рисунке 11.

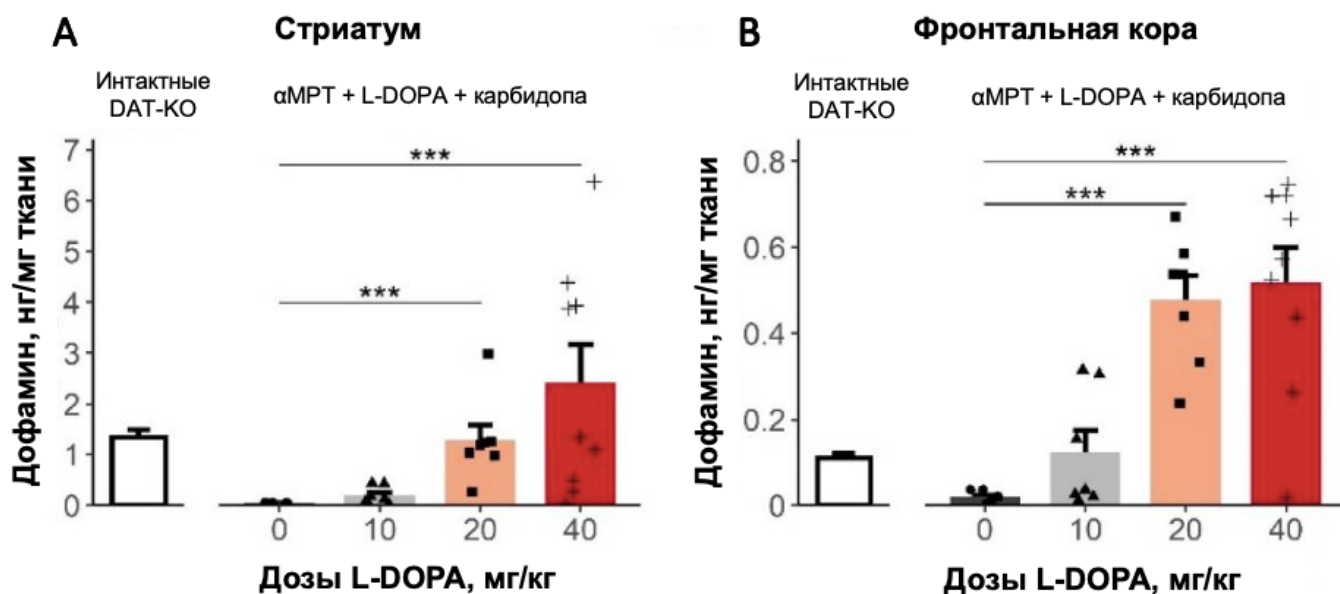


Рисунок 11 – Содержание дофамина в стриатуме (А) и фронтальной коре (Б) головного мозга после однократного введения комбинации L-DOPA+карбидопа у DAT-KO крыс на модели α MPT-индуцированной гипоактивности/каталепсии (фармакогенетическая модель). *** – $p < 0,001$ (тест Данна) относительно группы с растворителем (0 мг/кг).

Данные на рисунках представлены в виде среднего арифметического $\pm$ стандартная ошибка среднего. Отдельные значения представлены в виде точки, треугольника, квадрата и знака плюс для соответствующих доз исследуемых соединений.

В соответствии с нашими ожиданиями после введения α MPT уровень дофамина значительно снижался в сравнении с интактными DAT-KO животными (исторические данные, полученные вне экспериментов диссертационного

исследования). Последующее введение комбинации L-DOPA+карбидопа сопровождалось увеличением содержания дофамина как в стриатуме (тест Краскела-Уоллиса: $H=17,349$; $df=3$; $p<0,001$)), так и во фронтальной коре (тест Краскела-Уоллиса: $H=17,907$; $df=3$; $p<0,001$). Эффект достигал статистической значимости для доз 20+10 и 40+10 мг/кг в сравнении с растворителем (тест Данна, $p<0,001$).

3.2.2 Эффекты однократного введения ингибиторов PDE10A

Для изучения эффектов МР-10 на модели α MPT-индуцированной гипоактивности/катаlepsии проведен отдельный эксперимент на независимой когорте животных. Введение α MPT у животных приводило к двигательным нарушениям (гипокинезия и катаlepsия) аналогичным таковым в эксперименте с L-DOPA+карбидопа. Для оценки эффектов МР-10 была предусмотрена оценка двигательной активности и оценка уровня катаlepsии в течение более длительного периода времени после введения исследуемого соединения (более подробная информация о дизайне и фазах эксперимента приведена в разделе 2.3.2 и таблице 9).

По результатам проведенного эксперимента выявлено, что однократное введение МР-10 (в диапазоне доз от 1 до 5 мг/кг) приводило к восстановлению двигательных функций у крыс с выраженной гиподофаминергией (рисунок 12).

Было показано:

- увеличение горизонтальной активности и обращение гипокинезии («доза»: $F(3,31)=8,610$; $p<0,01$); «фаза»: $F(4,124)=85,719$; $p<0,001$); «доза» x «фаза»: $F(12,124)=2,965$; $p<0,01$). Статистически значимые различия в сравнении с растворителем достигнуты для всех изучаемых доз на 3-6 фазах эксперимента, т.е. при измерении двигательной активности спустя 90 мин и более после введения соединения животному (тест Данна, $p<0,05$) (рисунок 12В);

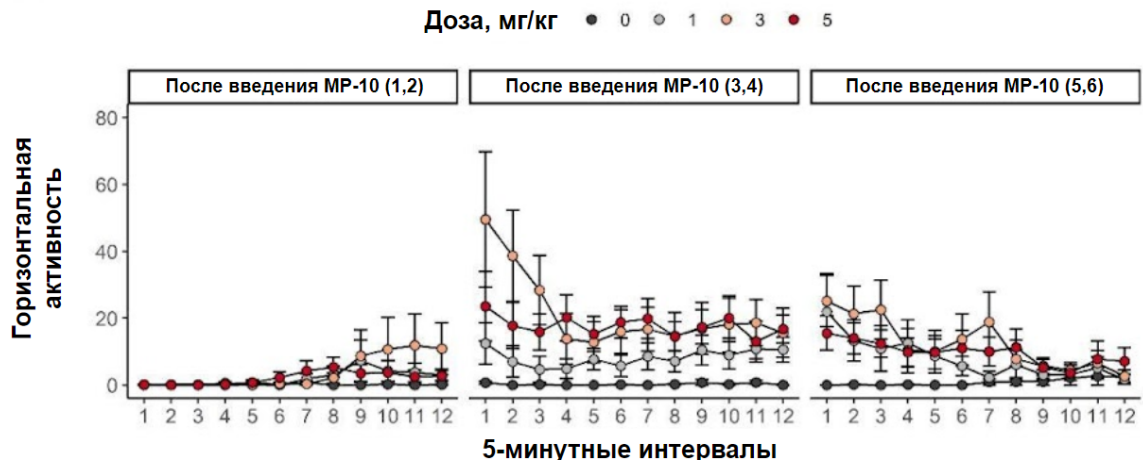
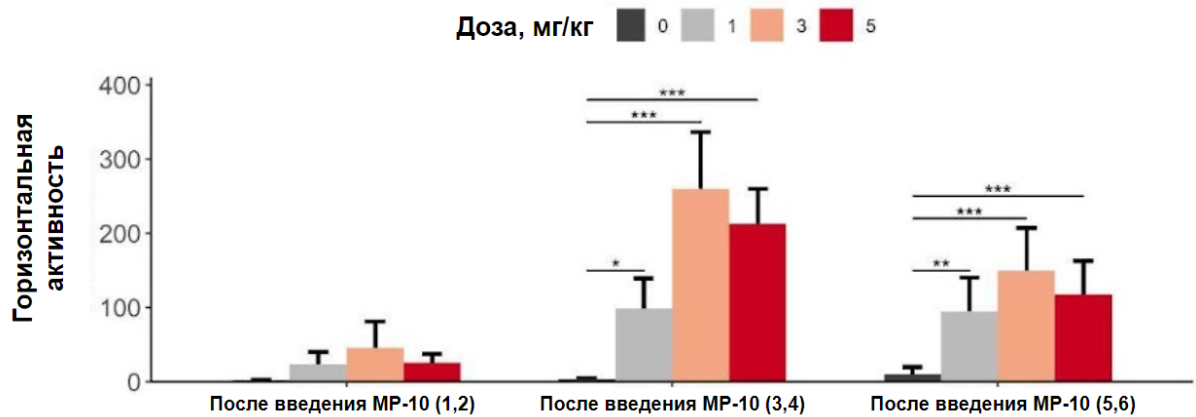
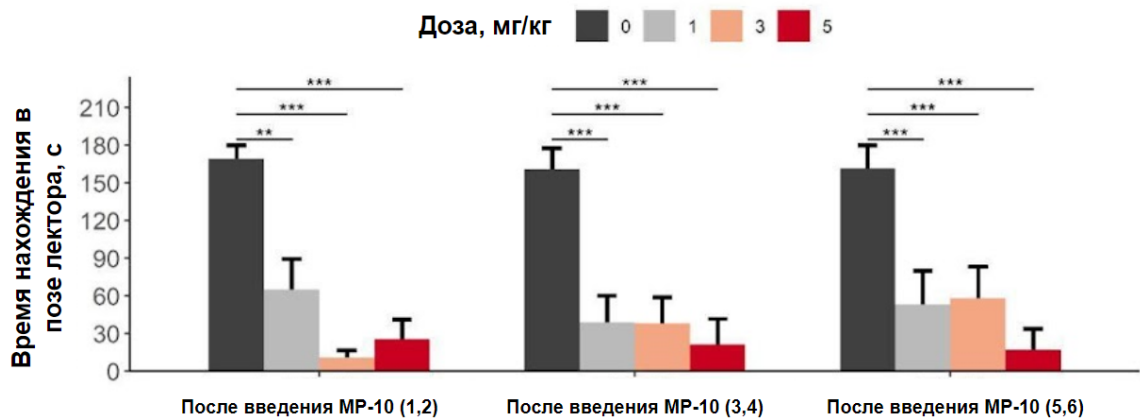
A**B****C**

Рисунок 12 – Эффекты однократного введения МР-10 на локомоторную активность (А, В) и уровень каталепсии (С) у DAT-КО крыс на модели α MPT-индуцированной гипоактивности/каталепсии (фармакогенетическая модель). Фазы эксперимента на данном графике соответствуют описанию в таблице 9. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ (тест Данна) относительно группы с растворителем (0 мг/кг). Данные на рисунках представлены в виде среднего арифметического $\pm$ стандартная ошибка среднего.

- снижение времени пребывания в «позе лектора» и, соответственно, выраженности каталепсии («доза»: $F(3,31)=13,573$; $p<0,001$); «фаза»: $F(4,124)=39,425$; $p<0,001$); «доза» x «фаза»: $F(12,124)=7,162$; $p<0,001$). Post hoc анализ продемонстрировал статистически значимое снижение времени пребывания в «позе лектора» после введения всех изучаемых доз МР-10 в сравнении с растворителем для всех измерений, полученных в тесте «перекладина» (рисунок 12С).

По аналогии с экспериментами по изучению эффектов комбинации L-DOPA+карбидопа проводили дополнительный анализ выживаемости для данных, полученных в ходе теста «перекладина». В ходе анализа выявлено, что введение МР-10 приводило к значимому снижению вероятности нахождения в исходной позе:

- Фаза 1,2 (оценка каталепсии спустя 90 мин от введения): $\chi^2=23,9$, $df=3$, $p<0,001$; 1 мг/кг vs растворитель $p<0,05$; 3 мг/кг vs растворитель $p<0,001$; 5 мг/кг vs растворитель $p<0,01$;

- Фаза 3,4 (оценка каталепсии спустя 150 мин от введения): $\chi^2=16,0$, $df=3$, $p=0,01$; 1 мг/кг vs растворитель $p<0,05$, 3 мг/кг vs растворитель $p<0,001$, 5 мг/кг vs растворитель $p<0,001$;

- Фаза 5,6 (оценка каталепсии спустя 210 мин от введения): $\chi^2=19,4$, $df=3$, $p<0,001$; 1 мг/кг vs растворитель $p<0,05$, 3 мг/кг vs растворитель $p<0,01$, 5 мг/кг vs растворитель $p<0,001$.

В графическом виде данные анализа приведены на рисунке 13.

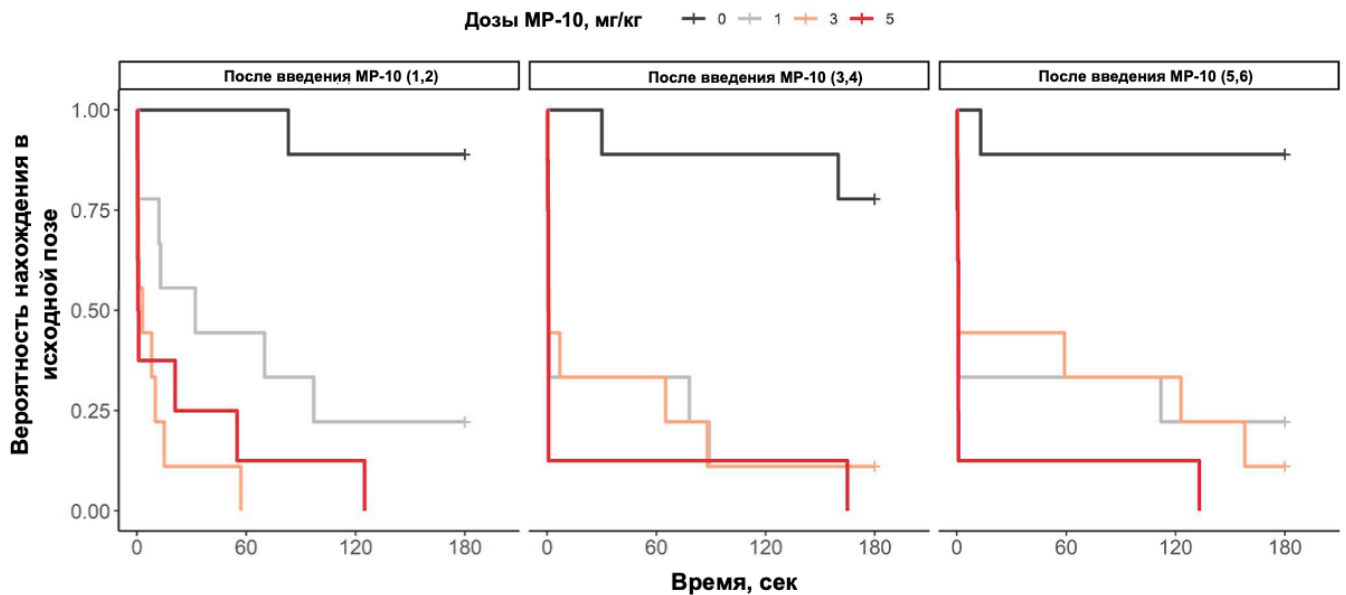


Рисунок 13 – Эффекты однократного введения МР-10 на уровень каталепсии у DAT-КО крыс на модели α MPT-индуцированной гипоактивности/каталепсии. (фармакогенетическая модель). Фазы эксперимента на данном графике соответствуют описанию в таблице 9.

Данные о времени нахождения в «позе лектора» приведены в виде графика Каплана-Мейера.

После окончания *in vivo* части эксперимента, аналогично с предыдущими тестами с L-DOPA+карбидопа, анализировали содержания дофамина в образцах стриатума и фронтальной коры животных. На фоне действия МР-10 не обнаружено значимых изменений содержания дофамина как в стриатуме, (тест Краскела-Уоллиса: $H=3,584$; $df=3$; $p=0,31$), так и во фронтальной коре (тест Краскела-Уоллиса: $H=4,564$; $df=3$; $p=0,21$) (рисунок 14).

Полученные результаты опубликованы в работе с соавторами [139].

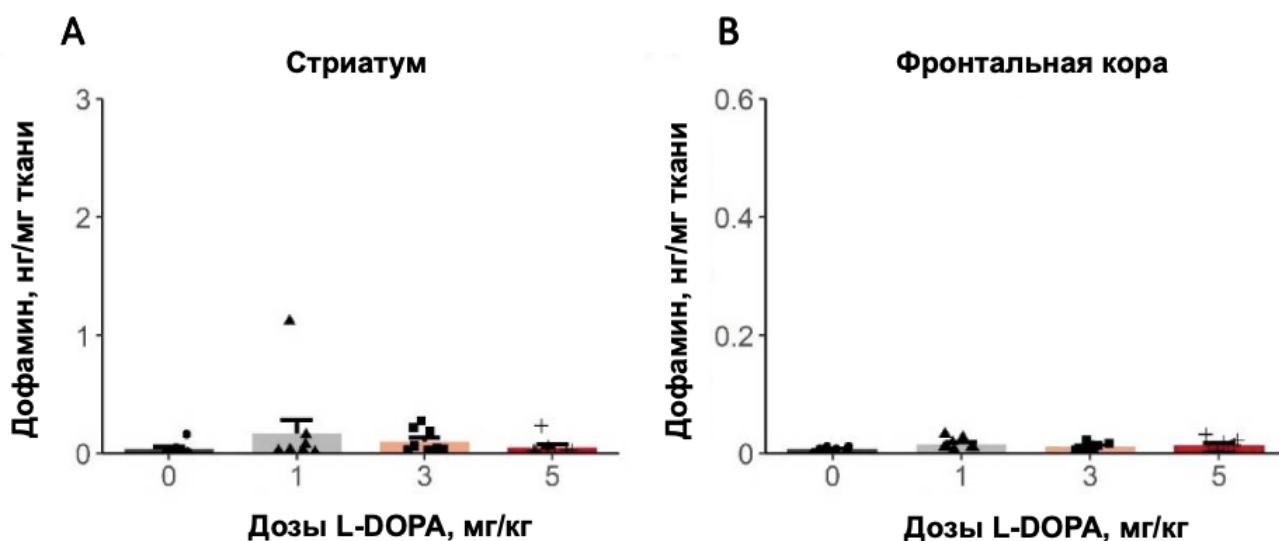


Рисунок 14 – Содержание дофамина в стриатуме (А) и фронтальной коре (В) головного мозга после однократного введения MP-10 у DAT-KO крыс на модели α MPT-индуцированной гипоактивности/каталепсии (фармакогенетическая модель). *** – $p < 0.001$ (тест Данна) относительно группы с растворителем (0 мг/кг).

Данные на рисунках представлены в виде среднего арифметического $\pm$ стандартная ошибка среднего. Отдельные значения представлены в виде точки, треугольника, квадрата и знака плюс для соответствующих доз исследуемых соединений.

3.2.3 Эффекты повторного введения ингибиторов PDE10A

В экспериментах по изучению эффектов повторного введения MP-10 (3 мг/кг, ежедневно) и RO5545965 (0,3 мг/кг, ежедневно) в течении 5 дней установлено, что в группе повторного введения животные дольше пребывают в «позе лектора» в сравнении с животными в группе однократного введения как для MP-10, так и для RO5545965 (рисунок 15А, В). В эксперименте с RO5545965 результаты дисперсионного анализа показывают статистически значимое влияние фактора «группа» ($F(2,9)=7,394$; $p < 0,05$), при этом влияние фактора «время» (от введения исследуемого соединения) ($F(3,27)=12,027$; $p < 0,001$) и их взаимодействие ($F(6,27)=3,301$; $p < 0,05$) также достигали уровня статистической значимости. Результаты post hoc анализа (тест Даннета, $p < 0,05$) в графическом

виде приведены на рисунке 15В. В эксперименте с МР-10 также обнаружены статистически значимые различия между экспериментальными группами (тест Краскела-Уоллиса: $H=6,84$; $df=2$, $p<0,05$), значения в группе однократного введения соединения достоверно отличались от таковых в группе растворителя (тест Данна, $p<0,05$).

В эксперименте с повторным введением выявленное стимулирующее действие RO5545965 достигало наибольших показателей спустя 4 часа от введения соединения (рисунок 15С). Более детальный анализ горизонтальной активности на данной временной точке выявил достоверное влияние фактора «группа» ($F(2,9)=35,239$; $p<0,001$) и «время» ($F(5,45)=2,716$; $p<0,05$), взаимодействие данных факторов оказалось статистически незначимым ($F(10,45)=0,898$; $p=0,54$). Результаты *post hoc* анализа (тест Даннета, $p<0,05$) в графическом виде приведены на рисунке 15С.

3.2.4 Обсуждение результатов экспериментов с использованием фармакогенетической модели

Для оценки эффектов ингибиторов PDE10A нами была апробирована и валидирована фармакогенетическая модель гиподофаминергических состояний у крыс. Для моделирования данного состояния были выбраны DAT-КО животные, у которых в связи с нарушением процесса обратного захвата дофамина происходит его накопление во внеклеточном пространстве. Это приводит к усилению дофаминергической нейротрансмиссии, что фенотипически проявляется наличием гиперактивности, стереотипии, а также нарушениями ассоциативного обучения [91, 127]. Нарушение обратного захвата дофамина у DAT-КО животных делает их критически зависимыми от синтеза данного нейротрансмиттера *de novo*. Это означает, что остановка процесса синтеза дофамина, например, с помощью α MPT, ингибитора фермента тирозингидроксилазы, будет сопровождаться выраженными как нейрохимическими (опустошение депо дофамина), так и поведенческими изменениями (подавление двигательной активности и развитие двигательных нарушений) (рисунок 16).

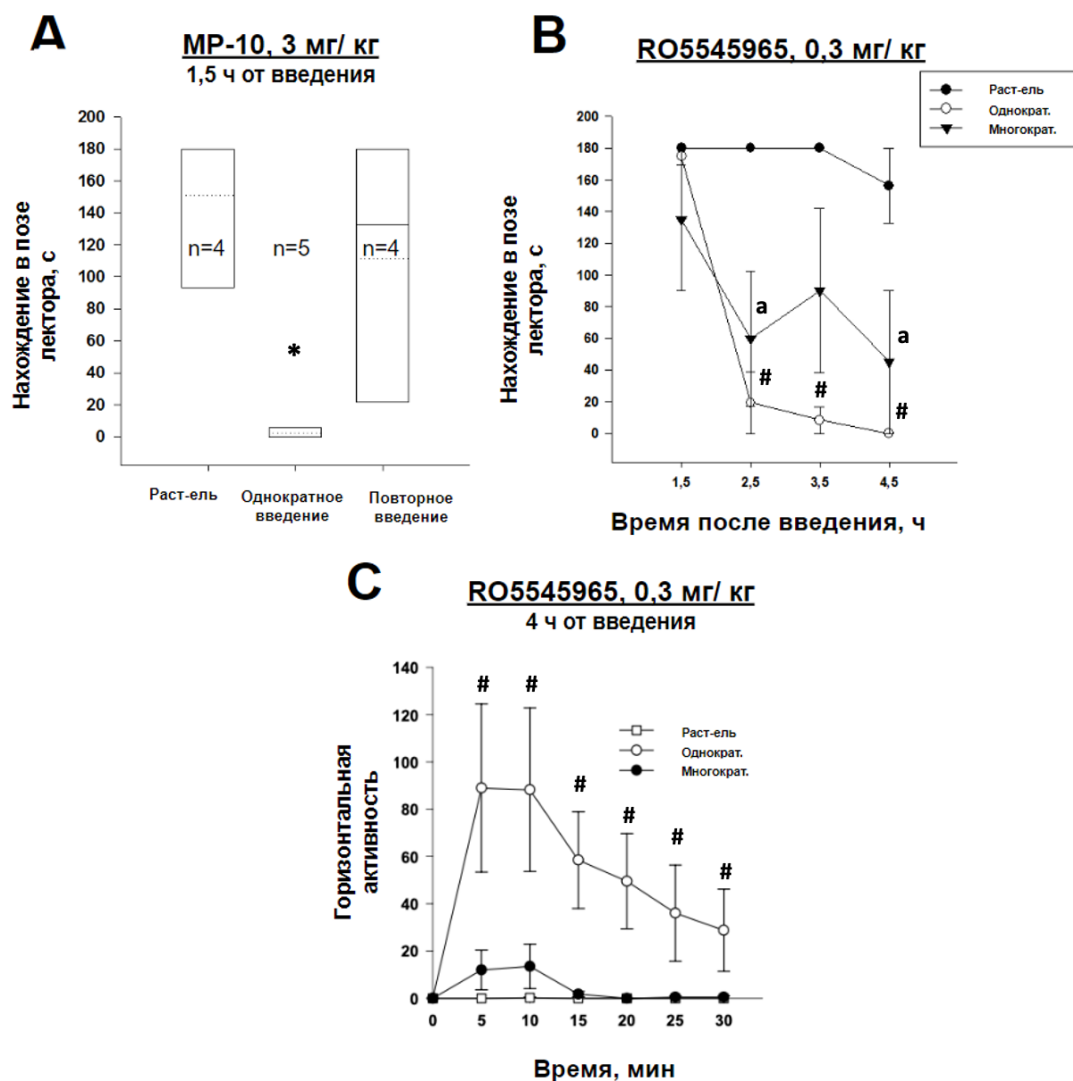


Рисунок 15 – Эффекты повторного введения MP-10 (A) и RO5545965 (B) на уровень каталепсии (A, B) и эффекты повторного введения RO5545965 на локомоторную активность (C) у DAT-KO крыс на модели α MPT-индуцированной гипоактивности/каталепсии (фармакогенетическая модель). * – $p < 0.001$ (тест Данна) относительно группы с растворителем (0 мг/кг), # – $p < 0.05$ (тест Данна) группа однократного введения относительно группы с растворителем (0 мг/кг), ^a – $p < 0.05$ (тест Данна) группа повторного введения относительно группы с растворителем (0 мг/кг).

Данные на рисунке A представлены в виде блочных диаграмм – «ящичков с усами», отражающих в центре ящичков среднее значение (пунктирная линия) и медиану (сплошная линия); 25%/75% квантили (нижняя и верхняя кромки ящичка), 10-й и 90-й процентиля (нижняя и верхняя засечки усов). Данные на рисунках B, C представлены в виде средних арифметических $\pm$ стандартная ошибка среднего.

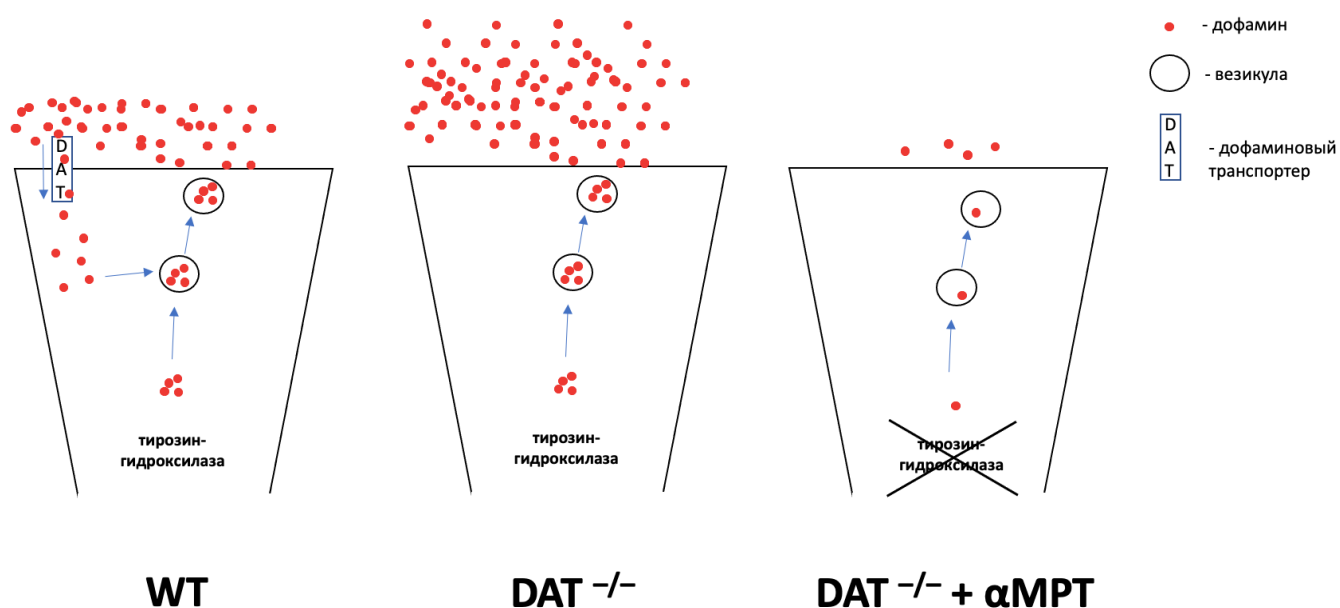


Рисунок 16 – Фармакогенетическая модель – принцип формирования гиподопаминергического состояния. Остановка процесса синтеза дофамина при использовании ингибитора тирозингидроксилазы у DAT-KO животных сопровождается «опустошением» депо дофамина и приводит к критическому снижению его концентраций в синаптической щели. WT – крысы «дикого типа», DAT^{-/-} - крысы с выключенным дофаминовым транспортером, αMPT – α-метил-DL-тирозина гидрохлорид.

Исходно данная фармакогенетическая модель реализована на DAT-KO мышах. Было продемонстрировано, что при введении αMPT DAT-KO мышам гиперактивность, характерная для данных животных, сменялась выраженной акинезией и замиранием в течение 16 часов [136]. Эти находки подтверждали нейрохимическими данными о наличии критического снижения уровня дофамина в стриатуме в сравнении с исходными значениями. В наших экспериментах мы адаптировали данную модель под крыс. В ходе апробации методики показано, что действие αMPT у крыс, в полном соответствии с ранее опубликованными данными для DAT-KO мышей, сопровождалось выраженным снижением уровня дофамина в стриатуме и фронтальной коре, а также быстрым развитием каталепсии и иммобильности у животных.

Описанный подход теоретически может быть использован для моделирования проявлений болезни Паркинсона в условиях доклинических

исследований и поиска новых лекарственных соединений терапии данного состояния. В связи с этим для валидации фармакогенетической модели в экспериментах мы проверили действие препаратов стандартной терапии болезни Паркинсона (L-DOPA+карбидопа). Результаты фармакологических тестов показали, что комбинация L-DOPA+карбидопа (в дозах 20+10 и 40+10 мг/кг) способна эффективно обращать двигательные нарушения у DAT-КО крыс, вызванные применением α MPT.

Интересно, что наибольшая доза препаратов (40+10 мг/кг) вызывала менее выраженный эффект на двигательную активность животных в сравнении с дозой 20+10 мг/кг. Это может быть связано с тем, что стимулирующее действие наиболее высоких доз L-DOPA может проявляться преимущественно в виде стереотипий, которые не детектируются датчиками локомоторных установок. При этом *ex vivo* нейрохимические данные демонстрируют дозозависимое увеличение уровня дофамина как в стриатуме, так и во фронтальной коре после введения разных доз L-DOPA, выступающего в роли экзогенного предшественника дофамина.

В отдельных экспериментах с введением ингибиторов PDE10A (MP-10 и RO5545965) также продемонстрировано восстановление двигательных функций у животных. При этом в тестах с MP-10 заметно, что выраженность стимулирующего действия соединения на горизонтальную активность не достигала значений, полученных для L-DOPA+карбидопа, но соответствовала уровню двигательной активности интактных животных дикого типа – DAT-КО после введения MP-10 (3 мг/кг) (значения спустя 90 мин от введения) *vs* горизонтальная активность самок крыс «дикого типа» за первый час: $259,7 \pm 76,8$ *vs* $328,0 \pm 25,0$ (исторические данные, полученные вне экспериментов диссертационного исследования).

Мы предполагаем, что данная разница в величине стимулирующих эффектов может быть связана с особенностями механизма действия исследуемых соединений. Так гиперактивность, вызванная введением L-DOPA, связана с активацией дофамином, синтезированным *de novo*, D1-, D2-подобных рецепторов,

в том время как ингибиторы PDE10A могут выступать в качестве функциональных агонистов D1-рецепторов (подробнее в разделах 1.3.3 и 3.1.1).

Следует отметить, что данные, полученные в экспериментах с применением ингибиторов PDE10A на фармакогенетической модели сопоставимы с таковыми для фармакологической модели. В условиях двух независимых методик, отражающих разные подходы к моделированию, были получены схожие данные о способности изучаемых соединений обращать двигательные нарушения, характерные для гиподофаминергических состояний. Полученные результаты соотносятся с таковыми ряда других ДКИ с использованием ингибиторов PDE10A и подтверждают, что их последующая разработка и применение потенциально может решить ряд медицинских проблем в нозологиях, связанных с нарушением стриарной дофаминовой нейротрансмиссии (болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, шизофрения и пр.) (подробнее в разделе 1.3.4) [129].

Обращает на себя внимание и общий для обеих моделей тренд в отношении снижения величины специфических фармакодинамических эффектов ингибиторов PDE10A в тестах с их повторным введением. Это особенно наглядно при сопоставлении результатов локомоторной активности в обеих моделях:

- Эффект ингибиторов PDE10A, направленный на увеличение горизонтальной активности, значительно угасал при введении уже в течение 5 дней;
- Данные об изменении горизонтальной активности на протяжении локомоторной сессии свидетельствуют о более быстром снижении стимулирующего действия ингибиторов PDE10A при их повторном введении (рисунки 4 и 15).

Выявленные в ходе проведенных экспериментов признаки толерантности к эффектам ингибиторов PDE10A подкрепляют наше исходное предположение о том, что одной из возможных причин неэффективности препаратов данного класса в клинических исследованиях (подробнее в разделе 1.3.5) является именно лекарственная толерантность.

3.3 Изучение эффектов агониста TAAR1

3.3.1 Полидипсия, обусловленная режимом пищевого подкрепления «Фиксированное время 60 секунд»

Эксперименты с однократным введением агониста TAAR1 RO5263397

Как видно на рисунке 17А введение RO5263397 вызывало дозозависимое и статистически значимое снижение объема воды, выпитой за экспериментальную сессию. С помощью дисперсионного анализа было установлено достоверное влияние фактора «доза» ($\chi^2 = 41,81$; $df = 4$; $p < 0,001$). Эффекты доз 3, 6 и 10 мг/кг достигли статистической значимости (тест Даннета; $p < 0,05$).

Также было продемонстрировано, что введение RO5263397 сопровождалось дозозависимым увеличением латентного периода первого касания носика бутылки (рисунок 17В). Это подтверждается значимым влиянием фактора «доза» при проведении дисперсионного анализа ($\chi^2 = 17,88$, $df = 4$, $p < 0,01$). При проведении post hoc анализа также обнаружено статистически значимое увеличение длительности латентного периода первого касания носика бутылки после применения исследуемого соединения в диапазоне доз от 1 до 10 мг/кг (тест Даннета; $p < 0,05$).

При детальном анализе количества касаний носика бутылки за экспериментальную сессию не обнаружено статистически значимых отличий между дозами RO5263397 и растворителем (таблица 12). Однако введение RO5263397 приводило к снижению продолжительности питья за экспериментальную сессию («доза»: $\chi^2 = 10,69$; $df = 4$; $p < 0,05$). Последующий статистический анализ показал значимый эффект при введении самой высокой дозы исследуемого соединения (10 мг/кг) (таблица 12).

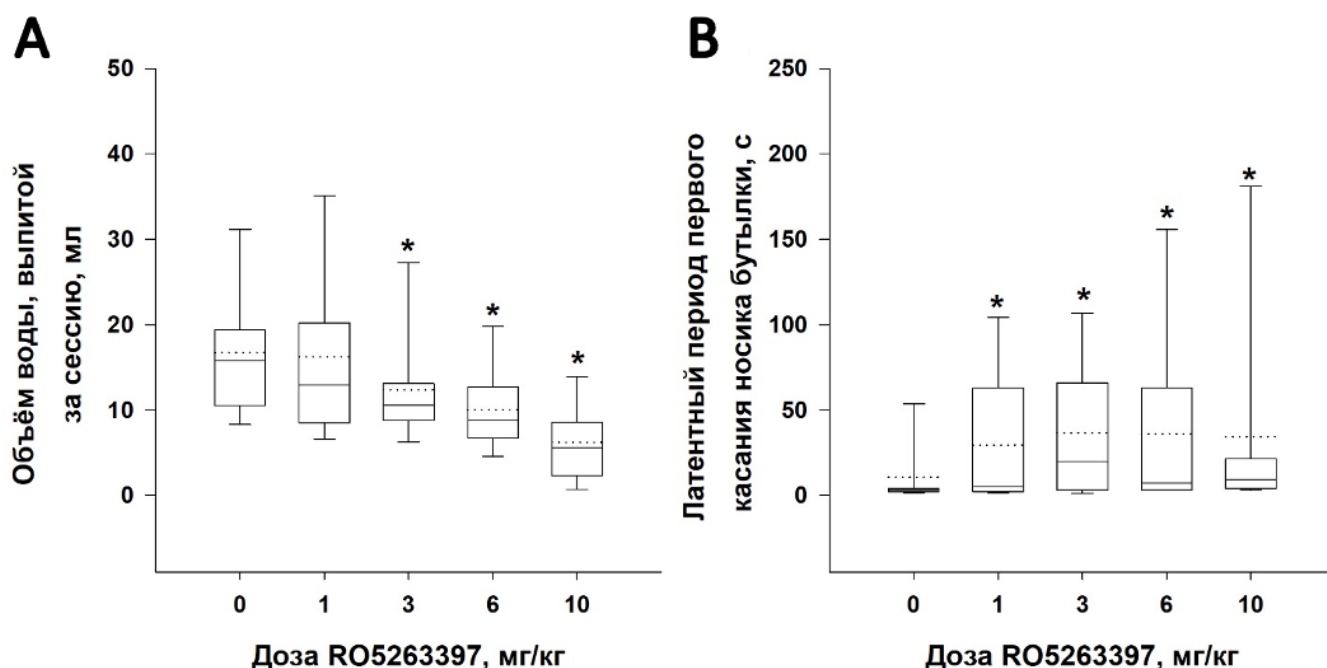


Рисунок 17 – Эффекты однократного введения RO5263397 в ФВ60 режиме ПОРПП на объем потребляемой воды (А) и латентный период первого касания носика бутылки (В) в эксперименте на крысах. * – $p < 0.05$ (тест Даннета) относительно группы с растворителем (0 мг/кг).

Данные на рисунках представлены в виде блочных диаграмм – «ящичков с усами», отражающих в центре ящичков среднее значение (пунктирная линия) и медиану (сплошная линия); 25%/75% квантили (нижняя и верхняя кромки ящичка), 10-й и 90-й процентиля (нижняя и верхняя засечки усов).

Эксперименты с повторным введением агониста TAAR1 RO5263397

Для оценки потенциала развития толерантности у агонистов TAAR1 были проведены эксперименты, позволяющие оценить динамику эффектов RO5263397 при его повторном введении в течение 7 дней на модели ПОРПП в ФВ60 режиме. В соответствии с данными, полученными в ходе ранее проведенных «острых» экспериментов, после старта фармакологических тестов, начиная с первого дня введения соединения, объем воды, потребляемой за сессию, резко снизился (рисунок 18А). При этом уровень потребления воды в течение всего эксперимента оставался примерно на одном уровне. Об этом также свидетельствуют результаты дисперсионного анализа, в ходе которого выявлено статистически значимое

влияние межгруппового фактора «RO5263397» ($F(1,12) = 17,24$; $p < 0,001$), и результаты апостериорных сравнений (тест Бонферрони), подтверждающих статистически значимые различия между группами для каждого из семи дней теста (рисунок 18А).

Таблица 12 – Количество касаний носика бутылки и длительность питья в экспериментах ПОРПП в ФВ60 режиме

Доза RO5263397, мг/кг			0	1	3	6	10
ФВ60	Кол-во касаний носика бутылки	25%	1191	1486	2123,5	2195	585,5
		50%	2373	2856	3295	3294	2380
		75%	4040	3667,5	4354	4068	3224,5
	Длит-ть питья, с	25%	2	2,5	3,5	3,5	4*
		50%	3	5	20	7	9*
		75%	3,5	48	65	42	20*

Примечания: данные представлены как 25-й, 50-й и 75-й процентиля. N=14-15 для каждой точки. *— $p < 0,05$ (тест Даннета) относительно результатов теста после введения растворителя.

При проведении статистического анализа количества касаний носика бутылки не обнаружено значимых различий. Однако введение исследуемого соединения значимо снижало длительность питья животных в оперантных камерах ($F(1,10) = 6,12$; $p < 0,01$) (таблица 13).

В ходе данного эксперимента также оценивали объем воды, выпиваемой животными в домашних клетках. Введение RO5263397 не оказывало значимого влияния на данный показатель («RO5263397»: $F(1,13) = 0,91$; $p = 0,36$). Несмотря на выраженную вариабельность данных между экспериментальными днями, при проведении post hoc анализа (тест Бонферрони) не было выявлено значимых различий между группами ни в один из семи дней теста (рисунок 18В).

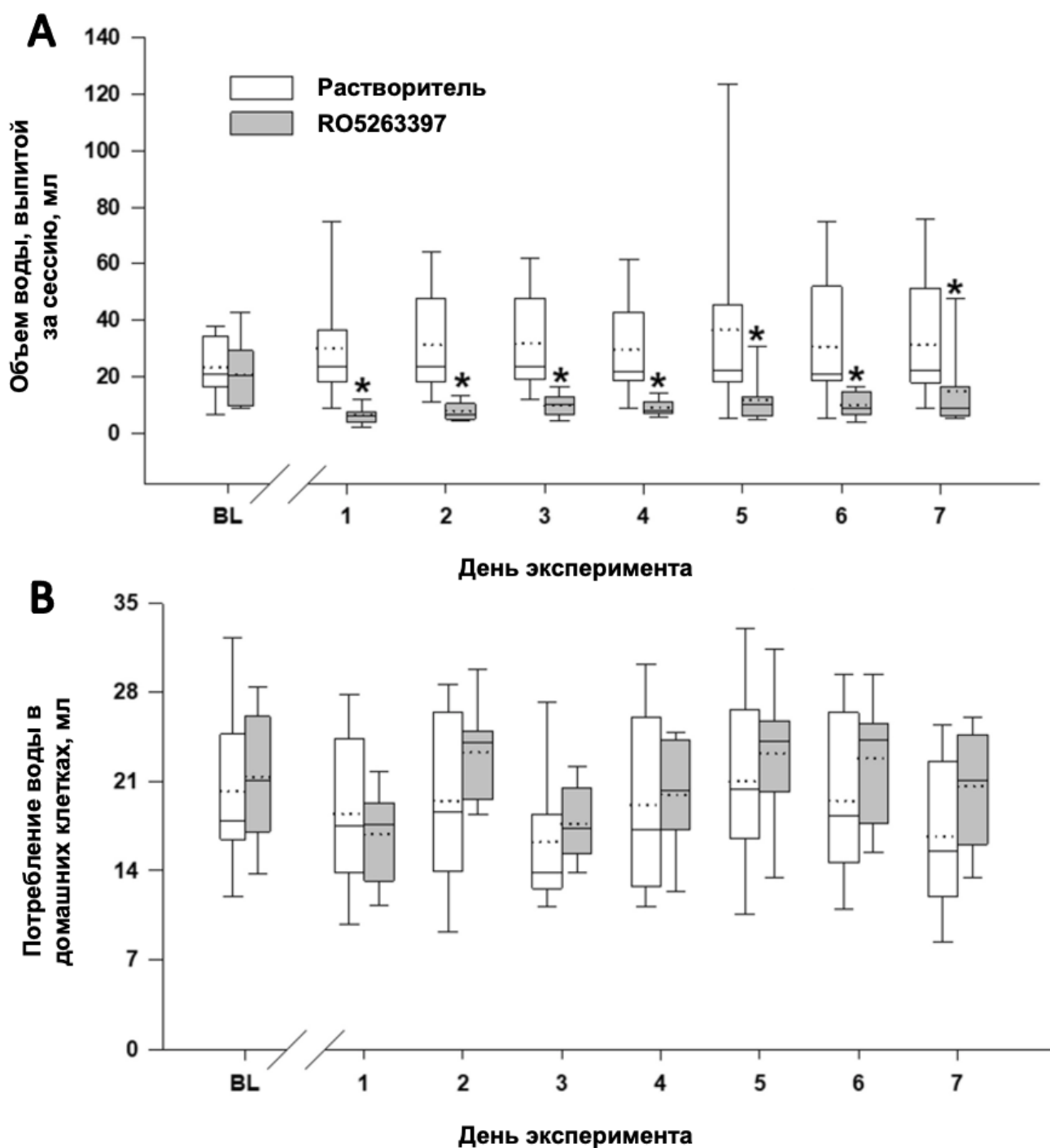


Рисунок 18 – Эффекты повторного введения RO5263397 в ФВ60 режиме ПОРПП на объем потребляемой воды за сессию (А) и в домашних клетках (В) в эксперименте на крысах. BL – день до старта эксперимента. * – $p < 0.05$ (тест Бонферрони) относительно группы с растворителем.

Данные на рисунках представлены в виде блочных диаграмм – «ящичков с усами», отражающих в центре ящичков среднее значение (пунктирная линия) и медиану (сплошная линия); 25%/75% квантили (нижняя и верхняя кромки ящичка), 10-й и 90-й процентиля (нижняя и верхняя засечки усов).

Таблица 13 – Количество касаний носика бутылки и длительность питья в экспериментах ПОРПП в ФИ60 режиме (повторное введение RO5263397)

День			БА	1	2	3	4	5	6	7
Кол-во касаний носика бутылки и	Рас-тель	25%	1285	564,5	725	1469	2074	315,5	1677	2736
		50%	2448	630	1267	2486	3435	423,5	2711	3747
		75%	3083	1939	2644	3330	4291	1286	3973	4581
	RO52 63397	25%	925,5	888,3	689	982,8	567,8	527	1085	1412
		50%	1897	1314	1452	1198	720	578	1589	1640
		75%	2904	1893	2143	2251	1530	1816	1884	2111
Длит-ть питья, с	Рас-тель	25%	196,3	89,7	164,8	226,7	340,8	32,3	348	247,5
		50%	334	197	231,9	298,6	506,4	125,4	577,8	450,4
		75%	441,3	202,4	367,1	583,1	712,5	215,2	1322	717
	RO52 63397	25%	222,4	86,9	81,2*	70,5*	52,2*	46,3	136*	163
		50%	336,5	117,5	111*	164*	84,6*	108	157*	213,7
		75%	466	152,8	157*	208*	170*	166,5	163*	263,8

Примечания: данные представлены как 25-й, 50-й и 75-й процентиля. N=7-8 для каждой точки. *— $p < 0,05$ (тест Бонферрони) относительно соответствующих результатов крыс контрольной группы, получавшим растворитель.

Отдельно стоит отметить, что исходное потребление воды в оперантных установках и домашних клетках до начала фармакологических тестов

статистически не отличалось между экспериментальными группами.

*3.3.2 Полидипсия, обусловленная режимом пищевого подкрепления
«Фиксированный интервал 60 секунд»*

Для последующего изучения компульсивного питья, а также для оценки влияния исследуемого соединения на пищедобывающее поведение использовали ПОРПП в режиме подкрепления ФИ60. В экспериментах с данным режимом подкрепления, в сравнении с ФВ60, дополнительно оценивали частоту нажатий на педаль в качестве параметра, отражающего пищедобывающее поведение. Показано, что введение RO5263397 не влияло на частоту нажатий на педаль (рисунок 19С). Также в данном тесте не зафиксировано статистически значимых изменений в длительности питья и количестве касаний носика бутылки (таблица 14).

В полном соответствии с предыдущими экспериментами, действие RO5263397 сопровождалось дозозависимым влиянием на объем воды, выпитой за сессию («доза RO5263397»: $F(4,74)=24,70$; $p<0,001$). При post hoc сравнениях (тест Даннета) обнаружено статистически значимое снижение после введения соединения в дозах 3-10 мг/кг ($p<0,05$) (рисунок 19А). Также был показан значимый эффект RO5263397 на латентный период первого касания бутылки («доза RO5263397»: $F(4,70)=3,89$, $p < 0,01$), однако статистической значимости достиг эффект только для дозы 10 мг/кг (тест Даннета, $p<0,05$) (рисунок 19В).

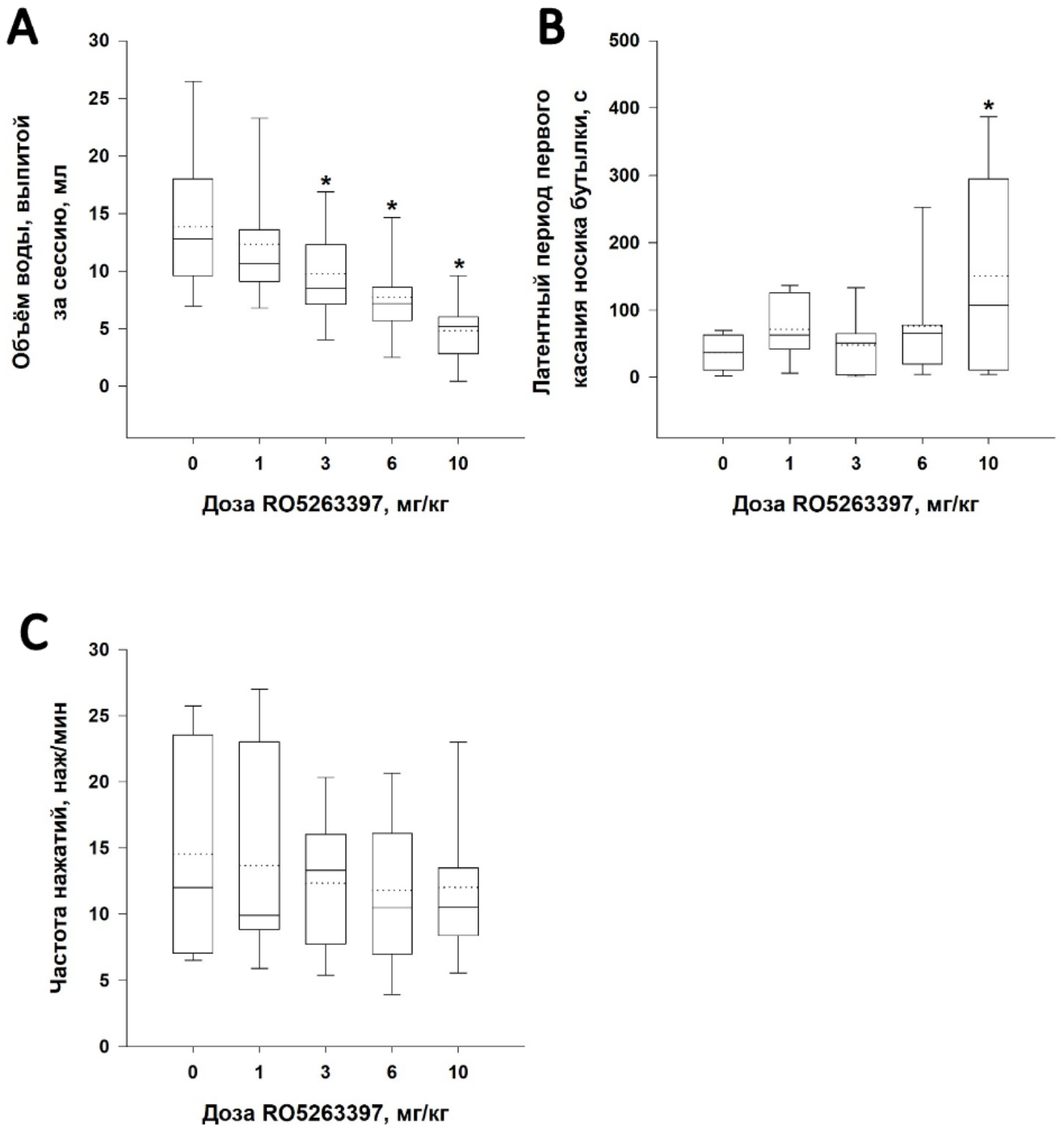


Рисунок 19 – Эффекты однократного введения RO5263397 в ФИ60 режиме ПОРПП на объем потребляемой воды (А), латентный период первого касания носика бутылки (В) и частоту нажатий на педаль (С) в эксперименте на крысах. * – $p < 0.05$ (тест Даннета) относительно группы с растворителем (0 мг/кг).

Данные на рисунках представлены в виде блочных диаграмм – «ящичков с усами», отражающих в центре ящичков среднее значение (пунктирная линия) и медиану (сплошная линия); 25%/75% квантили (нижняя и верхняя кромки ящичка), 10-й и 90-й процентиля (нижняя и верхняя засечки усов).

Таблица 14 – Количество касаний носика бутылки и длительность питья в экспериментах ПОРПП в ФИ60 режиме

Доза RO5263397, мг/кг			0	1	3	6	10
ФИ60	Кол-во касаний носика бутылки	25%	377,75	736,75	581	528,25	253,5
		50%	1180	1925	1364,5	1203	866
		75%	2641,25	2636,25	2978	2053,75	2107,25
	Длит-ть питья, с	25%	11,5	51,5	6,25	32	12
		50%	37,5	63,5	62	66	145
		75%	63,75	118,25	65	77	283

Примечания: Данные представлены как 25-й, 50-й и 75-й процентиля. N = 14-15 для каждой точки. * — $p < 0,05$ (тест Даннета) относительно результатов теста после введения растворителя.

3.3.3 Дополнительные эксперименты по оценке эффектов RO5263397

Целью дополнительных контрольных экспериментов было выявить и оценить наличие неспецифических эффектов исследуемого соединения, способных потенциально повлиять на результаты основных экспериментов на модели ПОРПП. Для этого проводили тесты, позволяющие определить влияние RO5263397 на двигательную активность животных и питьевое поведение.

Как видно на рисунке 20А, однократное введение RO5263397 в диапазоне доз от 1 до 10 мг/кг значимо не влияло на горизонтальную активность животных. При этом применение исследуемого соединения сопровождалось подавлением питьевого поведения и снижением объема воды, выпиваемой животными с ограниченным доступом к поилке (поилка была доступна 1 час в день). В ходе статистической обработки данных с применением дисперсионного анализа подтвердили достоверное влияние фактора «доза» ($F(4,39)=15,41$; $p < 0,001$). При post hoc сравнениях (тест Даннета) обнаружено статистически значимое снижение объема воды после введения соединения в дозах 6 и 10 мг/кг ($p < 0,05$) (рисунок 20В).

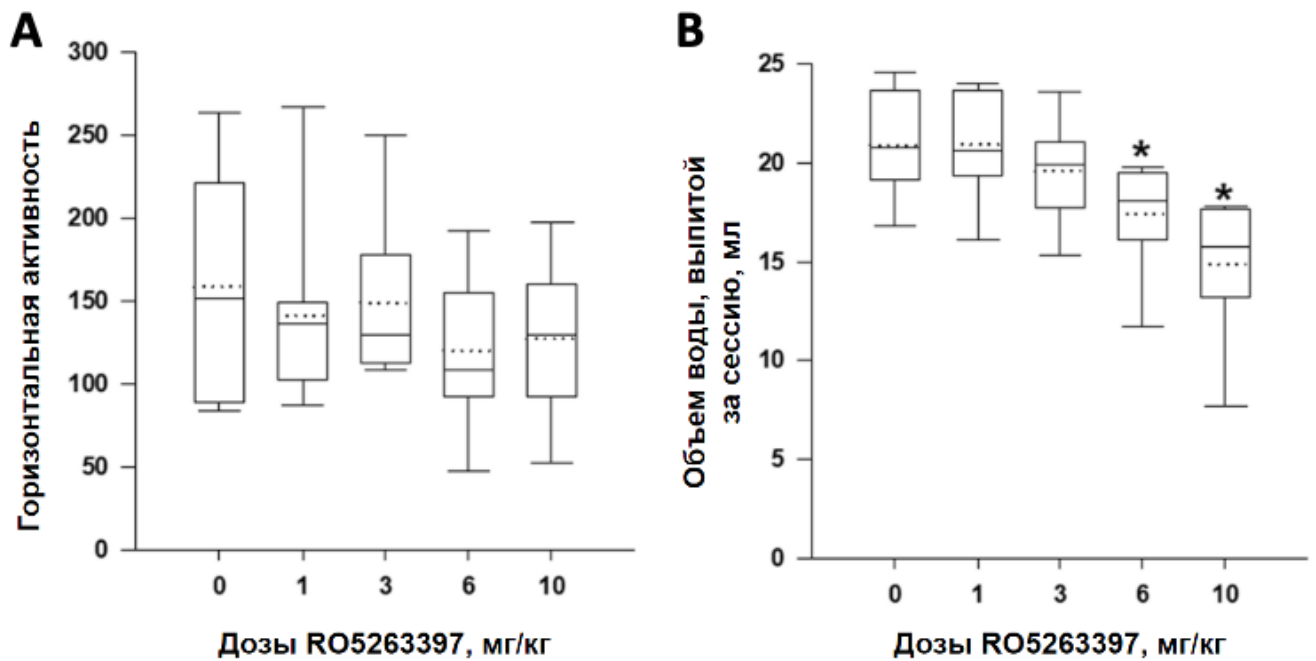


Рисунок 20 – Эффекты однократного введения RO5263397 на двигательную активность (А) и питьевое поведение (В) у крыс с ограниченным доступом к поилке. * – $p < 0.05$ (тест Даннета) относительно группы с растворителем (0 мг/кг).

Данные на рисунках представлены в виде блочных диаграмм – «ящичков с усами», отражающих в центре ящичков среднее значение (пунктирная линия) и медиану (сплошная линия); 25%/75% квартили (нижняя и верхняя кромки ящичка), 10-й и 90-й процентиля (нижняя и верхняя засечки усов).

В экспериментах с повторным введением RO5263397 в течение 7 дней зафиксировано значимое влияния исследуемого соединения на потребление воды в домашних клетках в ночное время («RO5263397»: $F(1,12)=38,78$; $p < 0,001$) (рисунок 21А) и динамику веса животных («RO5263397»: $F(1,13)=201,93$; $p < 0,001$) (рисунок 21В). При этом выраженность описанных эффектов снижалась с течением времени, что подтверждает статистический анализ:

- потребление воды в домашних клетках в ночное время («день»: $F(6,72)=6,77$; $p < 0,001$);
- вес животных в эксперименте («день»: $F(6,78) = 3,17$; $p < 0,01$);
- post hoc анализ (тест Бонферрони, $p < 0.05$) отражает динамику данных эффектов времени – достоверность различий пропадает к седьмому дню эксперимента (рисунок 21).

Отдельно стоит отметить, что исходное потребление воды и вес животных до начала фармакологических тестов статистически не отличалось между экспериментальными группами.

3.3.4 Обсуждение результатов экспериментов с агонистом TAAR1

При однократном введении RO5263397 (1-10 мг/кг, в/б) в эксперименте наблюдали дозозависимое снижение компульсивного питья в ПОРПП ФВ60 и ПОРПП ФИ60, что указывает на возможный потенциал соединений, способных активировать TAAR1, в отношении ОКР. Описанные эффекты RO5263397 были продемонстрированы на вариантах метода ПОРПП, характеризующегося высоким уровнем предиктивной валидности в отношении соединений, обладающих потенциальным противокомпульсивным действием. Ранее опубликованные данные свидетельствуют в пользу того, что ряд препаратов из класса антипсихотиков и селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС), используемых для лечения ОКР, также способны значительно снижать потребление воды в условиях ПОРПП:

- галоперидол – типичный антипсихотик [110];
- клозапин, пимозид, раклоприд и флупентиксол – атипичные антипсихотики [48, 49, 135];
- флуоксетин и кломипрамин – СИОЗС [74, 155].

Важно отметить, что полученные данные для RO5263397 согласуются с результатами опубликованных исследований других агонистов TAAR1, демонстрирующих противокомпульсивные эффекты на моделях психогенного переедания у крыс [55].

Механизм потенциального противокомпульсивного действия агонистов TAAR1 недостаточно изучен, но при этом существуют множественные данные о том, что активация TAAR1 способна влиять на дофаминергическую и серотонинергическую системы (раздел 1.4.1). Это отчасти объясняет сопоставимость фармакологической активности антипсихотиков и препаратов группы СИОЗС с агонистами TAAR1 в отношении компульсивного питья в условиях ПОРПП.

Механизм потенциального противокомпульсивного действия агонистов TAAR1 изучен недостаточно, но при этом существуют множественные данные о том, что активация TAAR1 способна влиять на дофаминергическую и серотонинергическую нейромедиаторные системы (раздел 1.4.1). Это отчасти объясняет сопоставимость фармакологической активности антипсихотиков и препаратов группы СИОЗС с агонистами TAAR1 в отношении компульсивного питья в условиях ПОРПП.

Использование ФИ60 режима ПОРПП позволило не только дополнительно продемонстрировать эффекты исследуемого соединения в отношении компульсивного питья, но и установить, что данный эффект, вероятно, не связан с влиянием введения RO5263397 на пищедобывающее поведение. В проведенных экспериментах не зафиксировано значимого влияния RO5263397 на параметр, который характеризует пищедобывающее поведение – частоту нажатий на педаль.

В тестах с повторным введением RO5263397 в течение 7 дней оценивали изменение уровня компульсивного питья в режиме ФВ60, а также изменение питьевого поведения в домашних клетках. В соответствии с полученными результатами снижение уровня компульсивного питья под воздействием RO5263397 оставалось неизменным в течение всего семидневного эксперимента. Данное наблюдение позволяет сделать заключение об отсутствии толерантности к специфическим эффектам RO5263397, по крайней мере, на семидневном отрезке, что даёт возможность прогнозировать, что некоторые из эффектов агонистов TAAR1 в клинической практике могут сохраняться достаточно длительное время. Вероятное отсутствие толерантности также косвенно подтверждают имеющиеся клинические данные об эффективности препарата-агониста TAAR1 улотаронта при применении в течение 4 и 26 недель (раздел 1.4.3).

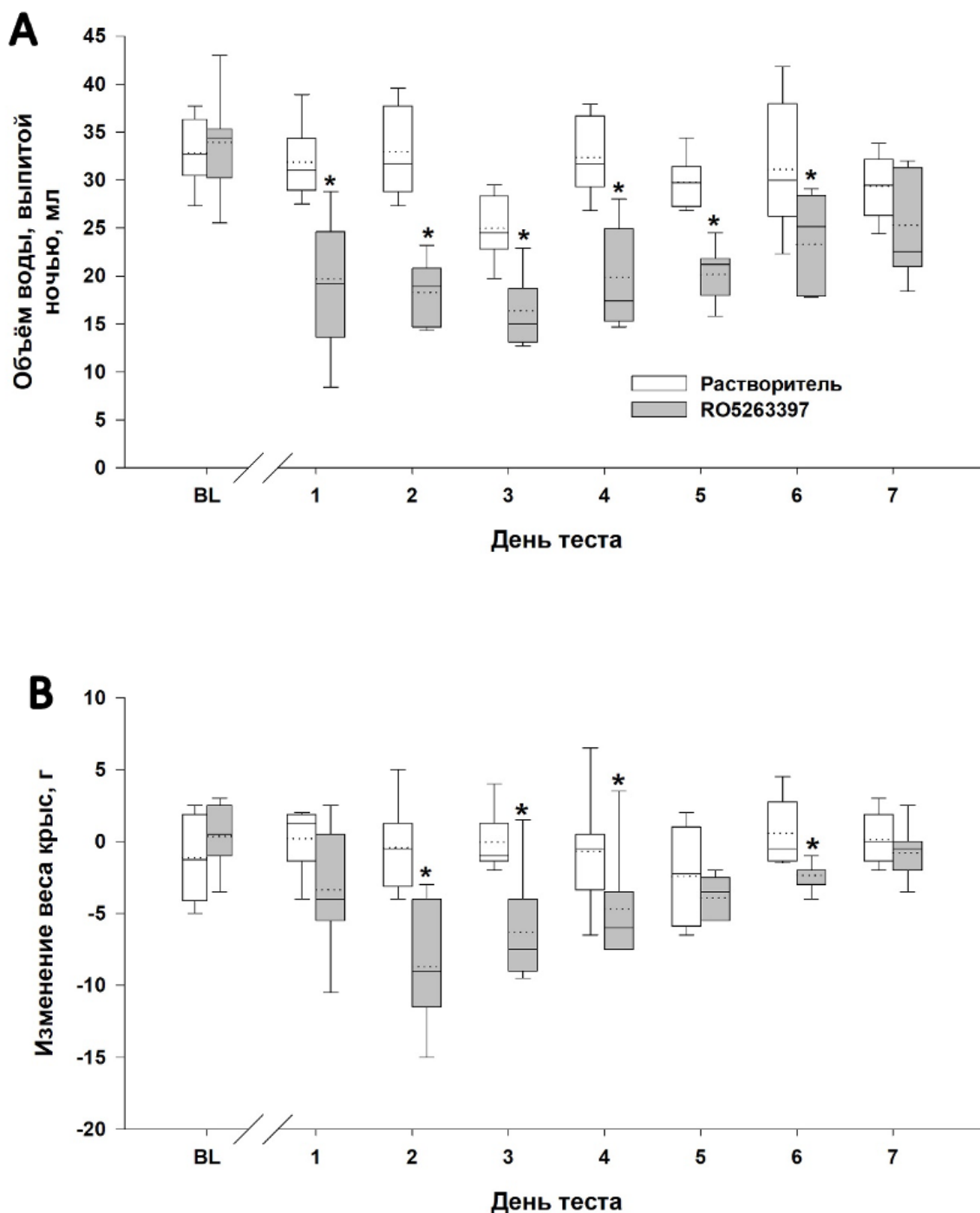


Рисунок 21 – Эффекты повторного введения RO5263397 на объем потребляемой воды за ночь в домашних клетках и вес животных в эксперименте на крысах. BL – день до старта эксперимента. * – $p < 0.05$ (тест Бонферрони) относительно группы с растворителем.

Данные на рисунках представлены в виде блочных диаграмм – «ящичков с усами», отражающих в центре ящичков среднее значение (пунктирная линия) и медиану (сплошная линия); 25%/75% квантили (нижняя и верхняя кромки ящичка), 10-й и 90-й процентиля (нижняя и верхняя засечки усов).

В отдельном эксперименте по оценке питьевого поведения в первые дни введения отмечено статистически значимое снижение ночного потребления воды в домашних клетках, которое практически полностью компенсировалось к седьмому дню эксперимента. Полученный результат подтверждает, что специфические противокомпульсивные эффекты агониста TAAR1 напрямую не связаны с эффектами на питьевое поведение.

Для последующей проверки специфичности выявленного эффекта RO5263397 проводили контрольные эксперименты, в ходе которых установлено, что однократное введение RO5263397 (1-10 мг/кг) не влияло на двигательную активность, но при этом приводило к нарушению питьевого поведения в домашней клетке у крыс, депривированных от воды, при применении в высоких дозах (6 и 10 мг/кг). Несмотря на однозначный эффект соединения на потребление воды в эксперименте на животных, имеющих ограниченный доступ к поилке (1 час в день), есть несколько соображений в пользу того, что снижение компульсивного питья в режимах ПОРПП вероятнее всего связано именно со специфическими свойствами TAAR1 агониста:

- Эффекты RO5263397 в экспериментах на методиках ПОРПП зафиксированы на более низких дозах (3 мг/кг), чем нарушения питьевого поведения в контрольных экспериментах;

- Судя по результатам проведенных экспериментов с повторным введением TAAR1 агониста, механизмы адаптации к эффектам RO5263397 на питьевое поведение животных выражены значительно. Об этом свидетельствует постепенное снижение величины эффектов RO5263397 на ночное потребление воды в семидневном эксперименте и развитие толерантности к последнему дню теста. При этом, как было описано ранее, толерантность не зафиксирована в эксперименте с повторным введением TAAR1 агониста в режиме ФВ60 ПОРПП.

Подводя итог, можно утверждать, что в соответствии с полученными нами результатами, исследуемый TAAR1 агонист, RO5263397, обладает специфическим противокомпульсивным действием, причем описанный фармакодинамический эффект сохраняется при его многократном введении, что

позволяет спрогнозировать низкий потенциал возникновения толерантности у инновационных соединений данного класса.

Полученные результаты опубликованы в работе с соавторами [138].

ОБСУЖДЕНИЕ

Современный процесс разработки лекарственного препарата представляет собой сложный, длительный и многостадийный процесс – от лекарственного поиска и до проведения полномасштабных клинических исследований эффективности [15]. За последние десятилетия процесс разработки препаратов претерпел значительные изменения в связи с выдающимися научными достижениями, позволяющими форсировать лекарственный поиск, и возрастающими инвестициями в R&D. Но несмотря на значительный прогресс в данной области количество одобрений регуляторными органами оригинальных препаратов практически не увеличивается.

Одной из основных преград на пути разработки инновационных лекарственных препаратов является проблема перехода инновационного соединения из области ДКИ в позднюю клиническую разработку [37]. На практике это приводит к низкой вероятности доказательства эффективности инновационного соединения на уровне КИ, несмотря на успешное прохождение ДКИ [37].

Лекарственная толерантность, снижение величины ФД эффекта препарата после его повторного применения [68], является одним из феноменов, способных повлиять на эффективность инновационного препарата и, соответственно, на успех лекарственной разработки. Судя по опубликованным данным, зачастую явления толерантности остаются недостаточно изученными в ДКИ, что оставляет неопределенность в отношении рисков возникновения толерантности в клинических исследованиях [23]. Эта проблема стоит особенно остро для инновационных соединений в области психофармакологии [23], т. к. зачастую пациентам с нейропсихическими патологиями требуется длительный прием препаратов для развития терапевтических эффектов или их поддержания [100]. В

целом для препаратов, влияющих на ЦНС, лекарственная толерантность является вероятной причиной недостижения эффективности при применении у пациентов и детальное изучение данного феномена на уровне ДКИ может позволить значительно снизить уровень неопределенности и избежать вывода потенциально неэффективного инновационного соединения (в особенности обладающим новым механизмом действия) в КИ.

В фокусе диссертационного исследования находились два класса инновационных соединений, имеющих многообещающий потенциал в области терапии нейропсихических расстройств – ингибиторы PDE10A и агонисты TAAR1. Настоящая работа посвящена идентификации и последующему изучению специфических эффектов соединений данных групп (ингибиторы PDE10A: MP-10, RO5545965; агонисты TAAR1: RO5263397) после однократного введения, а также оценке потенциала развития толерантности при их повторном применении.

Первый фрагмент диссертационной работы посвящён экспериментальной оценке **специфической противопаркинсонической активности ингибиторов PDE10A и риска развития толерантности к эффектам соединений данной группы.**

Известно, что применение ингибиторов PDE10A способно повышать содержание цАМФ и цГМФ как в MSNs, экспрессирующих D1-подобные рецепторы, так и в MSNs, экспрессирующих D2-подобные рецепторы. Это объясняет способность соединений данного класса вызывать эффекты характерные для антагонистов D2- и агонистов D1-подобных дофаминовых рецепторов. В настоящей работе был сделан акцент на изучении D1-опосредованных эффектов ингибиторов PDE10A с использованием двух независимых методик гиподофаминергических состояний у крыс, отражающих разные подходы к моделированию – фармакологический (TBZ-индуцированная гипоактивность у крыс стока Wistar) и фармакогенетический (α MPT-индуцированная гипоактивность/каталепсия у генетически модифицированных крыс без DAT).

При проведении экспериментов на фармакологической модели нам удалось

продемонстрировать ослабление гипокинетического действия TBZ после однократного введения ингибиторов PDE10A, что соотносится с ранее опубликованными данными в отношении других ингибиторов PDE10A (JNJ-42314415, TP-10, PQ-10), которые свидетельствуют о способности этой группы соединений снижать проявления соединений, способных подавлять дофаминергическую нейротрансмиссию (например, блокаторы VMAT2, а также антагонисты D2- и D1-подобных рецепторов) [78]. Также установлено, что при введении MP-10 (в дозе 3 мг/кг, ежедневно) животным в течение 5 и 10 дней величина стимулирующего эффекта ингибитора PDE10A снижена в сравнении с таковым при однократном введении соединения. При изучении эффектов повторного введения RO5545965 (0,9 мг/кг, ежедневно) в десятидневном эксперименте отмечено снижение горизонтальной активности у животных в группе повторного введения в сравнении с группой однократного введения.

Для последующей оценки двигательных эффектов ингибиторов PDE10A была апробирована фармакогенетическая модель гиподофаминергических состояний [139]. Исходно данный метод был разработан с использованием DAT-KO мышей, введение αMPT которым сопровождалось длительными и выраженными проявлениями акинезии [136]. В наших экспериментах мы адаптировали данную модель под DAT-KO крыс и провели ее фармакологическую валидацию с использованием препаратов стандартной терапии болезни Паркинсона (L-DOPA+карбидопа). В ходе апробации методики также получены нейрохимические данные, свидетельствующие о выраженном снижении уровня дофамина в стриатуме и фронтальной коре, что соотносится с ранее опубликованными данными для данной модели у мышей [136].

Однократное введение ингибиторов PDE10A приводило к восстановлению двигательных функций у крыс с выраженной гиподофаминергией, что проявлялось в увеличении горизонтальной активности и снижении выраженности каталепсии. В экспериментах по изучению эффектов повторного введения MP-10 (3 мг/кг, ежедневно) и RO5545965 (0,3 мг/кг, ежедневно) в течение 5 дней установлено, что в группе повторного введения животные дольше пребывают в

«позе лектора» в сравнении с животными в группе однократного введения как для MP-10, так и для RO5545965, а выявленное стимулирующее действие RO5545965 значительно снижалось и в отношении горизонтальной активности.

Результаты, полученные для обеих моделей, соотносятся между собой – ингибиторы PDE10A продемонстрировали выраженное стимулирующее действие в условиях гиподофаминергии. Полученные данные соответствуют результатам ранее проведенных ДКИ и свидетельствуют в пользу возможного последующего применения ингибиторов PDE10A для терапии состояний, ассоциированных с нарушением стриарной дофаминовой нейротрансмиссии (болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, шизофрения и пр.) [129]. Важной находкой проведенного исследования является обнаруженный тренд к снижению величины стимулирующих эффектов ингибиторов PDE10A при их повторном применении. Выявленные в ходе тестов признаки толерантности к специфическим эффектам ингибиторов PDE10A свидетельствуют в пользу того, что одной из возможных причин неэффективности препаратов данного класса в клинических исследованиях может являться именно развитие лекарственной толерантности.

Отдельного внимания заслуживают результаты, полученные в ходе проведения эксперимента по изучению перекрестного введения ингибиторов PDE10A, демонстрирующие наличие перекрестной толерантности к стимулирующему действию изучаемых соединений на фармакологической модели паркинсонизма. Эти данные позволяют утверждать, что показанная ранее толерантность вероятно носит не фармакокинетический, а фармакодинамический характер.

К сожалению, полученные нами данные не позволяют идентифицировать механизм развития лекарственной толерантности. Тем не менее, размышляя о возможных механизмах, можно предположить следующие возможные причины:

- Повышение экспрессии PDE10A в MSNs, экспрессирующих D1-подобные рецепторы;
- Адаптивные изменения экспрессии PDE других семейств, также обнаруженных в MSN стриатума (PDE1, PDE2, PDE4) [78, 147].

Последующее изучение данной проблемы представляется необходимым для подтверждения или опровержения этих предположений.

Следующий фрагмент диссертационной работы посвящён экспериментальной оценке **специфического противокомпульсивного действия агонистов TAAR1 и риска развития толерантности к эффектам исследуемого соединения.**

Для исследования терапевтического потенциала агонистов TAAR1 при ОКР изучали действие RO5263397, высокоселективного агониста TAAR1, в экспериментальных моделях компульсивного поведения – различных вариантах методики ПОРПП (ФВ60 и ФИ60). Установлено, что однократное введение RO5263397 (1-10 мг/кг) приводило к дозозависимому снижению компульсивного питья в обоих режимах ПОРПП [138].

Результаты контрольных экспериментов позволили установить, что продемонстрированный противокомпульсивный эффект агониста TAAR1 не связан со сторонними эффектами соединения на пищедобывающее и питьевое поведение, а также двигательную активность [138]. Полученные данные позволяют подтвердить гипотезу о том, что агонисты TAAR1 могут иметь терапевтический потенциал при ОКР и могут быть использованы для разработки новых терапевтических опций для лечения данной группы психических расстройств.

Другой ключевой задачей исследования было оценить динамику эффектов агониста TAAR1 при его повторном введении. Доза RO5263397 в экспериментах с многократным введением была определена на основании опубликованных данных о фармакокинетике соединения и результатах описанных ранее тестов с однократным применением. Предполагалось, что при ежедневном введении RO5263397 в дозе 12 мг/кг (bid) концентрация вещества в плазме крови в течение 14 часов в сутки будет превышать 0,67 мкг/мл, что соответствует концентрациям в крови через 15 минут после введения RO5263397 в дозе 3 мг/кг (минимальная эффективная доза соединения в экспериментах с однократным введением). Установлено, что толерантность к противокомпульсивному действию агониста

TAAR1 не развивается при его повторном введении, в то время как неспецифические эффекты фармакологического агента, связанные с потреблением пищи и весом крыс снижаются и постепенно исчезают [138]. Полученные результаты являются экспериментальным свидетельством того, что толерантность к клинически значимым эффектам агонистов TAAR1 не развивается, что также косвенно подтверждают имеющиеся клинические данные об эффективности агонистов TAAR1 при применении в течение 4 и 26 недель.

Подводя итог, можно утверждать, что в соответствии с полученными нами результатами, исследуемый TAAR1 агонист, RO5263397, обладает специфическим противокомпульсивным действием, причем описанный фармакодинамический эффект сохраняется при его многократном введении, что позволяет спрогнозировать низкий потенциал возникновения толерантности у инновационных соединений данного класса.

ВЫВОДЫ

1. Агонист TAAR1 RO5233397 обладает противокомпульсивным действием на *in vivo* модели обсессивно-компульсивных расстройств, что подтверждается наличием статистически значимого ($p < 0,05$) дозозависимого снижения компульсивного питья после введения RO5233397 (для дозы 3 мг/кг снижение составляло около 26%, для 6 мг/кг – около 40%, для 10 мг/кг – около 63%). Обнаруженный эффект является специфичным и не связан с влиянием соединения на двигательную активность, пищедобывающее или питьевое поведение.

2. К противокомпульсивному действию RO5233397 не развивается толерантность, что доказывается наличием статистически значимых различий ($p < 0,05$) в компульсивном питье между группами повторного введения препарата и группой растворителя в течение каждого из 7 дней эксперимента (в рамках каждого экспериментального дня введение RO5233397 приводило к снижению потребления воды на 50% и более).

3. Обнаруженный эффект противокомпульсивный эффект RO5233397 является специфичным (в диапазоне доз от 0 до 3 мг/кг) и не связан с влиянием соединения на двигательную активность или питьевое поведение. Об этом свидетельствует отсутствие статистически значимого эффекта соединения в указанном диапазоне доз на горизонтальную активность и объем воды, выпиваемой животными с ограниченным доступом к поилке.

4. Ингибиторы PDE10A обладают стимулирующим действием в рамках фармакологической модели гиподофаминергии, что подтверждается наличием статистически значимого ($p < 0,05$) увеличения горизонтальной локомоторной активности (введение MP-10 приводило к ее примерно в 21 раз, введение RO5545965 – более чем в 33 раза).

5. Ингибиторы PDE10A обладают стимулирующим действием в рамках

фармакогенетической модели гиподофаминергии, что подтверждается снижением проявлений каталепсии (введение MP-10 и RO5545965 приводило к снижению времени нахождения в «позе лектора» до значений близких к нулю для всех животных) и восстановлением двигательной активности до уровня, характеризующего интактных животных.

6. В условиях обеих моделей гиподофаминергии показано, что к стимулирующим эффектам ингибиторов PDE10A развивается толерантность, что, на примере фармакологической модели проявляется в статистически значимом снижении (от 25% до 77%, $p < 0,05$) величины стимулирующего действия ингибиторов PDE10A на двигательную активность животных при повторном введении соединений в течение 10 дней в сравнении с однократным их применением. Обнаруженный феномен является одной из возможных причин неэффективности препаратов данного класса в клинических исследованиях.

7. В условиях фармакологической модели гиподофаминергии были получены данные о наличии перекрестной толерантности к эффектам ингибиторов PDE10A, о чем свидетельствует отсутствие статистически значимых различий между контрольной группой и группой перекрестного применения ингибиторов PDE10A. Данная находка позволяет утверждать о вероятном фармакодинамическом характере лекарственной толерантности к стимулирующим эффектам соединений данного класса.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

По результатам проведенного исследования экспериментально выявлена возможность формирования толерантности к эффектам ингибиторов PDE10A. Рекомендуется дальнейшее изучение механизмов возникновения толерантности к стимулирующим эффектам ингибиторов PDE10A с использованием *in vitro/in vivo* методов для определения способов коррекции снижения эффективности данных препаратов при их длительном применении.

В связи с высоким потенциалом развития толерантности к эффектам ингибиторов PDE10A последующее клиническое изучение соединений данного класса по показаниям, предполагающим длительное применение препаратов, представляется нецелесообразным до выяснения механизма развития толерантности и разработки соответствующих мер по снижению ее проявлений.

Предложенные в настоящем исследовании модели гиподофаминергических состояний, а также дизайны экспериментов с повторным введением ингибиторов PDE10A могут быть использованы для определения потенциала возникновения толерантности у инновационных соединений данного класса.

Результаты проведенных экспериментов позволяют рекомендовать последующее изучение агонистов TAAR1 в условиях клинических исследований с многократным введением для подтверждения эффективности в отношении ОКР.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

α MPT — α -метил-паратирозин

bid — два раза в день

DAT-KO — крысы, нокаутные по гену, кодирующему дофаминовый транспортер

GLP1 — глюкагоноподобного пептида 1

GPCR — рецептор, сопряженный с G-белком

GSK3 — киназу гликогенсинтазы 3

HTT — ген, кодирующий белок гентингтин

MPTP — 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин

MSNs — среднеразмерные шипиковые нейроны

n.s. — статистически незначимо

PCP — фенциклидин

PDE — фосфодиэстераза

R&D — исследование и разработка препаратов

TAAR1 — рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами, 1-го типа

TBZ — тетрабеназин

VMAT2 — везикулярный переносчик моноаминов 2-го типа

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография

ГАМК — гамма-аминомасляная кислота

ДКИ — доклинические исследования

КИ — клинические исследования

ЛФ — лекарственная форма

МАО — моноаминоксидаза

мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота

н/п — неприменимо

ОКР — обсессивно-компульсивные расстройства

ПОРПП — полидипсия, обусловленная режимом пищевого поведения

СДВГ — синдром дефицита внимания с гиперактивностью

ФВ60 — фиксированное время 60 секунд

ФИ60 — фиксированный интервал 60 секунд

ФК — фармакокинетика

ФД — фармакодинамика

цАМФ — циклический аденозинмонофосфат

цГМФ — циклический гуанозинмонофосфат

ЦНС — центральная нервная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белозерцева И. В., Драволина О. А., Тур М. В. Руководство по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в ПСПбГМУ им. И.П. Павлова / И. В. Белозерцева, О. А. Драволина, М. В. Тур, под ред. Э. Э. Звартау, 2014.
2. Бортников Н. С. [и др.]. Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами: новая мишень для разработки антиаддиктивных средств? № 203 (8). С. 2021.
3. Доротенко А. Р. [и др.]. Толерантность к парадоксальному увеличению двигательной активности, вызванной ингибированием фосфодиэстеразы 10А, на модели гиподофаминергии // Учёные записки ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. 2023. № 4 (30). С. 32–42.
4. Миронов А. М. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А. М. Миронов, Москва:, 2012.
5. Суханов И. М., Звартау Э. Э., Гайнетдинов Р. Р. Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами, 1-го подтипа как новая терапевтическая мишень в нейрорпсихофармакологии // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2019. № 5 (82). С. 3–9.
6. Adler M., Cowan A. Testing and evaluation of drugs of abuse / M. Adler, A. Cowan, New York: Wiley-Liss, 1990. 43–66 с.
7. Alonso P. [и др.]. Animal models of obsessive–compulsive disorder: utility and limitations // Neuropsychiatric Disease and Treatment. 2015. (11). С. 1939.
8. Andersson K. E. PDE5 inhibitors - pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery // British journal of pharmacology. 2018. № 13 (175). С. 2554–2565.
9. Arakawa K., Maehara S. Combination of the phosphodiesterase 10A inhibitor, MR1916 with risperidone shows additive antipsychotic-like effects without affecting cognitive enhancement and cataleptic effects in rats // Neuropsychopharmacology

reports. 2020. № 2 (40). C. 190–195.

10. Arakawa K., Nakao K., Maehara S. Dopamine D1 signaling involvement in the effects of the phosphodiesterase 10A inhibitor, PDM-042 on cognitive function and extrapyramidal side effect in rats // Behavioural brain research. 2017. (317). C. 204–209.

11. Asif-Malik A., Hoener M. C., Canales J. J. Interaction Between the Trace Amine-Associated Receptor 1 and the Dopamine D2 Receptor Controls Cocaine's Neurochemical Actions // Scientific reports. 2017. № 1 (7).

12. AXELROD J. [и др.]. On the mechanism of tachyphylaxis to tyramine in the isolated rat heart // British Journal of Pharmacology and Chemotherapy. 1962. № 1 (19). C. 56.

13. Banasikowski T. J., Beninger R. J. Haloperidol conditioned catalepsy in rats: a possible role for D1-like receptors // The international journal of neuropsychopharmacology. 2012. № 10 (15). C. 1525–1534.

14. Barnes E. M. Use-dependent regulation of GABAA receptors // International review of neurobiology. 1996. № 39 (39). C. 53–76.

15. Barrett J. Fundamentals of drug development / J. Barrett, Wiley, 2022. 103–105 с.

16. Bateup H. S. [и др.]. Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs // Nature neuroscience. 2008. № 8 (11). C. 932–939.

17. Beaulieu J. M. [и др.]. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior // Cell. 2005. № 2 (122). C. 261–273.

18. Beaulieu J. M., Gainetdinov R. R., Caron M. G. Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs // Annual review of pharmacology and toxicology. 2009. (49). C. 327–347.

19. Beavo J., Francis S., Houslay M. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Health and Disease / J. Beavo, S. Francis, M. Houslay, Boca Raton: CRC Press, 2007.

20. Beck G. [и др.]. A Selective Phosphodiesterase 10A Inhibitor Reduces L-Dopa-Induced Dyskinesias in Parkinsonian Monkeys // Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society. 2018. № 5 (33). C. 805–814.

21. Berry M. D. Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators // *Journal of neurochemistry*. 2004. № 2 (90). С. 257–271.
22. Berry M. D. [и др.]. Membrane permeability of trace amines: evidence for a regulated, activity-dependent, nonexocytotic, synaptic release // *Synapse* (New York, N.Y.). 2013. № 10 (67). С. 656–667.
23. Bespalov A. [и др.]. Drug Tolerance: A Known Unknown in Translational Neuroscience // *Trends in pharmacological sciences*. 2016. № 5 (37). С. 364–378.
24. Bhatnagar M., Pruskowski J. Opioid Equivalency // *StatPearls*. 2022.
25. Blackwell B. [и др.]. Hypertensive interactions between monoamine oxidase inhibitors and foodstuffs // *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*. 1967. № 497 (113). С. 349–365.
26. Bleickardt C. J. [и др.]. Antagonism of the adenosine A2A receptor attenuates akathisia-like behavior induced with MP-10 or aripiprazole in a novel non-human primate model // *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2014. (118). С. 36–45.
27. Borowsky B. [и др.]. Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001. № 16 (98). С. 8966–8971.
28. Bunzow J. R. [и др.]. Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor // *Molecular pharmacology*. 2001. № 6 (60). С. 1181–1188.
29. Burn J. H., Rand M. J. The action of sympathomimetic amines in animals treated with reserpine // *The Journal of Physiology*. 1958. № 2 (144). С. 314.
30. Calabresi P. [и др.]. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal // *Nature neuroscience*. 2014. № 8 (17). С. 1022–1030.
31. Calverley P. M. [и др.]. Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials // *Lancet* (London, England). 2009. № 9691 (374). С. 685–694.
32. Cas M. H 1 ANTIHISTAMINES IN ALLERGIC DISEASE // *Current Allergy &*

Clinical Immunology. 2009. № 2 (22). C. 71–74.

33. CASHIN C. H. Effect of sympathomimetic drugs in eliciting hypertensive responses to reserpine in the rat, after pretreatment with monoamineoxidase inhibitors // British journal of pharmacology. 1972. № 2 (44). C. 203–209.

34. Chavkin C., Goldstein A. Opioid receptor reserve in normal and morphine-tolerant guinea pig ileum myenteric plexus // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1984. № 22 (81). C. 7253–7257.

35. Chen L. [и др.]. Design and optimization of purine derivatives as in vivo active PDE10A inhibitors // Bioorganic & medicinal chemistry. 2017. № 13 (25). C. 3315–3329.

36. Conti M., Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling // Annual review of biochemistry. 2007. (76). C. 481–511.

37. Cook D. [и др.]. Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework // Nature reviews. Drug discovery. 2014. № 6 (13). C. 419–431.

38. Correll C. U. [и др.]. Safety and effectiveness of ulotaront (SEP-363856) in schizophrenia: results of a 6-month, open-label extension study // NPJ schizophrenia. 2021. № 1 (7).

39. Cote R. H. Characteristics of photoreceptor PDE (PDE6): similarities and differences to PDE5 // International journal of impotence research. 2004. (16 Suppl 1). C. S28–S33.

40. Crocetti L. [и др.]. An Overview of PDE4 Inhibitors in Clinical Trials: 2010 to Early 2022 // Molecules. 2022. № 15 (27).

41. Das S. [и др.]. Design, synthesis and pharmacological evaluation of novel polycyclic heteroarene ethers as PDE10A inhibitors: part II // Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2014. № 15 (24). C. 3238–3242.

42. DAY M. D., RAND M. J. Tachyphylaxis to some sympathomimetic amines in relation to monoamine oxidase // British Journal of Pharmacology and Chemotherapy. 1963. № 1 (21). C. 84.

43. Dedic N. [и др.]. SEP-363856, a Novel Psychotropic Agent with a Unique, Non-D2 Receptor Mechanism of Action // The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2019. № 1 (371). С. 1–14.
44. Dedic N. [и др.]. Therapeutic Potential of TAAR1 Agonists in Schizophrenia: Evidence from Preclinical Models and Clinical Studies // International Journal of Molecular Sciences. 2021. № 24 (22). С. 22.
45. Degerman E., Belfrage P., Manganiello V. C. Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3) // The Journal of biological chemistry. 1997. № 11 (272). С. 6823–6826.
46. Delnomdedieu M. [и др.]. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase ii efficacy and safety study of the PDE10A inhibitor PF-02545920 in huntington disease (amaryllis) // Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. 2018. № Suppl 1 (89). С. A99–A100.
47. Demartinis N. [и др.]. A Proof-of-Concept Study Evaluating the Phosphodiesterase 10A Inhibitor PF-02545920 in the Adjunctive Treatment of Suboptimally Controlled Symptoms of Schizophrenia // Journal of clinical psychopharmacology. 2019. № 4 (39). С. 318–328.
48. Didriksen M., Christensen A. V. The attenuation of schedule-induced polydipsia by dopamine blockers is not an expression of extrapyramidal side effect liability. // Behavioural pharmacology. 1993. № 5 (4). С. 517–522.
49. Didriksen M., Olsen G. M., Christensen A. V Effect of clozapine upon schedule-induced polydipsia (SIP) resembles neither the actions of dopamine D1 nor D2 blockade. // Psychopharmacology. 1993. № 2 (113). С. 250–6.
50. Elsworth J. D., Glover V., Sandler M. Selective MAO inhibition: a new strategy in the treatment of Parkinson's disease // Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers. 1979. (10). С. 1575–1577.
51. Espinoza S. [и др.]. Functional interaction between trace amine-associated receptor 1 and dopamine D2 receptor // Molecular pharmacology. 2011. № 3 (80). С. 416–425.
52. Espinoza S. [и др.]. TAAR1 Modulates Cortical Glutamate NMDA Receptor Function // Neuropsychopharmacology. 2015. № 9 (40). С. 2217.

53. Fakhfour G. [и др.]. Dimensions of GSK3 monoamine-related intracellular signaling in schizophrenia // *Handbook of Behavioral Neuroscience*. 2016. (23). С. 447–462.
54. Fernandes M., Kluwe S., Coper H. The development of tolerance to morphine in the rat // *Psychopharmacology*. 1977. № 2 (54). С. 197–201.
55. Ferragud A. [и др.]. The Trace Amine-Associated Receptor 1 Agonist RO5256390 Blocks Compulsive, Binge-like Eating in Rats // *Neuropsychopharmacology*: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. 2017. № 7 (42). С. 1458–1470.
56. Fidock M., Miller M., Lanfear J. Isolation and differential tissue distribution of two human cDNAs encoding PDE1 splice variants // *Cellular Signalling*. 2002. № 1 (14). С. 53–60.
57. Finlayson A. J. R. [и др.]. Experiences with benzodiazepine use, tapering, and discontinuation: an Internet survey // <https://doi.org/10.1177/20451253221082386>. 2022. (12). С. 204512532210823.
58. Fisher D. A. [и др.]. Isolation and characterization of PDE8A, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase // *Biochemical and biophysical research communications*. 1998. № 3 (246). С. 570–577.
59. Fisher D. A. [и др.]. Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase // *The Journal of biological chemistry*. 1998. № 25 (273). С. 15559–15564.
60. Fujishige K. [и др.]. Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A) // *The Journal of biological chemistry*. 1999. № 26 (274). С. 18438–18445.
61. Fujishige K. [и др.]. The human phosphodiesterase PDE10A gene genomic organization and evolutionary relatedness with other PDEs containing GAF domains // *European journal of biochemistry*. 2000. № 19 (267). С. 5943–5951.
62. Fujishige K., Kotera J., Omori K. Striatum- and testis-specific phosphodiesterase PDE10A isolation and characterization of a rat PDE10A // *European journal of biochemistry*. 1999. № 3 (266). С. 1118–1127.

63. Gainetdinov R. R., Hoener M. C., Berry M. D. Trace Amines and Their Receptors // Pharmacological reviews. 2018. № 3 (70). C. 549–620.
64. Gancher S. T., Woodward W. R., Nutt J. G. Apomorphine tolerance in Parkinson's disease: lack of a dose effect // Clinical neuropharmacology. 1996. № 1 (19). C. 59–64.
65. Geerts H., Spiros A., Roberts P. Phosphodiesterase 10 inhibitors in clinical development for CNS disorders // Expert review of neurotherapeutics. 2017. № 6 (17). C. 553–560.
66. Gentzel R. C. [и др.]. The PDE10A inhibitor MP-10 and haloperidol produce distinct gene expression profiles in the striatum and influence cataleptic behavior in rodents // Neuropharmacology. 2015. (99). C. 256–263.
67. Giampà C. [и др.]. Inhibition of the striatal specific phosphodiesterase PDE10A ameliorates striatal and cortical pathology in R6/2 mouse model of Huntington's disease // PloS one. 2010. № 10 (5).
68. Gilman A. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics / A. Gilman, 10th-е изд., New York: McGraw-Hill, 2001. 21–644 с.
69. Glavas N. A. [и др.]. T cell activation up-regulates cyclic nucleotide phosphodiesterases 8A1 and 7A3 // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001. № 11 (98). C. 6319–6324.
70. Harada A. [и др.]. Balanced Activation of Striatal Output Pathways by Faster Off-Rate PDE10A Inhibitors Elicits Not Only Antipsychotic-Like Effects But Also Procognitive Effects in Rodents // The international journal of neuropsychopharmacology. 2020. № 2 (23). C. 96–107.
71. Harada A., Suzuki K., Kimura H. TAK-063, a Novel Phosphodiesterase 10A Inhibitor, Protects from Striatal Neurodegeneration and Ameliorates Behavioral Deficits in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease // The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2017. № 1 (360). C. 75–83.
72. Harmeier A. [и др.]. Trace amine-associated receptor 1 activation silences GSK3 β signaling of TAAR1 and D2R heteromers // European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology. 2015. № 11 (25). C. 2049–2061.

73. Hawken E. R., Beninger R. J. The amphetamine sensitization model of schizophrenia symptoms and its effect on schedule-induced polydipsia in the rat // *Psychopharmacology*. 2014. № 9 (231). C. 2001–2008.
74. Hogg S., Dalvi A. Acceleration of onset of action in schedule-induced polydipsia: combinations of SSRI and 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor antagonists. // *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2004. № 1 (77). C. 69–75.
75. Hornykiewicz O. L-DOPA // *Journal of Parkinson's disease*. 2017. № s1 (7). C. S3–S10.
76. Hraiech S. [и др.]. Myorelaxants in ARDS patients // *Intensive Care Medicine*. 2020. № 12 (46). C. 2357.
77. Hu E. [и др.]. Discovery of clinical candidate 1-(4-(3-(4-(1H-benzo[d]imidazole-2-carbonyl)phenoxy)pyrazin-2-yl)piperidin-1-yl)ethanone (AMG 579), a potent, selective, and efficacious inhibitor of phosphodiesterase 10A (PDE10A) // *Journal of medicinal chemistry*. 2014. № 15 (57). C. 6632–6641.
78. Hufgard J. R. [и др.]. Phosphodiesterase-1b (Pde1b) knockout mice are resistant to forced swim and tail suspension induced immobility and show upregulation of Pde10a // *Psychopharmacology*. 2017. № 12 (234). C. 1803–1813.
79. Hutchinson M. A., Smith P. F., Darlington C. L. The behavioural and neuronal effects of the chronic administration of benzodiazepine anxiolytic and hypnotic drugs // *Progress in neurobiology*. 1996. № 1 (49). C. 73–97.
80. Ito R. [и др.]. Anatomical and histological profiling of orphan G-protein-coupled receptor expression in gastrointestinal tract of C57BL/6J mice // *Cell and Tissue Research*. 2009. № 2 (338). C. 257–269.
81. Jing L., Li J. X. Trace amine-associated receptor 1: a promising target for the treatment of psychostimulant addiction // *European journal of pharmacology*. 2015. (761). C. 345.
82. Jones P. G. [и др.]. Pharmacological evaluation of a novel phosphodiesterase 10A inhibitor in models of antipsychotic activity and cognition // *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2015. (135). C. 46–52.
83. Kawaguchi Y. Neostriatal cell subtypes and their functional roles // *Neuroscience*

research. 1997. № 1 (27). С. 1–8.

84. Kidd M. [и др.]. Luminal regulation of normal and neoplastic human EC cell serotonin release is mediated by bile salts, amines, tastants, and olfactants // American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology. 2008. № 2 (295).

85. Kim D. Y. [и др.]. The Potent PDE10A Inhibitor MP-10 (PF-2545920) Suppresses Microglial Activation in LPS-Induced Neuroinflammation and MPTP-Induced Parkinson's Disease Mouse Models // Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology. 2021. № 2 (16). С. 470–482.

86. King J. R. [и др.]. Pharmacokinetic enhancement of protease inhibitor therapy // Clinical pharmacokinetics. 2004. № 5 (43). С. 291–310.

87. Knoll J. Analysis of the pharmacological effects of selective monoamine oxidase inhibitors // Ciba Foundation Symposium. 1976. (39). С. 135–161.

88. Koblan K. S. [и др.]. A Non-D2-Receptor-Binding Drug for the Treatment of Schizophrenia // The New England journal of medicine. 2020. № 16 (382). С. 1497–1506.

89. Komatsu H., Fukuchi M., Habata Y. Potential Utility of Biased GPCR Signaling for Treatment of Psychiatric Disorders // International journal of molecular sciences. 2019. № 13 (20).

90. Langen B. [и др.]. Effect of PDE10A inhibitors on MK-801-induced immobility in the forced swim test // Psychopharmacology. 2012. № 2 (221). С. 249–259.

91. Leo D., Sukhanov I., Gainetdinov R. R. Novel translational rat models of dopamine transporter deficiency // Neural regeneration research. 2018. № 12 (13). С. 2091–2093.

92. Lewis M. [и др.]. D1 and functionally selective dopamine agonists as neuroprotective agents in Parkinson's disease // CNS & neurological disorders drug targets. 2006. № 3 (5). С. 345–353.

93. Lin C. S. [и др.]. Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum // Biochemical and biophysical research communications. 2000. № 2 (268). С. 628–635.

94. Lindemann L. [и др.]. Trace amine-associated receptors form structurally and

functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors // *Genomics*. 2005. № 3 (85). С. 372–385.

95. Lindemann L., Hoener M. C. A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family // *Trends in pharmacological sciences*. 2005. № 5 (26). С. 274–281.

96. Logrip M. L. [и др.]. Phosphodiesterase 10A regulates alcohol and saccharin self-administration in rats // *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2014. № 7 (39). С. 1722–1731.

97. Löscher W., Schmidt D. Experimental and clinical evidence for loss of effect (tolerance) during prolonged treatment with antiepileptic drugs // *Epilepsia*. 2006. № 8 (47). С. 1253–1284.

98. Luhach K. [и др.]. Attenuation of neurobehavioural abnormalities by papaverine in prenatal valproic acid rat model of ASD // *European journal of pharmacology*. 2021. (890).

99. Macek T. A. [и др.]. A phase 2, randomized, placebo-controlled study of the efficacy and safety of TAK-063 in subjects with an acute exacerbation of schizophrenia // *Schizophrenia research*. 2019. (204). С. 289–294.

100. Machado-Vieira R. [и др.]. The Timing of Antidepressant Effects: A Comparison of Diverse Pharmacological and Somatic Treatments // *Pharmaceuticals*. 2010. № 1 (3). С. 19.

101. Mailman R., Huang X., Nichols D. E. Parkinson's disease and D1 dopamine receptors // *Current Opinion in Investigational Drugs*. 2001. № 11 (2). С. 1582–1591.

102. Mantas I. [и др.]. Trace Amine-Associated Receptor 1 Contributes to Diverse Functional Actions of O-Phenyl-Iodotyramine in Mice but Not to the Effects of Monoamine-Based Antidepressants // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. № 16 (22). С. 8907.

103. Masilamoni G. J. [и др.]. Effects of a novel phosphodiesterase 10A inhibitor in non-human primates: a therapeutic approach for schizophrenia with improved side effect profile // *Neuropharmacology*. 2016. № Pt A (110). С. 449.

104. Maurice D. H. [и др.]. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases // *Nature reviews. Drug discovery*. 2014. № 4 (13). С. 290–314.

105. Megens A. A. H. P. [и др.]. Pharmacology of JNJ-42314415, a centrally active phosphodiesterase 10A (PDE10A) inhibitor: a comparison of PDE10A inhibitors with D2 receptor blockers as potential antipsychotic drugs // The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2014. № 1 (349). С. 138–154.
106. Megens A. A. H. P. [и др.]. PDE10A inhibitors stimulate or suppress motor behavior dependent on the relative activation state of the direct and indirect striatal output pathways // Pharmacology research & perspectives. 2014. № 4 (2).
107. Menniti F. S., Chappie T. A., Schmidt C. J. PDE10A Inhibitors—Clinical Failure or Window Into Antipsychotic Drug Action? // Frontiers in Neuroscience. 2020. (14). С. 600178.
108. Michael E. S., Covic L., Kuliopulos A. Trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) promotes anti-diabetic signaling in insulin-secreting cells // The Journal of biological chemistry. 2019. № 12 (294). С. 4401–4411.
109. Michibata H. [и др.]. Human Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphodiesterase PDE1A: novel splice variants, their specific expression, genomic organization, and chromosomal localization // Biochimica et biophysica acta. 2001. № 2 (1517). С. 278–287.
110. Mittleman G., Rosner A. L., Schaub C. L. Polydipsia and dopamine: behavioral effects of dopamine D1 and D2 receptor agonists and antagonists. // The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 1994. № 2 (271). С. 638–50.
111. Morgan M. M., Christie M. J. Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human // British Journal of Pharmacology. 2011. № 4 (164). С. 1322.
112. Murray M. J. [и др.]. Clinical Practice Guidelines for Sustained Neuromuscular Blockade in the Adult Critically Ill Patient // Critical care medicine. 2016. № 11 (44). С. 2079–2103.
113. Nair P. C. [и др.]. Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1): Molecular and Clinical Insights for the Treatment of Schizophrenia and Related Comorbidities // ACS pharmacology & translational science. 2022. № 3 (5). С. 183–188.
114. Nikiforuk A. [и др.]. The effects of PDE10 inhibition on attentional set-shifting do

- not depend on the activation of dopamine D1 receptors // Behavioural pharmacology. 2016. № 4 (27). C. 331–338.
115. Nutt J. G., Carter J. H., Woodward W. R. Effect of brief levodopa holidays on the short-duration response to levodopa: evidence for tolerance to the antiparkinsonian effects // Neurology. 1994. № 9 (44). C. 1617–1622.
116. Omori K., Kotera J. Overview of PDEs and their regulation // Circulation research. 2007. № 3 (100). C. 309–327.
117. Pasternak G. W. Incomplete cross tolerance and multiple mu opioid peptide receptors // Trends in pharmacological sciences. 2001. № 2 (22). C. 67–70.
118. Phillips J. E. Inhaled Phosphodiesterase 4 (PDE4) Inhibitors for Inflammatory Respiratory Diseases // Frontiers in pharmacology. 2020. (11).
119. Raab S. [и др.]. Incretin-like effects of small molecule trace amine-associated receptor 1 agonists // Molecular metabolism. 2015. № 1 (5). C. 47–56.
120. Redrobe J. P. [и др.]. Characterisation of Lu AF33241: A novel, brain-penetrant, dual inhibitor of phosphodiesterase (PDE) 2A and PDE10A // European journal of pharmacology. 2015. (761). C. 79–85.
121. Relling M. V. [и др.]. Adverse effect of anticonvulsants on efficacy of chemotherapy for acute lymphoblastic leukaemia // Lancet (London, England). 2000. № 9226 (356). C. 285–290.
122. Reneerkens O. A. H. [и др.]. Inhibition of phosphodiesterase type 2 or type 10 reverses object memory deficits induced by scopolamine or MK-801 // Behavioural brain research. 2013. № 1 (236). C. 16–22.
123. Revel F. G. [и др.]. Trace amine-associated receptor 1 partial agonism reveals novel paradigm for neuropsychiatric therapeutics // Biological psychiatry. 2012. № 11 (72). C. 934–942.
124. Revel F. G. [и др.]. A new perspective for schizophrenia: TAAR1 agonists reveal antipsychotic- and antidepressant-like activity, improve cognition and control body weight // Molecular psychiatry. 2013. № 5 (18). C. 543–556.
125. Rodriguez M. M. [и др.]. Behavioral Effects of a Novel Benzofuranyl-Piperazine Serotonin-2C Receptor Agonist Suggest a Potential Therapeutic Application in the

- Treatment of Obsessive-Compulsive Disorder // *Frontiers in psychiatry*. 2017. (8).
126. Rosman G. J. [и др.]. Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase // *Gene*. 1997. № 1 (191). C. 89–95.
127. Savchenko A. [и др.]. The Lack of Dopamine Transporter Is Associated With Conditional Associative Learning Impairments and Striatal Proteomic Changes // *Frontiers in psychiatry*. 2022. (13).
128. Schmid C. L., Bohn L. M. Physiological and pharmacological implications of beta-arrestin regulation // *Pharmacology & therapeutics*. 2009. № 3 (121). C. 285–293.
129. Schülke J. P., Brandon N. J. Current Understanding of PDE10A in the Modulation of Basal Ganglia Circuitry // *Advances in neurobiology*. 2017. (17). C. 15–43.
130. Seeger T. F. [и др.]. Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain // *Brain Research*. 2003. № 2 (985). C. 113–126.
131. Sharma N. [и др.]. Papaverine ameliorates prenatal alcohol-induced experimental attention deficit hyperactivity disorder by regulating neuronal function, inflammation, and oxidative stress // *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2021. № 1 (81). C. 71–81.
132. Shiraishi E. [и др.]. The Phosphodiesterase 10A Selective Inhibitor TAK-063 Improves Cognitive Functions Associated with Schizophrenia in Rodent Models // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2016. № 3 (356). C. 587–595.
133. Shukla A. K. [и др.]. Structure of active β -arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide // *Nature*. 2013. № 7447 (497). C. 137–141.
134. Smith S. M. [и др.]. The novel phosphodiesterase 10A inhibitor THPP-1 has antipsychotic-like effects in rat and improves cognition in rat and rhesus monkey // *Neuropharmacology*. 2013. (64). C. 215–223.
135. Snodgrass S. H., Allen J. D. Time-response effects of pimozide on operant behavior and schedule-induced polydipsia. // *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 1989. № 4 (32). C. 949–55.
136. Sotnikova T. D. [и др.]. Dopamine-independent locomotor actions of

amphetamines in a novel acute mouse model of Parkinson disease // PLoS biology. 2005. № 8 (3).

137. Stavrou S. [и др.]. TAAR1 induces a disturbed GSK3 β phosphorylation in recurrent miscarriages through the ODC // Endocrine Connections. 2018. № 2 (7). С. 372.

138. Sukhanov I. [и др.]. Activation of trace amine-associated receptor 1 attenuates schedule-induced polydipsia in rats // Neuropharmacology. 2019. (144). С. 184–192.

139. Sukhanov I. [и др.]. Inhibition of PDE10A in a New Rat Model of Severe Dopamine Depletion Suggests New Approach to Non-Dopamine Parkinson's Disease Therapy // Biomolecules. 2023. № 1 (13).

140. Suzuki K. [и др.]. In vivo pharmacological characterization of TAK-063, a potent and selective phosphodiesterase 10A inhibitor with antipsychotic-like activity in rodents // The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2015. № 3 (352). С. 471–479.

141. Suzuki K. [и др.]. TAK-063, a PDE10A Inhibitor with Balanced Activation of Direct and Indirect Pathways, Provides Potent Antipsychotic-Like Effects in Multiple Paradigms // Neuropsychopharmacology 2016 41:9. 2016. № 9 (41). С. 2252–2262.

142. Suzuki K. [и др.]. TAK-063, a PDE10A Inhibitor with Balanced Activation of Direct and Indirect Pathways, Provides Potent Antipsychotic-Like Effects in Multiple Paradigms // Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. 2016. № 9 (41). С. 2252–2262.

143. Suzuki K. [и др.]. Combined treatment with a selective PDE10A inhibitor TAK-063 and either haloperidol or olanzapine at subeffective doses produces potent antipsychotic-like effects without affecting plasma prolactin levels and cataleptic responses in rodents // Pharmacology Research & Perspectives. 2018. № 1 (6). С. 372.

144. Takakuwa M. [и др.]. Antipsychotic-like effects of a novel phosphodiesterase 10A inhibitor T-251 in rodents // Pharmacology, biochemistry, and behavior. 2019. (185).

145. Takakuwa M. [и др.]. Antipsychotic-like effects of a novel phosphodiesterase 10A inhibitor MT-3014 in rats // Pharmacology, biochemistry, and behavior. 2020. (196).

146. Threlfell S. [и др.]. Inhibition of Phosphodiesterase 10A Increases the

- Responsiveness of Striatal Projection Neurons to Cortical Stimulation // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2009. № 3 (328). С. 785.
147. Threlfell S., West A. R. Review: Modulation of striatal neuron activity by cyclic nucleotide signaling and phosphodiesterase inhibition // *Basal ganglia*. 2013. № 3 (3). С. 137–146.
148. Tomimatsu Y. [и др.]. TAK-063, a phosphodiesterase 10A inhibitor, modulates neuronal activity in various brain regions in pHMRI and EEG studies with and without ketamine challenge // *Neuroscience*. 2016. (339). С. 180–190.
149. Vardigan J. D. [и др.]. Behavioral and qEEG effects of the PDE10A inhibitor THPP-1 in a novel rhesus model of antipsychotic activity // *Psychopharmacology*. 2016. № 13 (233). С. 2441–2450.
150. Wallace D. A. [и др.]. Identification and characterization of PDE4A11, a novel, widely expressed long isoform encoded by the human PDE4A cAMP phosphodiesterase gene // *Molecular pharmacology*. 2005. № 6 (67). С. 1920–1934.
151. Walling D. P. [и др.]. Phosphodiesterase 10A Inhibitor Monotherapy Is Not an Effective Treatment of Acute Schizophrenia // *Journal of clinical psychopharmacology*. 2019. № 6 (39). С. 575–582.
152. Weiss S. R. B., Post R. M. Development and reversal of contingent inefficacy and tolerance to the anticonvulsant effects of carbamazepine // *Epilepsia*. 1991. № 1 (32). С. 140–145.
153. Williams J. T. [и др.]. Regulation of μ -opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance // *Pharmacological reviews*. 2013. № 1 (65). С. 223–254.
154. Wilson L., Brandon N. Emerging biology of PDE10A // *Current pharmaceutical design*. 2015. № 3 (21). С. 378–388.
155. Woods A. [и др.]. Selective serotonin re-uptake inhibitors decrease schedule-induced polydipsia in rats: a potential model for obsessive compulsive disorder. // *Psychopharmacology*. 1993. № 2–3 (112). С. 195–8.
156. Xu Y., Zhang H. T., O'Donnell J. M. Phosphodiesterases in the central nervous system: implications in mood and cognitive disorders // *Handbook of experimental*

pharmacology. 2011. № 204 (204). С. 447–485.

157. Yero T., Rey J. A. Tetrabenazine (Xenazine), An FDA-Approved Treatment Option For Huntington's Disease-Related Chorea // Pharmacy and Therapeutics. 2008. № 12 (33). С. 690.

158. Younis I. R. [и др.]. Association of End Point Definition and Randomized Clinical Trial Duration in Clinical Trials of Schizophrenia Medications // JAMA Psychiatry. 2020. № 10 (77). С. 1.

159. Yuasa K. [и др.]. Genomic organization of the human phosphodiesterase PDE11A gene. Evolutionary relatedness with other PDEs containing GAF domains // European journal of biochemistry. 2001. № 1 (268). С. 168–178.

160. Zhang J. [и др.]. Dopamine D1 receptor ligands: where are we now and where are we going // Medicinal research reviews. 2009. № 2 (29). С. 272–294.

161. Zhou J. [и др.]. Molecular mechanisms of opioid tolerance: From opioid receptors to inflammatory mediators (Review) // Experimental and Therapeutic Medicine. 2021. № 3 (22).

162. Zucchi R. [и др.]. Trace amine-associated receptors and their ligands // British Journal of Pharmacology. 2006. № 8 (149). С. 967.