ФАРМАКОКИНЕТИКА и ДИНАМИКА

№3.2017

www.PharmacoKinetica.ru

Центр Фармакоэкономических Исследований

16 лет научно-исследовательской работы

- **Независимая научная организация в области изучения экономики программ здравоохранения**
- **Более 200 исследований в области оценки медицинских технологий**
- **Опубликовано около 210 научных работ в рецензируемых медицинских журналах**
- **Партнёры – 40 ведущих зарубежных и российских фармацевтических компаний**

Основные направления научной деятельности

- **разработка научно-методических основ фармакоэкономических, фармакоэпидемиологических исследований и оценки качества жизни**
- **развитие методологии проведения оценки медицинских технологий**

ПОЛНЫЙ СПЕКТР УСЛУГ ПО ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ

- фармакоэкономические исследования
- фармакоэпидемиологические исследования
- наблюдательные неинтервенционные исследования
- непрямые сравнительные исследования
- оценка технологий здравоохранения
- оценка качества жизни, связанного со здоровьем
- систематический литературный обзор и мета-анализ
- разработка математических моделей и локальная адаптация
- анализ больших баз данных
- создание мобильных приложений и интерактивных онлайн-презентаций
- формирование доказательной базы
- экспертиза и разработка клинико-экономического досье
- образовательные услуги
- информационно-консультационные услуги

Социальная премия Da.Signa

Награждён в 2013 и 2014 гг. Всероссийской социальной премией в области организации здравоохранения, фармакоэкономики и рациональной фармакотерапии «Da.Signa»

www.HealthEconomics.ru ✉ clinvest@mail.ru ☎ (910) 449-22-73

ФАРМАКОКИНЕТИКА И ФАРМАКОДИНАМИКА

№3
2017

Издательство ОКИ

Главный редактор
Жердев Владимир Павлович
д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, Москва

Зам. главного редактора
Фирсов Александр Алексеевич
член-корр. РАН, д.б.н., профессор, Москва

Ответственный секретарь
Литвин Александр Алексеевич
д.б.н., Москва

Редакционная коллегия

Белолипецкая Вера Геннадиевна
к.б.н., Москва

Белоусов Юрий Борисович
член-корр. РАН, д.м.н., профессор, Москва

Бондарева Ирина Борисовна
д.б.н., Москва

Воронина Татьяна Александровна
заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор, Москва

Громова Ольга Алексеевна
д.м.н., профессор, Москва

Дурнев Андрей Дмитриевич
член-корр. РАН, д.м.н., профессор, Москва

Казей Василий Игоревич
к.б.н., Москва

Ковалёв Георгий Иванович
д.м.н., профессор, Москва

Кулмагамбетов Ильяс Райханович
д.м.н., профессор, академик НАН, Казахстан, Алматы

Мирзоян Рубен Симонович
заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор, Москва

Насонов Александр Сергеевич
к.б.н., Москва

Раменская Галина Владиславовна
д.ф.н., профессор, Москва

Сариев Абрек Куангалиевич
д.м.н., профессор, Москва

Соколов Андрей Владимирович
д.б.н., Москва

Спасов Александр Алексеевич
академик РАН, д.м.н., профессор, Волгоград

Стародубцев Алексей Константинович
д.м.н., профессор, Москва

Сычёв Дмитрий Александрович
член-корр. РАН, д.м.н., профессор, Москва

Тюренков Иван Николаевич
член-корр. РАН, д.м.н., профессор, Волгоград

Чистяков Виктор Владимирович
д.ф.н., профессор, Москва

Выпускающая группа

Белоусов Дмитрий Юрьевич
Ответственный за выпуск журнала
+7 (910) 449-22-73
e-mail: clinvest@mail.ru

Афанасьева Елена Владимировна
Генеральный директор ООО «Издательство ОКИ»
подписка
+7 (916) 986-04-65
e-mail: eva88@list.ru
сайт: www.izdat-oki.ru

Жук Елена Владимировна
Дизайн и верстка
e-mail: elenazuk70@mail.ru

Подписано в печать 17.10.2017 г. **Тираж** 400 экз.
ООО «МЕДИАКОЛОР», www.mediacolor.ru

Адрес редакции: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8 ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАН Тел./Факс: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Журнал «Фармакокинетика и Фармакодинамика» является приложением к журналу «Качественная клиническая практика». Журнал «Качественная клиническая практика» зарегистрирован Комитетом РФ по печати 28.05.2001 г. Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № 77-9142. Авторские материалы не обязательно отражают точку зрения редакции. Редакция не несет ответственности за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах.

Сайты	Журналы
www.Antibiotics-Chemotherapy.ru	Антибиотики и Химиотерапия
www.ClinVest.ru	Качественная клиническая практика
www.Clinical-Pharmacy.ru	Клиническая фармация
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru	Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru	Центр Фармакоэкономических Исследований
www.Market-Access-Solutions.ru	Market Access Solutions
www.izdat-Oki	Издательство ОКИ

СОДЕРЖАНИЕ

АКТУАЛЬНЫЙ ОБЗОР

Мозговой нейротрофический фактор и его низкомолекулярные миметики
Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Поварнина П.Ю., Середенин С.Б. 3

Поведенческие экспериментальные модели депрессии
Гарибова Т.Л., Крайнева В.А., Воронина Т.А. 14

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА

Фармакокинетика дипептидного анксиолитика ГБ-115 после перорального введения у различных видов животных и человека
Раскин С.Ю., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Бочков П.О., Шевченко Р.В., Смирнов В.В., Грибакина О.Г., Новицкий А.А., Жердев В.П., Колик Л.Г., Гудашева Т.А., Ивашкина Н.Ю. 20

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Нейропротекторное действие цикло-L-пролилглицина на моделях повреждения нейрональных клеток *in vitro*
Николаев С.В., Логвинов И.О., Антипов П.И., Колясникова К.Н., Антипова Т.А. 26

Исследование стереоспецифичности нейропротекторного действия дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 на модели оксидативного стресса в культуре гиппокампальных клеток линии НТ-22
Логвинов И.О., Тарасюк А.В., Антипов П.И., Антипова Т.А. 30

Влияние трифтазина на проявления расстройств аутистического спектра у крыс с фетальным вальпроатным синдромом
Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А., Процун Г.В. 34

ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

Исследование острой токсичности Тропоксина
Сорокина А.В., Алексеева С.В., Мирошкина И.А. 39

ЮБИЛЕЙ

Харкевичу Дмитрию Александровичу 43

СОДЕРЖАНИЕ

PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS

№3
2017

Издательство
ОКИ

Chief editor
Zherdev Vladimir
Ph.D., Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Moscow

Deputy chief editor
Firsov Alexander
Corresponding Member RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Executive secretary
Litvin Alexander
Ph.D., Moscow

Editotial Board

Belolipetskaia Vera
Ph.D., Moscow

Belousov Yuri
Corresponding Member RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Bondareva Irina
Ph.D., Moscow

Voronina Tatiana
Honored Scientist RF, Ph.D., Professor, Moscow

Gromova Olga
Ph.D., Professor, Ivanovo

Durnev Andrey
Corresponding Member RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Kazey Vasily
Ph.D., Professor, Moscow

Kovalev Georgy
Ph.D., Professor, Moscow

Kulmagambetov Ilyas
Ph.D., Professor, Academician National Academy of Sciences, Almaty, Kazakhstan

Mirzoyan Ruben
Honored Scientist RF, Ph.D., Professor, Moscow

Nasonov Alexander
Ph.D., Moscow

Ramenskaya Galina
Ph.D., Professor, Moscow

Sariev Abrek
Ph.D., Professor, Moscow

Sokolov Andrey
Ph.D., Moscow

Spasov Alexander
RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Starodubtcev Alex
Ph.D., Professor, Moscow

Sychev Dmitry
Corresponding Member RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Tyurenkov Ivan
Corresponding Member PAS, Ph.D., Professor, Volgograd

Chistyakov Viktor
Ph.D., Professor, Moscow

Graduate group

Belousov Dmitry
Responsible for this issue
+7 (910) 449-22-73
e-mail: clinvest@mail.ru

Afanasyeva Elena
CEO in LLC «Publishing OKI»
subscription
+7(916)986-04-65
e-mail: eva88@list.ru
site:www.izdat-oki.ru

Zhuk Elena
Design and layout
e-mail: elenazuk70@mail.ru

Signed in print 17.10.2017 г. **Circulation** 400 copies.
Typography: LCC «MEDIACOLOR», www.mediacolor.ru

Editorial address: 125315, Moscow, ul. Baltiiskay, 8
FSBI «ZAKUSOV INSTITUTE OF PHARMACOLOGY»
Tel./Fax: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Journal «Pharmacokinetics and Pharmacodynamics» is a supplement to the journal «Good Clinical Practice». Journal «Good Clinical Practice» registered by Russian Committee for Press 28.05.2001 Certificate of registration of mass media PI №77-9142. Copyring material does not necessarily reflect the views of the publisher. We take no responsibility for the accuracy of the information contained in promotional materials.

Sites	Journals
www.Antibiotics-Chemotherapy.ru	Antibiotics and Chemotherapy
www.ClinVest.ru	Good Clinical Practice
www.Clinical-Pharmacy.ru	Clinical Pharmacy
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru	Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

www.HealthEconomics.ru	Center of Pharmacoeconomics Research
www.Market-Access-Solutions.ru	Market Access Solutions
www.izdat-Oki.ru	Publisher OKI

CONTENTS

CURRENT REVIEWS

Brain-derived neurotrophic factor and its low-molecular mimetics
Gudasheva T.A., Tarasiuk A.V., Povarnina P.Yu., Seredenin S.B. 3

Animal models of depression
Garibova T.L, Kraineva V.A., Voronina T.A. 14

EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHARMACOKINETICS

Pharmacokinetics of dipeptide anxiolytic GB-115 after oral administration in different animals species and humans
Raskin S.Yu., Kolyvanov G.B., Litvin A.A., Bochkov P.O., Shevchenko R.V., Grybakina O.G., Smirnov V.V., Novitskyi A.A., Zherdev V.P., Kolik L.G., Gudasheva T.A., Ivashkina N.Yu. 20

PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

Neuroprotective effect of L-cycloprolylglycine on models neuronal cells damage *in vitro*
Nikolaev S.V., Logvinov I.O., Antipov P.I., Kolyasnikova K.N., Antipova T.A. 26

A study of neuroprotective effect stereospecificity of dipeptide mimetic of the Brain-derived neurotrophic factor GSB-106 on the model oxidative stress in the culture hippocampal cell line HT-22
Logvinov I.O., Tarasiuk A.V., Antipov P.I., Antipova T.A. 30

Effect of triftazin (trifluoperazine) on the symptoms of autism spectrum disorders in rats with fetal valproatate syndrome
Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Voronina T.A., Protsun G.V. 34

SAFETY STUDY

Study of acute toxicity of the drug Tropoxin
Sorokina A.V., Alekseeva S.V., Miroshkina I.A. 39

ANNIVERSARIES

Kharkevich Dmitry Alexandrovich 43

CONTENTS

Мозговой нейротрофический фактор и его низкомолекулярные миметики

Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Поварнина П.Ю., Середенин С.Б.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

Резюме. Проведён обзор литературы по структуре и физиологическим эффектам мозгового нейротрофического фактора (BDNF). Особое внимание уделено вовлечённости BDNF в патогенез депрессии и подходам к конструированию его низкомолекулярных миметиков.

Ключевые слова: мозговой нейротрофический фактор, BDNF, низкомолекулярный миметик

Brain-derived neurotrophic factor and its low-molecular mimetics

Gudasheva T.A., Tarasiuk A.V., Povarnina P.Yu., Seredenin S.B.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. *A literature overview on the structure and physiological effects of the Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has been carried out. Particular attention was paid to the involvement of BDNF in the pathogenesis of depression and approaches to its low-molecular mimetics design.*

Keywords: Brain-derived neurotrophic factor, BDNF, low-molecular mimetic

Автор, ответственный за переписку:

Гудашева Татьяна Александровна – д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, руководитель отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; тел. +7 (495) 601-22-46; e-mail: tata-sosnovka@mail.ru

Основные функции мозгового нейротрофического фактора

Мозговой нейротрофический фактор (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF) является членом семейства нейротрофинов, группы структурно гомологичных полипептидных ростовых факторов. BDNF был впервые описан в 1987 г. [1] после выделения из экстракта головного мозга фактора, поддерживающего нейроны, не чувствительные к действию фактора роста нервов. Позднее оказалось, что оба белка гомологичны на 50%.

BDNF – белок с молекулярной массой 13,5 кДа, он состоит из 119 негликозилированных аминокислот и кодируется геном, который также носит название BDNF. В организме человека этот ген находится на 11-й хромосоме [2, 3]. BDNF играет важную роль в развитии нервной системы и поддержании её нормального функционирования во взрослом организме.

BDNF в развитии нервной системы. *Maisonpierre P.C.* с коллегами [4] охарактеризовали распределение мРНК BDNF в течение всего времени развития у крыс и обнаружили, что оно резко возрастало в период между 11-м и 12-м днями эмбрионального развития, а число транскриптов увеличивалось к 13-у дню. Данные сроки совпадают с периодом устойчивого нейрогенеза в периферической и центральной нервной системе [5, 6].

BDNF имеет решающее значение в постнатальной выживаемости, т. к. большинство BDNF -/- мышей умирают вскоре после рождения, [7, 8]. У мышей, отрицательных по BDNF гену, продемонстрированы серьёзные недостатки в развитии периферической нервной системы, особенно афферентных нейронов [7, 8]. У BDNF -/- мышей отмечены ненормальная походка и координация движений, их поза значительно шире (расстояние между левой и правой лапой), несмотря на их меньшие размеры по сравнению с дикими мышами [9]. Это свидетельствует о важности участия BDNF в развитии и функционировании мозжечка.

BDNF в нейрогенезе. Ассоциация BDNF с нейрогенезом подтверждена в большом количестве исследований. Установлено, что внутрижелудочковое введение BDNF способствует нейрогенезу в некоторых областях мозга у крыс, например, в полосатом теле, перегородке, таламусе, гипоталамусе [10], введение BDNF в гиппокамп увеличивает число зернистых клеток в зубчатой извилине [11].

Danzer S.C. и коллеги [12] произвели трансфекцию культуры клеток гиппокампа генами BDNF или NGF; было отмечено значительное аксональное и дендритное ветвление клеток зубчатой извилины после трансфекции BDNF, но не NGF. Данный эффект исчезал после применения ингибитора тирозинкиназного Trk рецептора. Это говорит о том, что BDNF и Trk рецепторы способствуют нейрогенезу как в контексте развития, так и вне его.

BDNF и синаптическая пластичность. Хорошо установлена значимость BDNF в долговременной потенциации (long-term potentiation, LTP), которая является важным компонентом синаптической пластичности [13–15]. LTP в гиппокампе нарушена у трансгенных мышей, лишенных BDNF [16], и восстанавливается при трансфекции в клетки гиппокампа гена BDNF [17]. Снижение LTP наблюдается у крыс

с дефицитом рецепторов TrkB [18]. Введение BDNF в структуры гиппокампа крысам с удалёнными яичниками, у которых недостаток эстрогена приводит к цитоскелетной реорганизации дендритных шипиков в гиппокампе и создаёт дефицит LTP, восстанавливало LTP в гиппокампальных нейронах [19]. Вовлечённость BDNF в LTP, по крайней мере, частично обусловлена стимуляцией, экспрессии, NMDA-рецепторов. Известно, что NMDA-рецепторы играют важную роль в LTP, стимулируя приток кальция в клетку, который связывается с кальций-зависимыми протеинкиназами и активирует ряд внутриклеточных механизмов, формирующих LTP. В исследовании на культурах клеток гиппокампа и гранулярных клеток мозжечка, *Caldeira M.V.* и соавт. [20] показали, что инкубация с BDNF повышала содержание NMDA-рецепторов в гиппокампальных клетках. Они отметили корреляцию с возрастанием внутриклеточной концентрации кальция и объяснили это повышением входа кальция через дополнительные NMDA-рецепторы. Показано, что BDNF участвует в транспорте NMDA-рецепторов к мембране [20].

BDNF и когнитивные функции. Участие BDNF в нейрогенезе и синаптической пластичности предполагает важность нейротрофина для таких когнитивных функций, как обучение и память. Показано, что содержание BDNF и NGF значительно выше в дорсальном гиппокампе, который участвует в процессах памяти, чем в вентральном, вовлечённом в эмоциональное поведение [21]. У крыс в процессе обучения активируется экспрессия мРНК BDNF в гиппокампе, сопряжённая с активностью глутаматных NMDA рецепторов [22]. Введение BDNF в гиппокамп крысам ведёт к улучшению пространственной памяти в водном лабиринте Морриса [23]. С использованием трансгенных мышей было показано, что участие BDNF в процессах памяти опосредовано TrkB-рецепторами и их сигнальными путями, такими как киназы PLC-γ, ERK1/2 и транскрипционный фактор CREB [24, 25].

BDNF в патофизиологии депрессии. К настоящему времени накоплен большой объём данных, свидетельствующих о центральной роли дефицита BDNF в патогенезе депрессии.

На экспериментальных моделях депрессии было показано, что BDNF при внутримозговом введении оказывает выраженный антидепрессивный эффект [26–28]. Так, 2-кратное введение 300 нг BDNF в желудочки мозга мышам линии ASC (antidepressant sensitive catalepsy) с наследственной предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению снижает время иммобильности в тесте подвешивания за хвост, а также восстанавливает нарушенное сексуальное поведение [29]. На этой же линии мышей BDNF при внутримозговом введении (300 нг) статистически значимо увеличивал экспрессию генов серотониновых рецепторов 2-HT (1A), 5-HT(1A) и 5-HT(2A), а также функциональную активность рецептора 5-HT(2A) [30]. Однократное введение BDNF в гиппокамп крысам (0,25 мкг/кг в каждое полушарие) выраженно предотвращало время замирания в тесте выученной беспомощности, вызванной неизбегаемым электрическим раздражением, и время иммобильности в тесте вынужденного плавания, причём эффект однократного введение BDNF был сравним с эффектами субхронического (7 дней) введения имипрамина или флуоксетина [26]. Антидепрессивный эффект BDNF при однократном внутримозговом введении крысам (1 мкг) в тесте вынужденного плавания был более продолжительным (сохранялся в течение 6 суток), чем эффект антидепрессантов [27].

Показано, что содержание BDNF в плазме крови снижается у людей, страдающих депрессией, и возвращается к норме после лечения их антидепрессантами [31]. Аналогичные результаты были получены и на экспериментальных моделях депрессии [32]. При посмертном анализе у жертв суицида выявляется резко сниженное содержание BDNF в префронтальной коре и гиппокампе [33]. Генетические исследования показали связь между полиморфизмом Val66Met гена BDNF и предрасположенностью к депрессии [34].

Взаимосвязь дефицита BDNF и депрессии хорошо объясняется с точки зрения нейропластической теории депрессии [35, 36], которая в последние годы находит все больше подтверждений. Согласно этой теории, депрессивные расстройства обусловлены нарушением нейропластичности гиппокампа, приводящем к снижению адаптивных способностей мозга. Действительно, посмертные исследования показали, что у людей, страдавших депрессией, снижен объём гиппокампа, а также угнетён гиппокампальный нейрогенез [37–39]. При этом снижение объёма гиппокампа у людей, страдавших депрессией, коррелирует со снижением содержания BDNF и его рецепторов TrkB в данном отделе мозга [40, 41]. Снижение объёма гиппокампа и угнетение гиппокампального нейрогенеза было показано и на *in vivo* моделях депрессии [42]. Следует отметить, что практически все применяющиеся в клинике антидепрессанты стимулируют нейрогенез в гиппокампе на экспериментальных моделях депрессии, что подтверждает важную роль нарушения нейропластичности гиппокампа в патофизиологии депрессии [43]. Хорошо известно, что ключевую роль в регуляции нейрогенеза, синаптогенеза и синаптической пластичности в гиппокампе играет BDNF [34, 44]. Угнетение BDNF-сигналинга или нейрогенеза снижает эффект антидепрессантов. Так, у трансгенных мышей с дефицитом BDNF или TrkB рецепторов эффект антидепрессантов отсутствует [45]. Нарушение гиппокампального нейрогенеза с помощью воздействия низких доз радиации также блокирует эффект антидепрессантов на экспериментальных моделях [46].

Подтверждением взаимосвязи дефицита BDNF с депрессией является хорошо установленный факт, что хронический стресс, являющийся одним из основных

факторов риска развития депрессии, сопровождается снижением содержания гиппокампального BDNF и нарушением нейропластичности гиппокампа.

Функцию физиологической адаптации организма к стрессирующим факторам выполняет гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система. Активация этой системы регулируется с помощью петли отрицательной обратной связи, в которой важную роль играет гиппокамп. Вовлечённость гиппокампа в данную обратную связь обусловлена содержанием в нём большого количества рецепторов глюкокортикоидов и минералокортикоидов – гормонов, выделяемых надпочечниками при активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Активация этих рецепторов приводит к угнетению базальной активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и к завершению её ответа на стресс [47]. Накоплен большой объём экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что хронический стресс приводит к снижению содержания BDNF в гиппокампе, уменьшению объёма гиппокампа, угнетению гиппокампального нейрогенеза и ослаблению отрицательной обратной связи между гиппокампом и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой [43].

Механизмы деструктивных изменений в гиппокампе в ответ на стресс недостаточно изучены, но известно, что в них принимает участие серотониновая система мозга. Установлено, что гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система регулирует чувствительность серотониновой системы, влияя на синтез и активность транспортёра серотонина (так же как и активность специфических транспортёров других моноаминов) [48]. Серотонин стимулирует пролиферацию клеток-предшественников в зубчатой извилине гиппокампа [43] и регулирует чувствительность этих клеток к глюкокортикоидам [49]. Таким образом, дефицит серотонина может вести к угнетению нейрогенеза в гиппокампе. С другой стороны, известно, что BDNF регулирует функционирование серотонинергических нейронов. BDNF и его рецепторы TrkB экспрессируются серотонинергическими нейронами головного мозга [50]. BDNF из гиппокампа (места синтеза) поступает путём ретроградного транспорта в ядра шва продолговатого мозга, где расположены тела серотонинергических нейронов [51]. Установлено, что у трансгенных мышей с дефицитом BDNF значительно снижена по сравнению с нормой серотонинергическая иннервация коры и гиппокампа [52].

Таким образом, хорошо установлена важная роль дефицита BDNF в патофизиологии депрессии, который ассоциирован с нарушением нейропластичности гиппокампа, дисфункцией гипоталамо-гипофизарно надпочечниковой системы, а также нейротрансмиттерной серотонинергической системы.

Вовлеченность BDNF в патогенез других психических заболеваний. Помимо депрессии, BDNF играет существенную роль в патофизиологии целого ряда психических заболеваний. Установлена связь между полиморфизмом Val66Met гена BDNF и повышенным риском развития и/или тяжестью протекания биполярного аффективного расстройства [32], тревожных расстройств [53], шизофрении [54], синдрома Ретта [32], расстройств пищевого поведения [55, 56] и др.

Посмертные исследования показали снижение содержания BDNF в гиппокампе лиц, страдавших биполярным аффективным расстройством [57] и в некоторых регионах мозга у людей, страдавших шизофренией [58]. Содержание BDNF в плазме крови значительно снижено у лиц с обсессивно-компульсивным расстройством и расстройствами пищевого поведения по сравнению со здоровыми людьми [59, 60].

Исследования на трансгенных мышах показали, что дефицит BDNF ассоциирован с нарушениями пищевого поведения [61], повышенной тревожностью [61, 62], с такими позитивными симптомами шизофрении, как психоз, и гиперактивность [32], а также с когнитивными нарушениями [63].

В экспериментах была показана эффективность BDNF на моделях синдрома Ретта и нарушений пищевого поведения. Так, кратковременная инкубация срезов ствола головного мозга трансгенных мышей с мутантным геном MECP2 (модель синдрома Ретта) с BDNF снижает синаптическую гипервозбудимость в нейронах ядра солитарного тракта (входящих в состав дыхательного центра) [64]. Внутримозговое введение BDNF корректирует нарушения пищевого поведения у трансгенных мышей с дефицитом BDNF [60].

Таким образом, BDNF играет ключевую роль в регуляции нейрогенеза, синаптической пластичности, синаптогенеза и нейропластичности в целом. Эти функции BDNF обуславливают его вовлеченность в целый спектр психических и психоневрологических заболеваний.

В связи с вышесказанным разработка основанных на BDNF терапевтических стратегий крайне актуальна и может иметь большие перспективы для развития медицины и фармакологии.

Рецепторы BDNF и их сигнальные пути

BDNF проявляет свои эффекты, связываясь с двумя совершенно разными классами рецепторов – высокоафинными тирозинкиназными TrkB-рецепторами и низкоафинными p75-рецепторами.

TrkB рецепторы экспрессируются на телах нейронов, на аксонах и дендритах во многих структурах мозга, включая кору, гиппокамп, стриатум, ядра перегородки, чёрную субстанцию, клетки Пуркинье мозжечка, ствол мозга, спинальные мотонейроны и чувствительные ядра ствола; кроме того TrkB обнаружен на субпопуляции клеток эпендимы, выстилающей желудочки мозга.

Взаимодействие BDNF с TrkB рецептором приводит к димеризации рецептора и изменению его конформации, вследствие чего происходит ауто-

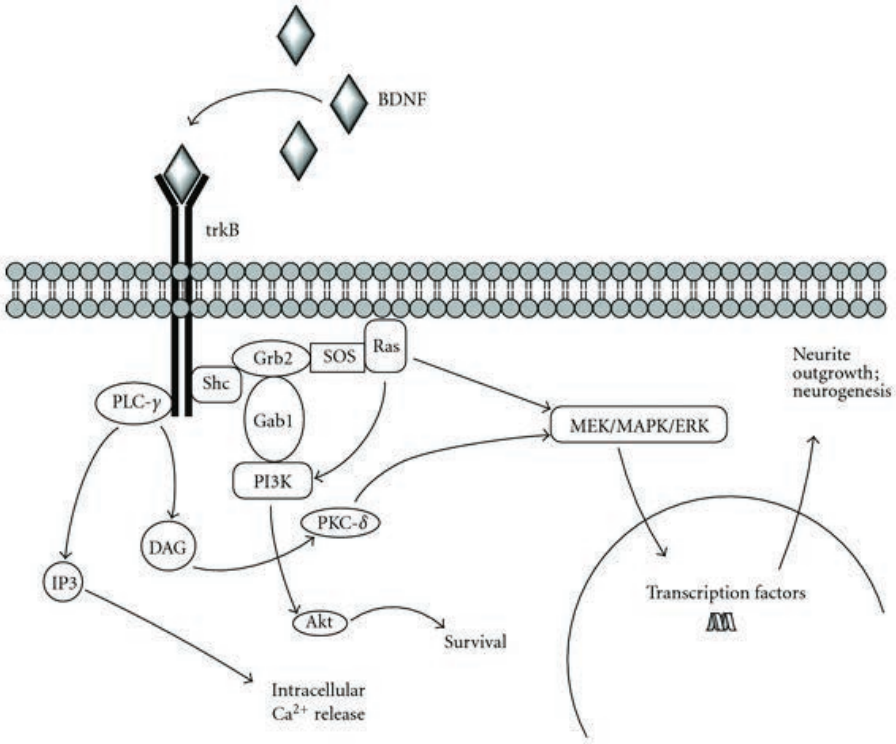


Рис. 1. Сингальные пути TrkB рецептора [28, 29]:
Akt — протеинкиназа B; BDNF – мозговой нейротрофический фактор; DAG – диацилглицерин; ERK – классические митоген-активирующие протеинкиназы; Gab1 – адаптерный белок, связанный с Grb2; Grb2 – адаптерный белок (Growth Receptor Binding protein – белок, связывающий ростовые рецепторы); Intracellular Ca^{2+} release – высвобождение внутриклеточного кальция; IP3 – инозитол-1,4,5-трифосфат; MAPK – митоген-активирующая протеинкиназа; MEK – киназа MAPK и ERK; Neurite outgrowth; neurogenesis – рост аксонов, нейрогенез; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; PKC-δ – протеинкиназа C-δ; PLC-γ – фосфолипаза C-γ; Ras – семейство генов и белков, кодирующих G-белки; SOS – нуклеотидный рилизинг фактор (гуанин-нуклеотид заменяющий фактор); Shc – адаптерный белок ((Src homology 2 domain containing) transforming protein – двухдоменный трансформирующий белок, гомологичный Src); Survival – выживаемость; Transcription factors – факторы транскрипции; TrkB – тирозинкиназный рецептор II типа

фосфорилирование тирозиновых остатков его цитоплазматического домена. В результате происходит формирование сайтов связывания с сигнальными и адапторными белками, которые активируют PI3/AKT-киназный, MAP/ERK-киназный сигнальные каскады и фосфолипазу C (PLC-γ) [67] (рис. 1).

PI3/AKT-киназный путь в основном отвечает за нейропротекцию, MAP/ERK-киназный каскад вовлечён в нейропротекцию, дифференцировку, а также синаптическую пластичность и нейрогенез, фосфолипаза C (PLC-γ) опосредует синаптическую пластичность, дифференцировку клеток и рост аксонов [66, 67].

P75-рецепторы взаимодействуют со всеми белками семейства нейротрофинов. Они могут служить корецепторами для TrkB рецепторов, усиливая опосредуемые ими функции или стимулировать апоптоз [65]. Trk и p75 рецепторы часто находятся в непосредственной близости на клеточной мембране [68]. Основные внутриклеточные каскады, активируемые p75 рецепторами [69]:

– каскад, опосредованный NF-kB (Nuclear Factor kappa B), который стимулирует рост дендритов и увеличивает выживаемость аксонов;

– каскад, опосредованный JNK (c-Jun-N-terminal kinase), который ведёт к гибели клеток путём апоптоза;

– каскад, опосредованный церамидом, который может способствовать как поддержанию жизнеспособности клеток, так и их апоптозу.

Структура BDN

Нейротрофины представляют собой гомодимеры нековалентно связанных мономеров из примерно 120 аминокислотных остатков каждый. Рентгеноструктурный анализ NGF [70], NT3 [71], NT4/5 и BDNF/NT/4,5 [72] выявили присущий им общий способ сворачивания. Каждый мономер содержит 7 бета-тяжей, которые входят в состав трёх продольных закрученных бета-листа. Эти бета-листы заканчиваются тремя экспонированными в растворитель шпилькообразными петлями 1, 2 и 4 и удлинённой петлей 3.

Петли преимущественно соответствуют вариабельным районам аминокислотной последовательности. Каждый мономер стабилизирован шестью полностью консервативными цистеиновыми остатками, которые образуют 3 дисульфидных мостика, организованные в так называемый цистеиновый узел, характерный для всех ростовых факторов. Мономеры нейротрофинов связаны нековалентно и параллельно, вследствие чего шесть петель располагаются на одной стороне димерной молекулы (рис. 2).

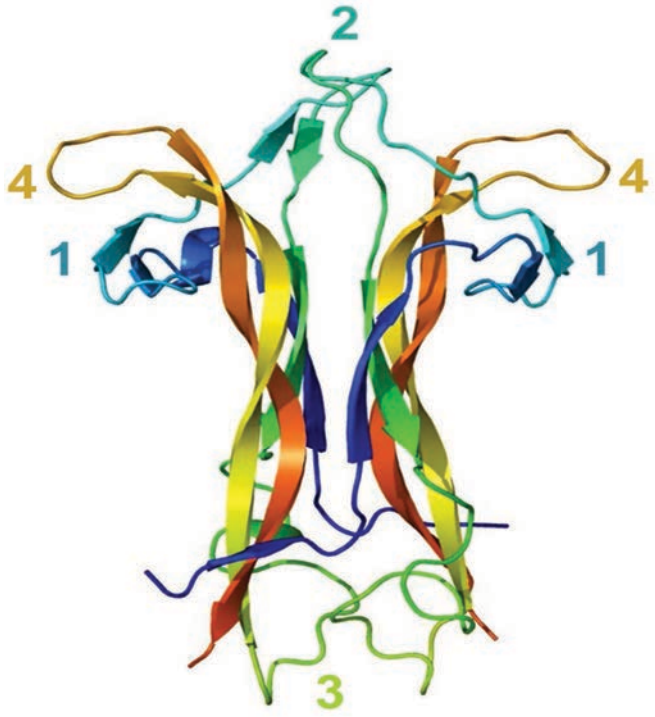


Рис. 2. Структура гетеродимера BDNF/NT-4 (ID 1b8m). Петли – 1, 2, 3, 4 [72]

В 90-х годах серия исследований по сайт-направленному мутагенезу позволила *Ibáñez C.F.* и сотр. [73] предположить, что петли 1, 2 и 4 являются носителями аминокислотных остатков, непосредственно участвующих в связывании с рецепторами.

Низкомолекулярные миметики BDNF

Первые низкомолекулярные миметики BDNF были получены исследовательской группой из Университета Мельбурна (Австралия) под руководством *Hughes R.* [74]. К началу работы трёхмерная структура BDNF была неизвестна. Информацию о ней группа Хьюза получила с помощью гомологичного моделирования на основе трёхмерной структуры NGF, описанной *McDonald N.Q.* и др. в 1991 г. [70]. Полученная таким образом трёхмерная структура BDNF была позже подтверждена рентгеноструктурными исследованиями *Robinson R.C.* и соавт. [75]. К этому времени было известно, что химерный NGF с имплантированной 2-й петлей BDNF приобретал способность связываться с TrkB-рецепторами [76]. В связи с этим внимание исследователей было обращено на петлю 2, определённую ими как Glu^{40}-Lys^{41}-Val^{42}-Pro^{43}-Val^{44}-Ser^{45}-Lys^{46}-Gly^{47}-Gln^{48}-Leu^{49}-Lys^{50}-Gln^{51}. Путём моделирования с помощью программы Hyperchem были сконструированы циклические пептиды, конформационно ограниченные дисульфидными мостиками остатков цистеина. Из этих циклопептидов с помощью алгоритма Polack-Ribere и силового поля MM+ были отобраны четыре соединения, теоретически конформационно близких петле 2 и содержащих от 12 до 6 аминокислотных остатков BDNF (L2-12, L2-10, L2-8, L2-6, рис. 3).

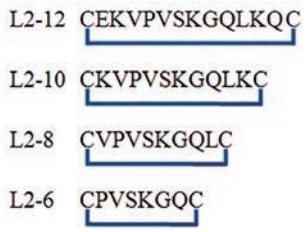


Рис. 3. Миметики 2-й петли BDNF [74]

Сконструированные пептиды были получены твердофазным синтезом с последующим окислением цистеиновых остатков диметилсульфоксидом при pH 8,0.

Изучение влияния синтезированных пептидов на выживаемость сенсорных нейронов куриных зародышей выявило концентрационно-зависимое ингибирование выживаемости опосредованной BDNF. Максимальный эффект у всех пептидов наблюдался в микромолярной концентрации. Выраженность эффекта у пептидов L2-12 и L2-10 составляла 40%, у пептида L2-8 — 50%, у пептида L2-6 — 27%. Соответствующие линейные пептиды были не активны. Все циклопептиды не ингибировали действие NGF. Так впервые были получены специфичные конкурентные антагонисты TrkB.

В следующей работе [77] авторы на основе наиболее активного циклопептида L2-8 с помощью программы Sybyl сконструировали димерные ди- и трициклические пептидные миметики второй петли с агонистической активностью. В их числе бициклические димерные пептиды, димеризованные дисульфидной связью, амидной связью и трициклические димерные пептиды, димеризованные и амидной, и дисульфидной связями (рис. 4). Димеризацию дисульфидной связью осуществляли, вводя остатки цистеина вовнутрь последовательности L2-8. Димеризацию с помощью амидной связи осуществляли, вводя в качестве С-концевых остатки лизина и глутаминовой кислоты, которые далее объединяли амидной связью боковых функциональных групп.

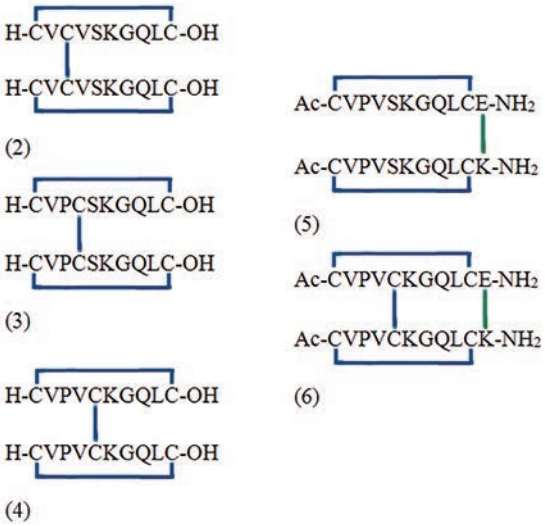


Рис. 4. Би- и трициклические миметики петель BDNF [77]

Место введения димеризующей связи определялось, исходя из расстояний между соответствующими аминокислотными остатками во второй петле.

Сконструированные соединения были синтезированы твёрдофазным методом в сочетании с методом образования амидной связи (γ-Glu-ε-Lys) частично защищённых продуктов и образования дисульфидной связи путём окисления остатков цистеина.

Эффекты бициклических димеров были изучены на первичных культурах сенсорных нейронов зародышей цыплят. Соединения 2, 4, 5 и 6 проявляли концентрационно-зависимое увеличение выживаемости нейронов. Среди бициклов наиболее активным было соединение 5 с $EC_{50}=10^{-10}$M с выраженностью эффекта 30% от BDNF. Среди всех соединений самым активным было трициклическое соединение 6 (35% от BDNF; $EC_{50}=10^{-11}$M). Все соединения концентрационно-зависимо ингибировали эффекты BDNF на выживаемость, являясь, таким образом, его частичными агонистами-антагонистами. Соединение 3 обладало только антагонистическими свойствами.

Для воспроизведения пространственной структуры BDNF, содержащей 3 пары, участвующих в связывании рецептора петель, группа, Хьюза получила, наряду с мономерными аналогами, димерные миметики петель BDNF [78]. Были сконструированы как интра-цепочечные (относящиеся к одной и той же полипептидной цепи), так и интерцепочечные (относящиеся к разным полипептидным цепям) димеры. В первых (гетеродимерных) были объединены петли 1 и 2, 2 и 4. Во втором случае речь шла о гомодимерах, объединявших 2 и 2' петли, 4 и 4' петли разных полипептидных цепей BDNF. Положение цистеиновых мостиков определялось как визуально, так и с использованием программы Sybyl 6.4. Таким образом, чтобы внесённые в структуру возмущения были минимальны.

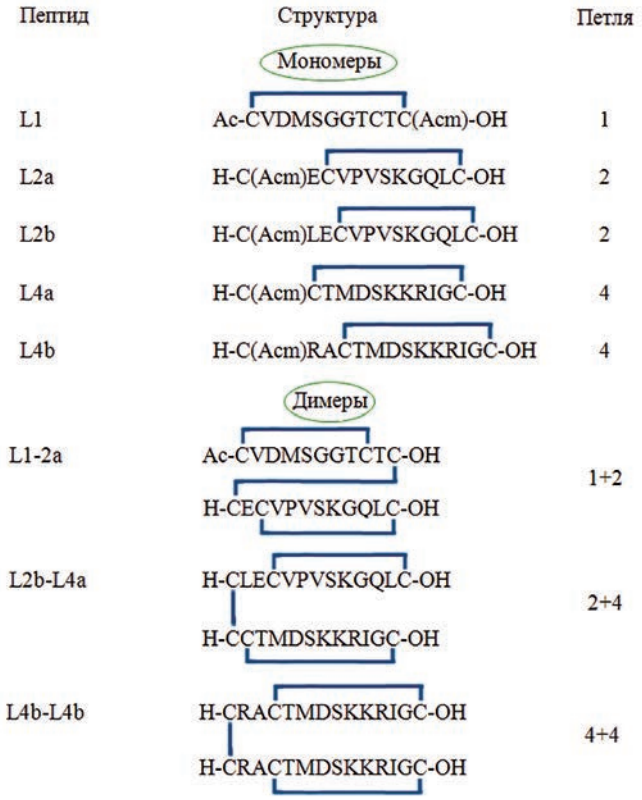


Рис. 5. Мономерные и димерные пептидные миметики 1, 2 и 4-й петель BDNF

Мономерные пептиды концентрационно-зависимо ингибировали эффекты BDNF на выживаемость сенсорных нейронов эмбрионов цыплят. L1 проявлял наименьшую активность (10^{-5}M, 30% ингибирования). Другие мономерные пептиды были активны уже в концентрации 10^{-7}M. L2a обладал наибольшей ингибирующей активностью. Он был активен в интервале концентраций 10^{-9}–10^{-5}M с максимальным эффектом 45% в концентрации 10^{-5}M. Миметики 4-й петли L4a и L4b были активны в интервале концентраций 10^{-7}–10^{-5}M с максимальными эффектами 49 и 41%, соответственно, оба в концентрации 10^{-5}M.

Почти все димерные миметики также обладали ингибирующей активностью. И только гомодимерный бициклический пептид L4b-L4b обладал агонистической активностью, будучи способным в концентрации 10^{-5}M увеличивать выживаемость сенсорных нейронов.

В целом, австралийскими учёными было показано, что мономерные моноциклические пептиды, как и гетеродимерные бициклические пептиды, основанные на петлях 1, 2 и 4, являются ингибиторами BDNF, в то время как гомодимерные бициклические пептиды являются агонистами BDNF.

Таким образом, были получены низкомолекулярные миметики BDNF с агонистической активностью как на основе 2-й [77], так и на основе 4-й петель нейротрофина [78].

Эти соединения, будучи низкомолекулярными аналогами BDNF, всё ещё обладали большой молекулярной массой и были слишком сложны по структуре для дальнейшего развития в качестве лекарственных средств. В связи с этим группа Хьюза создала циклический протеолитически стабильный миметик BDNF, представляющий собой циклический пентапептид цикло(-*D*-Pro-Ala-Lys-Lys-Arg-), однако являющийся лигандом не TrkB, а p75 нейротрофинового рецептора [79]. Основой для конструирования этого циклопептида явились данные сайт-направленного мутагенеза о ключевой роли трипептидной последовательности -Lys-Lys-Arg- 4-й петли BDNF во взаимодействии с p75 рецептором [73].

Конструирование циклопептида проводилось с помощью программ Sybyl 6.4 и Hyperchem 4.0. Трипептидная последовательность Lys^{94}-Lys^{95}-Arg^{96} 4-й петли BDNF была взята из трёхмерной структуры BDNF, полученной путём гомологичного моделирования [77]. Далее был рассмотрен широкий набор конформационных ограничителей, из которого были выбраны аминокислотные остатки, которые помещались между *N*- и *C*-концами трипептидной последовательности. В качестве таковых рассматривались пары Gly, Ala и Pro (включая *D*-формы), а также β-аминокислоты и другие ω-алкиламинокислоты различной длины. Каждая структура оптимизировалась до локального минимума конформационной энергии в силовом поле AMBER, имплиментированного в Hyperchem. Перспективные циклопептиды подвергались дальнейшим конформационным исследованиям с использованием команды Conformation search в Hyperchem, в которых торсионные углы основной цепи менялись случайным образом и полученные структуры вновь минимизировались по энергии. Уникальные низкоэнергетические конформации, в которых среднеквадратичное отклонение α- и β-углеродных атомов от соответствующих атомов природного трипептида было меньше 0,4 Å, использовались для дальнейшей работы.

Визуальное моделирование дало 57 циклопептидов. Минимизация энергии уменьшила их число до 9, конформационный анализ и сравнение с природным трипептидом оставили 2 пептида, 6-аминогексаноил-содержащий тетрапептид (цикло-(Ahx-Lys-Lys-Arg)) и D-Pro – содержащий пентапептид (цикло-(*D*-Pro-Ala-Lys-Lys-Arg)). Оба были синтезированы твёрдофазным пептидным синтезом с последующей циклизацией в растворе. Наиболее активным по выживаемости сенсорных нейронов в экспериментах на культуре 8-дневных куриных эмбрионов был циклопентапептид, который давал 38% от активности BDNF при 10^{-6}M и 68% при 10^{-4}M. Он увеличивал эффект BDNF и не проявлял активности на NGF-зависимой культуре нейронов.

Этот пептид не влиял на TrkB и его низлежащие пути сигналинга (MAPK), что было показано методом Вестерн-блот-анализа. Его взаимодействие с p75 рецептором подтверждается тем, что он способствует периферической миелинизации нервных волокон *in vitro* и *in vivo* [80]. Известно, что в этом процессе участвует p75 рецептор, тогда как активация TrkB ингибирует миелинизацию. Эксперименты *in vitro* проводились на культуре NGF-зависимых нейронов дорсального корневого ганглия (DRG) новорождённых крыс Спрег-Доули (Sprague Dawley) (P2 S/D). Миелинизацию определяли Вестерн-блот-анализом с помощью моноклональных антител к гликопротеину, ассоциированному с миелином (MAG) и к основному белку миелина (MBP) и гистохимически. Пептид был активен в концентрациях 10^{-8}–10^{-7}M. В то же время ни циклопентапептид, ни BDNF не были активны на DRG нейронах из p75NTR-/- мышей. Это показывает, что экспрессия p75 абсолютно необходима для промиелинизирующего действия как BDNF, так и цикло-DPAKKR. Эксперименты *in vivo* проводились на крысах Спрег-Доули путём подкожной инъекции 3,2 мкг цикло-DPAKKR с последующим извлечением седалищного нерва и определением экспрессии основного регулятора миелинизации NRG1-type III, а также MAG и MBP методом Вестерн-блот-анализа. Было показано, что циклопентапептид увеличивал экспрессию NRG1-type III и миелинизацию, в то время как BDNF был не активен. Цикло-DPAKKR или подобные ему, которые усиливают миелинизацию селективно через p75 рецептор, могут быть использованы для лечения периферических демиелинизнирующих заболеваний.

В отличие от пентапептида, трициклический димерный пептид 6 (рис. 4), селективно активирующий TrkB рецептор, селективно усиливает миелинизацию центральных нейронов (0,1 – 100 нМ *in vitro*) [81], что может быть полезно при лечении таких заболеваний, как рассеянный склероз.

Для улучшения фармакокинетических свойств цикло-(*D*-Pro-Ala-Lys-Lys-Arg) был гидрофобизован путём замены Ala на Lys и введения н-алкилацильной группы в ω-аминогруппу этого лизина [82]. Эффективная концентрация пентадеканоильного производного цикло-DPKKKR *in vitro* уменьшилась на 2 порядка (pEC_{20BDNF} = 9,1), увеличилась его стабильность в плазме крыс и способность проникать через модельные биологические мембраны.

Группа *Longo F.M.* [83] разработала непептидные аналоги 2-й петли BDNF, исходя из данных [76, 84] о важности участка SKGOL для проявления активности нейротрофина, полученных с помощью химерных белков NGF/BDNF. На основе пространственной структуры этого участка *Longo F.M.* постулировал фармакофорную гипотезу, которая была использована для виртуального скрининга. Постулированный фармакофор имел 35 конформеров, для каждого из них был осуществлён скрининг *in silico* более миллиона доступных соединений из библиотек Asinex, AMRI, Interbioscreen, Sigma-Aldrich, Timtec, Chemstar. Виртуальный скрининг дал 1 855 кандидатов, которые совмещались с конформером фармакофора со сво-

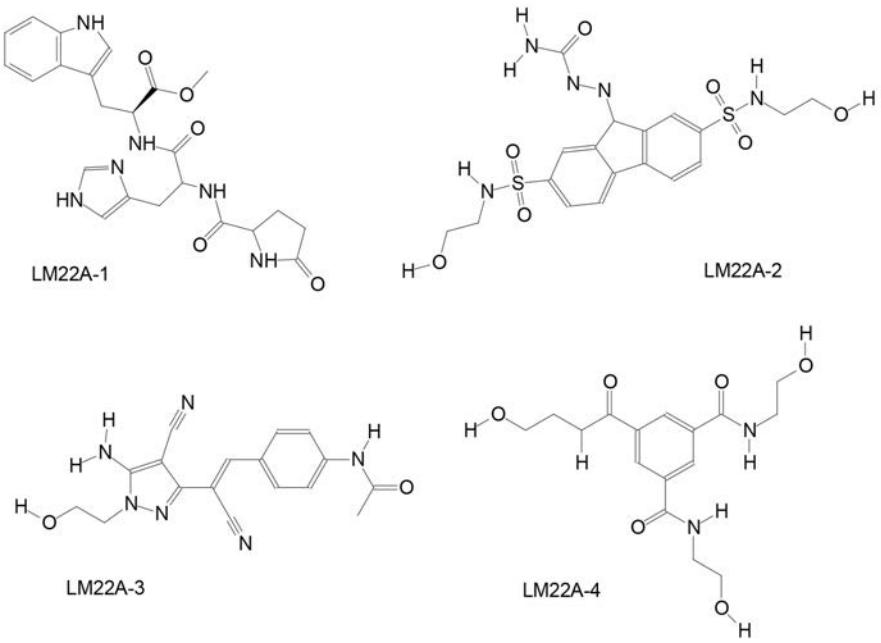


Рис. 6. Миметики BDNF, найденные скринингом [83]

бодной энергией менее 10 ккал/моль. Это количество было уменьшено до 14 на основе таких критериев, как отсутствие объёма, который мог бы мешать взаимодействию с рецептором, наличия гибкости молекулы, молекулярной массы между 500 и 650 Да, и критериев Липинского (Lipinski). Соединения, находящиеся на границе этих критериев и с трудом налагающиеся на фармакофор, были исключены. 7 из этих соединений были коммерчески доступны и для них был проведён анализ *in vitro* на гиппокампальных нейронах мыши E16. Нейротрофической активностью обладали четыре из них, получившие шифры LM22A-1, LM22A-2, LM22A-3 и LM22A-4 (рис. 6). Они показывали 80–89% от активности BDNF с EC50 от 200 до 500 pM.

Все соединения проявили себя как селективные частичные агонисты TrkB рецепторов, что было показано ингибиторным анализом с K252a и Вестерн-блот анализом $TrkB^{Y490}p$ на клетках, экспрессирующих только TrkB или TrkA или TrkC. Отобранное благодаря простоте структуры и возможности модернизации, соединение 4 (три(оксиэтиламид) 1,3,5- бензолтрикарбоновой кислоты) было активно на клеточных моделях болезней Альцгеймера, Хаттингтона и Паркинсона в концентрации 0,5 мкМ в экспериментах *in vitro*. Соединение 4 в дозе 3,4 мкг при двухнедельном интраназальном введении способствовало восстановлению моторных функций после экспериментальной травмы мозга у крыс.

Было показано, что соединение LM22A-4 эффективно на моделях синдрома Ретта в экспериментах *in vitro* (0,5 мкМ) и *in vivo* (150 мг/кг внутрибрюшинно, мыши) [83, 85].

Кроме того, японские исследователи из Хиросимского университета (Hiroshima) показали [86], что LM22A-4, аналогично BDNF, регулирует дифференцировку цементобластов, которая осуществляется через TrkB-ERK/AKT сигнальный каскад. Это может дать новый лекарственный способ регенерации периодонтальной ткани и лечения пародонтоза.

Группа исследователей из Нью-Йоркского государственного института фундаментальных исследований нарушений развития получила 5 терапевтически перспективных тетрапептидов B1–B5, соответствующих последовательностям 6–9, 71–74, 94–97, 72–75, 115–118 BDNF человека [87]. Пептидные последовательности были выявлены как эпитопы моноклональных антител к активным сайтам BDNF. Для того, чтобы блокировать заряды концевых аминокислот, пептиды были ацилированы по N-концу и амидированы по C-концу: B1 (Ac-RRGF-$CONH_2$), B2 (Ac-IDKR-$CONH_2$), B3 (Ac-SKKR-$CONH_2$), B4 (Ac-DKRH-$CONH_2$) и B5 (IKRG-$CONH_2$). Все пептиды вызывали умеренную активацию (фосфорилирование по Y706) TrkB-рецептора, которая блокировалась K252a, ингибитором семейства Trk. Наиболее активными были пептиды B3 и B5, которые работали как частичные агонисты/антагонисты BDNF. Они увеличивали выживаемость мышиных первичных нейронов E18 гиппокампа (0,1–1 мкМ) и вызывали экспрессию нейрональных маркеров MAP2, β-III тубулина, NTM и NeuM аналогично BDNF в концентрации 0,8 нМ. В отличие от B5, B3 имеет аддитивный эффект с BDNF по защите нейронов от окислительного стресса. Авторы предполагают, что B3 может иметь дополнительный сигналинг, отличный от такового BDNF, активируя и другие рецепторы, нежели TrkB. Авторы делают вывод, что эти пептиды более перспективны как лекарственные препараты,

чем димерные циклические пептиды Хьюза, поскольку имеют меньшую молекулярную массу и могут легче проникать через биологические барьеры и более перспективны, чем непептидные миметики Лонго, так как метаболизируются до природных аминокислот.

Таким образом, для конструирования миметиков BDNF использовались данные по сайт-направленному мутагенезу и химеризации NGF/BDNF, поиск среди эпитопов моноклональных антител к активным участкам BDNF, рандомизированный скрининг среди химических библиотек на основе фармакофора, предложенного в результате анализа данных сайт-направленного мутагенеза.

Отметим, что ни для одного из рассмотренных выше миметика не приводятся данные по антидепрессивной активности.

В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова был использован принципиально иной подход, состоящий в использовании для моделирования центральных фрагментов бета-изгибов петлеобразных участков как наиболее экспонированных наружу и поэтому максимально доступных для взаимодействия с рецептором. Эта стратегия привела к наименьшим из всех возможных пептидных аналогов BDNF – дипептидам.

На основе бета-изгиба 4-й петли BDNF был сконструирован миметик ГСБ-106 (гексаметилендиамид бис(моносукцинил-серил-лизина)) [88].

Вестерн-блот анализом с использованием мышиных гиппокампальных клеток HT22 было показано, что ГСБ-106 селективно активирует TrkB-рецептор и его низлежащие сигнальные AKT и MAP киназные пути [89].

ГСБ-106 обладает в экспериментах *in vitro* на разных клеточных культурах в условиях окислительного стресса, 6-оксидофаминовой и глутаматной токсичности нейропротекторным эффектом в концентрациях 10^{-5}–10^{-8}М [90]. Нейропротекторная активность была подтверждена в экспериментах *in vivo* [91]. На мышах и крысах ГСБ-106 проявлял антидепрессивную активность в дозах 0,1–10 мг/кг внутрибрюшинно и перорально в моделях неизбегаемого плавания как по Порсолту, так и по Номуре, подвешивания за хвост по Стере и в модели выученной беспомощности [92].

ГСБ-106 оказывал стимулирующее влияние на нейрогенез в условиях субхронического стресса у мышей, вызванного контактом с хищником [93].

Предварительные токсикологические и фармакокинетические исследования показали, что ГСБ-106 нетоксичен (LD_{50} для беспородных мышей-самцов > 4,5 г/кг) и проникает через гемато-энцефалический барьер).

Полученные данные об антидепрессивной активности низкомолекулярного миметика BDNF ГСБ-106, с одной стороны, подтверждают гипотезу о вовлечении BDNF в патогенез различных форм депрессивных состояний, а с другой — открывают перспективу разработки на основе вновь синтезированного соединения нового оригинального по структуре и механизму действия антидепрессанта. Следует отметить, что ГСБ-106 является первым в мире миметиком BDNF, для которого была выявлена антидепрессивная активность

Заключение

Депрессия является наиболее распространённым психическим заболеванием во всем мире. Применяющиеся в клинике антидепрессанты не обладают достаточной эффективностью, кроме того при их длительном применении возникает большой риск развития побочных эффектов.

Высоким потенциалом для лечения депрессии обладает BDNF, что обусловлено его ключевой ролью в регуляции нейрогенеза и нейропластичности. Однако применение нативного нейротрофина в клинике ограничено его неудовлетворительными фармакокинетическими свойствами. Одним из подходов для преодоления ограничений применения BDNF является создание его низкомолекулярных миметиков, реализующих при системном введении фармакотерапевтические эффекты целого белка.

В НИИ фармакологии имени В.В.Закусова был создан первый в мире миметик BDNF, ГСБ-106, для которого была показана антидепрессивная активность.

Литература

1. *Barde Y.A., Davies A.M., Johnson J.E., Lindsay R.M., Thoenen H.* Brain-derived neurotrophic factor. Prog Brain Res. 1987; 71: 185–189.
2. *Egan M.F., Kojima M., Callicott J.H., Goldberg T.E., Kolachana B.S., Bertolino A., Zaitsev E., Gold B., Goldman D., Dean M., Lu B., Weinberger D.R.* The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. Cell. 2003; 112: 2: 257–269.
3. *Bath K.G., Lee F.S.* Variant BDNF (Val66Met) impact on brain structure and function. Cogn. Affect Behav. Neurosci. 2006; 6: 1: 79–85.
4. *Maisonpierre P.C., Belluscio L., Friedman B., Alderson R.F., Wiegand S.J., Furth M.E., Lindsay R.M., Yancopoulos G.D.* NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. Neuron. 1990; 5: 4: 501–509.
5. *Altman J., Bayer S.A.* The development of the rat spinal cord. Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology. 1984; 85: 1–164.
6. *Bayer S., Altman J.* Development of the telencephalon: neural stem cells, neurogenesis and neuronal migration in The Rat Nervous System. G. Paxinos, Ed., Elsevier, Waltham, Mass, USA. 2004: 27–73.
7. *Jones K.R., Farinas I., Backus C., Reichardt L.F.* Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. Cell. 1994; 76: 6: 989–999.
8. *Ernfors P., Lee K.F., Jaenisch R.* Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. Nature. 1994; 368: 6467: 147–150.
9. *Schwartz P.M., Borghesani P.R., Levy R.L., Pomeroy S.L., Segal R.A.* Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF (-/-) mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. Neuron. 1997; 19: 2: 269–281.
10. *Pencea V., Bingaman K.D., Wiegand S.J., Luskin M.B.* Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. J. Neurosci. 2001; 21: 17: 6706–6717.
11. *Scharfman H., Goodman J., Macleod A., Phani S., Antonelli C., Croll S.* Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after

intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. Experimental Neurology. 2005; 192: 2: 348–356.

12. *Danzer S.C., Crooks K.R.C., Lo D.C., McNamara J.O.* Increased expression of brain-derived neurotrophic factor induces formation of basal dendrites and axonal branching in dentate granule cells in hippocampal explant cultures. J. Neurosci. 2002; 22: 9754–9763.

13. *Gottmann K., Mittmann T., Lessmann V.* BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses. Experimental Brain Research. 2009; 199: 3-4: 203–234.

14. *Gärtner A., Polnau D.G., Staiger V., Sciarretta C., Minichiello L., Thoenen H., Bonhoeffer T., Korte M.* Hippocampal long-termpotentiation is supported by presynaptic and postsynaptic tyrosine receptor kinase B-mediated phospholipase Cγ signaling. J. Neurosci. 2006; 26: 13: 3496–3504.

15. *Pozzo-Miller L.D., Gottschalk W., Zhang L., McDermott K., Du J., Gopalakrishnan R., Oho C., Sheng Z.H., Lu B. Pozzo-Miller L.D., Gottschalk W., Zhang L., McDermott K., Du J., Gopalakrishnan R., Oho C., Sheng Z.H., Lu B.* Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. J. Neurosci. 1999; 19: 12: 4972–4983.

16. *Korte M., Carroll P., Wolf E., Brem G., Thoenen H., Bonhoeffer T.* Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1995; 92: 19: 8856–8860.

17. *Korte M., Griesbeck O., Gravel C., Carroll P., Staiger V., Thoenen H., Bonhoeffer T.* Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1996; 93: 22: 12547–12552.

18. *Xu B., Gottschalk W., Chow A, Wilson R.I., Schnell E., Zang K., Wang D., Nicoll R.A., Lu B., Reichardt L.F.* The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving trkB. J. Neurosci. 2000; 20: 18: 6888–6897.

19. *Kram´ar E.A., Chen L.Y., Lauterborn J.C., Simmons D.A., Gall C.M., Lynch G.* BDNF upregulation rescues synaptic plasticity in middle-aged ovariectomized rats. Neurobiology of Aging. 2012; 33: 4: 708–719.

20. *Caldeira M.V., Melo C.V., Pereira D.B., Carvalho R.F., Carvalho A.L., Duarte C.B.* BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons Molecular and Cellular Neuroscience. 2007; 35: 2: 208–219.

21. *Zhu S.W., Yee B.K., Nyffeler M., Winblad B., Feldon J., Mohammed A.H.* Influence of differential housing on emocional behavior and neurotrophin levels in mice. Behav. Brain Res. 2006; 169: 10–20.

22. *Kesslak J.P., Chuanq K.R., Berchtold N.C.* Spatial learning is delayed and brain-derived neurotrohpic factor mRNA expression inhibited by administration of MK-801 in rats. Neurosci. Lett. 2003; 353: 2: 95–98.

23. *Cirulli A., Berry A., Chiarotti F., Alleva E.* Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus-maze. Hippocampus. 2004; 14: 7: 802–807.

24. *Koponen E.,Võikar V., Riekki R., Saarelainen T., Rauramaa T., Rauvala H., Taira T., Castrén E.* Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor TrkB exhibit increased activation of the TrkB-PLCgamma pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. Mol. Cell. Neurosci. 2004; 26: 1: 166–181.

25. *Alonso M., Vianna M.R., Depino A.M., Mello e Souza T., Pereira P., Szapiro G., Viola H., Pitossi F., Izquierdo I., Medina J.H.* BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. Hippocampus. 2002; 12: 4: 551–560.

26. *Shirayama Y., Chen A.C., Nakagawa S., Russell D.S., Duman R.S.* Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. J. Neurosci. 2002; 22: 3251–3261.

27. *Hoshaw B.A., Malberg J.E., Lucki I.* Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects. Brain Res. 2005; 1037: 204–208.

28. *Hu Y., Russek S.J.* BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. J. Neurochem. 2008; 105: 1–17.

29. *Tikhova M., Kulikov A.V.* Antidepressant-like effects of central BDNF administration in mice of antidepressant sensitive catalepsy (ASC) strain. Chin J. Physiol. 2012; 55: 4: 284–293.

30. *Naumenko V.S., Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Tsybko A.S., Tikhonova M.A., Popova N.K.* Effect of brain-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain seretonon system in genetically predisposed to behavioral disorders mouse strains. Neurosci. 2012; 214: 59–67.

31. *Polyakova M., Stuke K., Schuemberg K., Mueller K., Schoenknecht P., Schroeter M.L.* BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders: a systematic & quantitative meta-analysis. J. Affect. Disord. 2015; 174: 432–440.

32. *Autry A.E., Monteggia L.M.* Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. Pharmacol. Rev. 2012; 64: 2: 238–258.

33. *Karege F., Vaudan G., Schwald M., Perroud N., La Harpe R.* Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. Mol. Brain Res. 2005; 136: 1–2: 29–7.

34. *Jiang C., Salton R.* The Role of Neurotrophins in Major Depressive Disorder. Transl. Neurosci. 2013; 4: 1: 46–58.

35. *Wainwright S.R., Galea L.A.* The neural plasticity theory of depression: assessing the roles of adult neurogenesis and PSA NCAM within the hippocampus. Neural. Plast. 2013; 805497.

36. *Dwivedi Y.* Involvement of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Late-Life Depression. Am. J. Geriatr. Psychiatry. 2013; 21: 5: 433–449.

37. *McKinnon M.C., Yucel K., Nazarov A., MacQueen G.M.* A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder. J. Psychiatry and Neurosci. 2009; 34: 1: 41–54.

38. *Cobb J.A., Simpson J., Mahajan G.J., Overholser J.C., Jurjus G.J., Dieter L., Herbst N., May W., Rajkowska G., Stockmeier C.A.* Hippocampal volume and total cell numbers in major depressive disorder. J. Psychiatric Res. 2013; 47: 3: 299–306.

39. *Boldrini M., Santiago A.N., Hen R., Dwork A.J., Rosoklija G.B., Tamir H., Arango V., John Mann J.* Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression. Neuropsychopharmacol. 2013; 38: 6: 1068–1077.

40. *Castren E.* Neurotrophic effects of antidepressant drugs. Curr. Opin. Pharmacol. 2004; 4: 58–64.

41. *Pandey G.N., Ren X., Rizavi H.S., Conley R.R., Roberts R.C., Dwivedi Y.* Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor signalling in post-mortem brain of teenage suicide victims. Int. J. Neuropsychopharmacol. 2008; 11: 1047–1061.

42. *Pham K., Nacher J., Hof P.R., McEwen B.S.* Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSANCAM expression in adult rat dentate gyrus. Eur. J. Neurosci. 2003; 17: 879–886.

43. *Masi G., Brovedani P.* The Hippocampus, Neurotrophic Factors and Depression. Possible implications for the pharmacotherapy of depression. CNS Drugs. 2011; 25: 11: 913-932.

44. *Dwivedi Y.* Involvement of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Late-Life Depression. Am. J. Geriatr. Psychiatry. 2013; 21: 5: 433–449.

45. *Saarelainen T., Hendolin P., Lucas G., Koponen E., Sairanen M., MacDonald E., Agerman K., Haapasalo A., Nawa H., Aloyz R., Ernfors P., Castrén E.* Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for anti-depressant-induced behavioral effects. J. Neurosci. 2003; 23: 1: 349–357.

46. *Santarelli L., Saxe M., Gross C., Surget A., Battaglia F., Dulawa S., Weisstaub N., Lee J., Duman R., Arancio O., Belzung C., Hen R.* Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science. 2003; 301: 805–809.

47. *Phillips L.J., McGorry P.D., Garner B., Thompson K.N., Pantelis C., Wood S.J., Berqer G.* Stress, the hippocampus and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implication for the development of psychotic disorders. Aust. N. Z. J. Psychiatry. 2006; 40: 9: 725–741.

48. *Figlewicz D.P.* Endocrine regulation of neurotransmitter transport. Epilepsy Res. 1999; 37: 203–210.

49. *Huang G.J., Herbert J.* The role of 5-HT1A receptors in the proliferation and survival of progenitor cells in the dentate gyrus of the adult hippocampus and their regulation by corticoids. Neurosci. 2005; 135: 803–813.

50. *Merlio J.P., Ernfors P., Jaber M., Persson H.* Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system. Neurosci. 1992; 51: 513–532.

51. *Anderson K.D., Alderson R.F., Altar C.A., DiStefano P.S., Corcoran T.L., Lindsay R.M., Wiegand S.J.* Differential distribution of exogenous BDNF, NGF, and NT-3 in the brain corresponds to the relative abundance and distribution of high-affinity and low-affinity neurotrophin receptors. J. Comp. Neurol. 1995; 357: 296–317.

52. *Lyons W.E., Mamounas L.A., Ricaurte G.A., Coppola V., Reid S.W., Bora S.H., Wihler C., Koliatsos V.E., Tessarollo L.* Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1999; 96: 15239–15244.

53. *Soliman F., Glatt C.E., Bath K.G., Levita L., Jones R.M., Pattwell S.S., Jing D., Tottenham N., Amso D., Somerville L.H., Voss H.U., Glover G., Ballon D.J., Liston C., Teslovich T., Van Kempen T., Lee F.S., Casey B.J.* A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. Science. 2010; 327: 863–866.

54. *Numata S., Ueno S., Iga J., Yamauchi K., Hongwei S., Ohta K., Kinouchi S., Tayoshi S., Aono M., Kameoka N., Sumitani S., Tomotake M., Kaneda Y., Taniguchi T., Ishimoto Y., Ohmori T.* Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism in schizophrenia is associated with age at onset and symptoms. Neurosci. Lett. 2006; 401: 1–5.

55. *Ribases M., Gratacos M., Fernandez-Aranda F., Bellodi L., Boni C., Anderluh M., Cristina Cavallini M., Cellini E., Di Bella D., Erzegovesi S., Foulon C., Gabrovsek M., Gorwood P., Hebebrand J., Hinney A., Holliday J., Hu X., Karwautz A., Kipman A., Komel R., Nacmias B., Remschmidt H., Ricca V., Sorbi S., Tomori M., Wagner G., Treasure J., Collier D.A., Estivill X.* Association of BDNF with restricting anorexia nervosa and minimum body mass index: a family-based association study of eight European populations. Eur. J. Hum. Genet. 2005; 13: 428–434.

56. *Dmitrzak-Weglarz M., Skibinska M., Slopien A., Szczepankiewicz A., Rybakowski F., Kramer L., Hauser J., Rajewski A.* BDNF Met66 allele is associated with anorexia nervosa in the Polish population. Psychiatr. Genet. 2007; 17: 245–246.

57. *Knable M.B., Barci B.M., Webster M.J., Meador-Woodruff J., Torrey E.F.* Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the Stanley Neuropathology Consortium. Mol. Psychiatr. 2004; 9: 609–620.

58. *Weickert C.S., Hyde T.M., Lipska B.K., Herman M.M., Weinberger D.R., Kleinman J.E.* Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia. Mol. Psychiatry 2003; 8: 592–610.

59. *Suliman S., Hemmings S.M.J., Seedat S.* Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis. Frontiers in Integrative Neurosci. 2013; 7: 55. doi:10.3389/fnint.2013.00055.

60. *Hashimoto K., Koizumi H., Nakazato M., Shimizu E., Iyo M.* Role of brain-derived neurotrophic factor in eating disorders: recent findings and its pathophysiological implications. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2005; 29: 499–504.

61. *Lindholm J.S.O., Castrén E.* Mice with altered BDNF signaling as models for mood disorders and antidepressant effects. Frontiers in Behav. Neurosci. 2014; 8: 143. doi:10.3389/fnbeh.2014.00143.

62. *Rattiner L.M., Davis M., French C.T., Ressler K.J.* Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdaladependent fear conditioning. J. Neurosci. 2004; 24: 4796–4806.

63. *Monteggia L.M., Barrot M., Powell C.M., Berton O., Galanis V., Gemelli T., Meuth S., Nagy A., Greene R.W., Nestler E.J.* Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2004; 101: 10827–10832.

64. *Kline D.D., Ogier M., Kunze D.L., Katz D.M.* Exogenous brain-derived neurotrophic factor rescues synaptic dysfunction in Mecp2-null mice. J. Neurosci. 2010; 30: 5303–5310.

65. *Kaplan D.R., Miller F.D.* Neurotrophin signal transduction in the nervous system. Current Opinion in Neurobiology. 2000; 10: 3: 381–391.

66. *Binder D.K., Scharfman H.E.* Brain-derived neurotrophic factor. Growth Factors. 2004; 22: 3: 123–131.

67. *Patapoutian A., Reichardt L.F.* Trk receptors: mediators of neurotrophin action. Current Opinion in Neurobiology. 2001; 11: 3: 272–280.

68. *Bibel M., Hoppe E., Barde Y.A.* Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75(NTR). EMBO J. 1999; 18: 3: 616–622.

69. *Kraemer B.R., Yoon S.O., Carter B.D.* The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor. Handb. Exp. Pharmacol. 2014; 220: 121–164.

70. *McDonald N.Q., Lapatto R., Murray-Rust J., Gunning J., Wlodawer A., Blundell T.L.* New protein fold revealed by a 2.3-A resolution crystal structure of nerve growth factor. Nature. 1991; 354: 6352: 411–414.

71. *Butte M.J., Hwang P.K., Mobley W.C., Fletterick R.J.* Crystal structure of neurotrophin-3 homodimer shows distinct regions are used to bind its receptors. Biochemistry. 1998; 37: 48: 16846–16852.

72. *Robinson R.C., Radziejewski C., Spraggon G., Greenwald J., Kostura M.R., Burtnick L.D., Stuart D.I., Choe S., Jones E.Y.* The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site. Protein Sci. 1999; 8: 12: 2589–2597.

73. *Ryden M., Murray-Rust J., Glass D., Ilag L.L., Trupp M., Yancopoulos G.D., McDonald N.Q., Ibáñez C.F.* Functional analysis of mutant neurotrophins deficient in low-affinity binding reveals a role for p75LNGFR in NT-4 signalling . EMBO J. 1995; 14: 1979–1990.

74. *O'Leary P.D., Hughes R.A.* Structure-activity relationships of conformationally constrained peptide analogues of loop 2 of brain-derived neurotrophic factor. J. Neurochem. 1998; 70: 1712–1721.

75. *Robinson R.C., Radziejewski C., Stuart D.I., Jones E.Y.* Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer. Biochemistry. 1995; 34: 4139–4146.

76. *Ibáñez C.F., Ilag L.L., Murray-Rust J., Persson H.* An extended surface of binding to Trk tyrosine kinase receptors in NGF and BDNF allows the engineering of a multifunctional pan-neurotrophin. EMBO J. 1993; 12: 2281–2293.

77. *O'Leary P.D., Hughes R.A.* Design of potent peptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor. J. Biol. Chem. 2003; 28: 11: 25738–25744.

78. *Fletcher J.M., Hughes R.A.* Novel monocyclic and bicyclic loop mimetics of brain-derived neurotrophic factor. J. Pept. Sci. 2006; 12: 515–524.

79. *Fletcher J.M., Morton C.J., Zwar R.A., Murray S.S., O'Leary P.D., Hughes R.A.* Design of a conformationally defined and proteolytically stable circular mimetic of brain-derived neurotrophic factor. J. Biol. Chem. 2008; 283: 33375–33383.

80. *Xiao J., Hughes R.A., Lim J.Y., Wong A.W., Ivanusic J.J., Ferner A.H., Kilpatrick T.J., Murray S.S.* A small peptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor promotes peripheral myelination. J. Neurochemistry. 2013; 125: 386–398.

81. *Wong A.W., Giuffrida L., Wood R., Peckham H., Gonsalvez D., Murray S.S., Hughes R.A., Xiao J.* TDP6, a brain-derived neurotrophic factor-based trkB peptide mimetic, promotes oligodendrocyte myelination. Mol. Cell. Neurosci. 2014; 63: 132–140.

82. *Fletcher J.M., Hughes R.A.* Modified low molecular weight cyclic peptides as mimetics of BDNF with improved potency, proteolytic stability and transmembrane passage in vitro. Bioorg. Med.Chem. 2009; 17: 2695–2702.

83. *Massa S.M., Yang T., Xie Y., Shi J., Bilgen M., Joyce J.N., Nehama D., Rajadas J., Longo F.M.* Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents. J. Clin. Invest. 2010; 120: 5: 1774–1785.

84. *Ibáñez C.F., Ebendal T., Persson H.* Chimeric molecules with multiple neurotrophic activities reveal structural elements determining the specificities of NGF and BDNF. EMBO J. 1991; 10: 8: 2105–2110.

85. *Kron M., Lang M., Adams I.T., Sceniak M., Longo F., Katz D.M.* A BDNF loop-domain mimetic acutely reverses spontaneous apneas and respiratory abnormalities during behavioral arousal in a mouse model of Rett syndrome. Disease Models & Mechanisms. 2014; 7: 1047–1055.

86. *Kajiya M., Takeshita K., Kittaka M., Matsuda S., Ouhara K., Takeda K., Takata T., Kitagawa M., Fujita T., Shiba H., Kurihara H.* BDNF mimetic compound LM22A-4 regulates cementoblast differentiation via the /Akt signaling cascade. Int. Immunopharmacol. 2014; 19: 2: 245–252.

87. *Cardenas-Aguayo M.C., Kazim S.F., Grundke-Iqbal I., Iqbal K.* Neurogenic and Neurotrophic Effects of BDNF Peptides in Mouse Hippocampal Primary Neuronal Cell Cultures. PLoS ONE. 2013; 8: 1: 1–18.

88. *Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В., Логвинов И.О., Поварнина П.Ю., Антипова Т.А., Середенин С.Б.* Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора. Биоорганическая химия. 2012; 38: 3: 280–290.

89. *Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Антипова Т.А., Середенин С.Б.* Дипептидный миметик 4-й петли мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 активирует TrkB, Erk, Akt и способствует выживаемости нейронов in vitro. Доклады академии наук. 2013; 451: 5: 577–580.

90. *Логвинов И.О., Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Антипов П.И., Середенин С.Б.* Нейропротективные свойства дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 в экспериментах in vitro. Бюлл. экспер. биол. и мед. 2013; 155: 3: 319–322.

91. *Gudasheva T.A., Povarnina P.Yu., Logvinov I.O., Antipova T.A., Seredenin S.B.* Mimetics of brain-derived neurotrophic factor loops 1 and 4 are active in a model of ischemic stroke in rats. Drug Design, Development and Therapy. 2016;10: 3545–3553.

92. *Середенин С.Б., Воронина Т.А., Гудашева Т.А., Гарибова Т.Л., Молодавкин Г.М., Литвинова С.А., Елизарова О.А., Посева В.И.* Антидепрессивный эффект оригинального низкомолекулярного миметика BDNF, димерного дипептида ГСБ-106. Acta Naturae. 2013; 5: 4 (19): 116–120.

93. *Гудашева Т.А., Поварнина П.Ю., Середенин С.Б.* Дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора предотвращает нарушение нейрогенеза у стрессированных мышей. Бюлл. экспер. биол. и мед. 2016; 162: 10: 448–451.

Поведенческие экспериментальные модели депрессии

Гарибова Т.Л., Крайнева В.А., Воронина Т.А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

Резюме. В обзоре приведены и детально описаны основные наиболее используемые поведенческие экспериментальные модели депрессии. Описаны эндофенотипы и критерии валидности поведенческих методов для оценки антидепрессивной активности у соединений. Моделирование депрессии с использованием лабораторных животных позволяет понять природу депрессии у человека и осуществлять поиск эффективных способов её лечения.

Ключевые слова: модели депрессивноподобного поведения животных, критерии оценки

Animal models of depression

Garibova T.L, Kraineva V.A., Voronina T.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. The review provides and describes in detail the main most commonly used behavioral experimental models of depression. Endophenotypes and criteria of validity of behavioral methods for evaluation of antidepressant activity in compounds are described. Modeling depression using laboratory animals allows us to understand the nature of depression in humans and to search for effective ways of treating.

Keywords: Animal models of depression, endophenotypes and criteria of validity

Автор, ответственный за переписку:

Гарибова Таисия Леоновна — ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; тел.: +7 (903) 961-61-26; e-mail: T_Garibova@ mail.ru

Поведенческие экспериментальные модели депрессии

«Клиническая депрессия» или часто просто «депрессия», является длительным психическим расстройством, характеризующимся «депрессивной триадой»: снижением настроения и утратой способности переживать радость, нарушениями мышления, двигательной заторможенностью. Симптомы включают в себя плохое настроение и отвращение к какой-либо деятельности. Подавленные люди могут чувствовать себя тревожно, безнадежно, быть взволнованными, беспомощными, раздражительными, могут потерять интерес к видам деятельности, которые были когда-то им приятны. У больных депрессией часто наблюдается потеря аппетита или переедание, есть проблемы с концентрацией внимания, принятием решений, на этом фоне нередко совершаются суицидальные попытки [1, 2]. Трудно разработать модели депрессии на животных, которые бы полностью воспроизводили симптомы, наблюдаемые у пациентов с депрессивными расстройствами. У животных нет самосознания, саморефлексии и самоанализа; кроме того, вряд ли им доступны такие признаки расстройства, как подавленное настроение, низкая самооценка или суицидальные наклонности. Тем не менее, депрессия, как и другие психические расстройства, состоит из эндофенотипов [3], которые могут быть воспроизведены независимо друг от друга, и объективно оценены у животных. Адекватная «идеальная» модель депрессии на животных даёт возможность понять, какие молекулярные, генетические и эпигенетические факторы могут привести к развитию симптоматики. При использовании адекватных моделей депрессии могут быть хорошо изучены лежащие в основе молекулярные изменения и причинно-следственная связь между генетическими или экологическими изменениями и депрессиями, что позволит получить более полное представление о патологии депрессии. Кроме того, экспериментальные поведенческие модели депрессии незаменимы для выявления новых методов лечения и поиска эффективных антидепрессантов.

В экспериментальных поведенческих моделях депрессий в опытах на животных были описаны следующие эндофенотипы [3, 4]:

Ангедония: потеря интереса к жизни, неспособность радоваться – является основным симптомом депрессии. Ангедония у грызунов может быть оценена путём предпочтения сахарозы или с использованием метода самостимуляции латерального гипоталамуса.

Поведение отчаяния: может быть оценено в тестах принудительного плавания или подвешивания за хвост по реакции иммобилизации.

Изменение аппетита или увеличение массы тела: депрессия часто бывает связана с изменением аппетита, увеличением массы тела, которое легко измерить у животных.

Нейроанатомические изменения: уменьшение объёма гиппокампа хорошо моделируется у грызунов при воздействии хроническим стрессом или при избытке глюкокортикоидов. При этом у животных наблюдаются сходные признаки – атрофия гиппокампа, потеря нейронов и дендритов.

Нейроэндокринные нарушения: нарушения гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО) явля-

ются одним из наиболее последовательных симптомов депрессии. Функциональность ГГНО у животных может быть оценена с помощью дексаметазонового теста.

Изменения структуры сна: нарушения циркадного ритма и, особенно, структуры сна часто наблюдаются у больных депрессиями. У грызунов эти изменения можно оценить с помощью электроэнцефалографии (ЭЭГ).

Изменение поведения, вызванное беспокойством: тревога является одним из наиболее распространённых симптомов депрессии и хорошо регистрируется у животных.

Критерии валидизации поведенческих моделей депрессии

Для соответствия модели на животных состоянию депрессии у человека должно быть выполнено как можно больше из перечисленных ниже критериев: сильные феноменологическое сходство и аналогичная патофизиология (face validity), сравнимая этиология (construct validity), а также идентичное лечение, прогностическая валидность (predictive validity) [5–11]. Депрессия представляет собой гетерогенное расстройство, многие симптомы которого трудно воспроизвести на лабораторных животных. Вместе с тем, целый ряд используемых в настоящее время моделей депрессии в разной степени соответствуют представленным выше критериям. Для «идеальной» модели депрессии на животных, не обязательно присутствие всех аномалий поведения и состояния, так же, как не у всех пациентов проявляются все симптомы депрессии.

Основные поведенческие тесты для первичного определения антидепрессивной активности соединений

Моделирование поведения на основе отчаяния

Тест вынужденного плавания (Forced-swimming test, FST) [12–15] основан на наблюдении, что у животного при неизбегаемом плавании в цилиндре с водой наблюдается неподвижная поза (иммобилизация). В этом тесте неподвижность животного интерпретируется как пассивный стресс, депрессии, т. е. как поведение отчаяния. Тест вынужденного плавания (Forced swim test) – является одной из первых и наиболее часто используемых животных моделей депрессии, широко применяемой для доклинической оценки антидепрессивной активности соединений. Впервые процедура вынужденного плавания была описана Роджером Порсолтом сначала для крыс [13], затем – для мышей [14]. Из-за чрезвычайной популярности метода его часто называют просто тест «Порсолта». После введения антидепрессанта у животных сокращается время иммобилизации до уровня показателей контрольных животных. Преимуществами теста является простота в исполнении, быстрота, надёжность и информативность, а при тестировании потенциальных антидепрессантов – сильная прогностическая валидность. Установка для создания депрессивноподобного состояния (поведенческого отчаяния) по методу Porsolt [13] у крыс представляет собой сосуд цилиндрической формы диаметром 18 см и высотой 40 см. Цилиндр на высоту 15 см наполняют водой, температура которой поддерживается на уровне 25 °С. Предварительно, за сутки до тестирования каждое животное опускают в сосуд с водой на 5–6 мин для адаптации. В день эксперимента животное помещают в цилиндр с водой таким образом, чтобы оно не могло ни выбраться из сосуда, ни найти в нем опору, т. е. касаться лапами дна. Попадая в воду, животные начинают проявлять бурную двигательную активность, направленную на поиск выхода из аверсивной стрессорной ситуации, но затем оставляют эти попытки и зависают в воде в характерной позе, оставаясь полностью неподвижными или совершая незначительные движения, необходимые для поддержания головы над поверхностью воды. Это поведение расценивается как проявление отчаяния, подавленности, депрессивноподобного состояния. Основным показателем выраженности депрессивноподобного состояния по данному тесту является длительность неподвижности, т. е. сумма эпизодов иммобилизации у каждого животного в течение 6 мин наблюдения. Критерием антидепрессивной активности считается статистически достоверное уменьшение длительности иммобилизации. Классические антидепрессанты, например, ингибиторы моноаминоксидазы, трициклические и атипичные антидепрессанты все в зависимости от дозы уменьшают продолжительность неподвижности у крыс и мышей [13–16].

Тест подвешивания за хвост [17, 18] имеет общую теоретическую базу и поведенческий аспект с тестом вынужденного плавания. В тесте подвешивания мышей за хвост с помощью клейкой ленты, животное прикрепляется к горизонтальному стержню так, чтобы оно не касалось мордочкой поверхности лабораторного стола. Сначала подвешенные животные активно двигаются, а затем всё чаще становятся неподвижными, т. е. у грызунов отмечается иммобилизация. Антидепрессанты уменьшают продолжительность эпизодов неподвижности. Основными недостатком теста подвешивания за хвост является ограничение в использовании мышей, которые имеют тенденцию вскарабкиваться по собственному хвосту.

Методы, основанные на системе вознаграждения

Тест предпочтения сахарозы [19]. У грызунов отмечается врождённый интерес к сладкому корму или подслащённому раствору. Уменьшение потребления раствора сахарозы в тесте предпочтения раствора сахарозы представляет ангедонию. Снижение потребления сахарозы может быть устранено при применении антидепрессантов.

Методика самостимуляции [19] может быть использована у грызунов для выявления эффекта со-

единения, в том числе наркотиков, на систему вознаграждения в ЦНС. В этой парадигме, животное с вживлёнными в латеральный гипоталамус электродами обучается получать удовольствие, проводя ток через имплантированные в мозг электроды, и стимулируя зону удовольствия. Этот метод разделяет общую теоретическую основу с тестом предпочтения сахарозы. Поведение животных при моделировании такого состояния ассоциировано с потерей интереса, усталостью, симптомами, которые наблюдаются во время депрессивных эпизодов у людей. Модель является чувствительной к антидепрессантам. Как тест предпочтения сахарозы, так и методика самостимуляции позволяют оценить у грызунов аффективное состояние и уровень мотивации

Модели депрессии, основанные на стрессе

Некоторые виды клинической депрессии у людей бывают вызваны стрессовыми жизненными ситуациями или непредсказуемыми тяжёлыми, иногда трагическими событиями. В связи с этим, целый ряд моделей депрессии на животных основан на воздействии различных видов острых или хронических стрессовых факторов.

Модель выученной беспомощности: [20–25] является хорошо валидированной и часто употребляемой моделью депрессии на животных. Модель основана на наблюдении, что у животных развивается дефицит познавательной деятельности и нарушение поведения в ответ на вознаграждение, если они предварительно неоднократно получали неизбегаемый и неконтролируемый стресс (наказание). Выученная беспомощность формируется в течение одного или нескольких дней при использовании повторного неизбегаемого стресса при болевом раздражении хвоста или ударами током через электродный пол в челночной камере. «Беспомощное» поведение у животного оценивается путём анализа поведения по таким показателям как латентное время нажатия на педаль или перебежки в безопасный отсек.

Хронический непредсказуемый лёгкий стресс [26–29] является одной из моделей на животных наиболее приближённой к депрессии у человека. Вырабатывается депрессивноподобное состояние, которое развивается постепенно с течением времени в ответ на лёгкий стресс, что обеспечивает более естественное формирование этого состояния. Метод хронического лёгкого стресса предполагает воздействие на животных в течение не менее 2 недель серией лёгких и непредсказуемых стрессорных факторов (периоды лишения пищи или воды, небольшое повторяющееся снижение температуры окружающей среды, замена животных в клетке и другие подобные весьма безобидные для животного манипуляции). Описанная процедура приводит к продолжительным изменениям в поведении, изменениям показателей нейрохимической, нейроиммунной и нейроэндокринной систем. Эти изменения устраняются при длительной терапии антидепрессантами.

Преимуществами модели являются её хорошая прогностическая валидность (поведенческие изменения ослабляются при длительном применении большинства антидепрессантов с различным спектром действия), валидность (воспроизводятся почти все наглядные симптомы депрессии), и сравнимая этиология (construct validity) (метод хронического лёгкого стресса вызывает тотальное снижение ответа на награды). Тем не менее, есть практические трудности при проведении экспериментов: трудоёмкость и относительно плохая воспроизводимость.

Стресс социального поражения [30–33] является хроническим и повторяющимся фактором в жизни практически всех видов высших животных. Люди, испытывающие социальное поражение демонстрируют усиление симптомов депрессии, одиночества, тревоги, социального отчуждения и потери чувства собственного достоинства. Поскольку большинство стрессовых раздражителей у человека, приводящие к психопатологическим изменениям, носят социальный характер, модель стресса социального поражения привлекает всё большее внимание, поскольку она может быть полезной при изучении некоторых эндофенотипов депрессии. В экспериментальной модели социального поражения на грызунах моделируется ситуация, в результате которой одно животное приобретает доминирующий статус, а другое, в конечном итоге, статус побеждённого [34]. Последующие изменения поведения у грызуна, вызванные стрессом социального поражения, характеризующиеся уменьшением социального взаимодействия или отсутствием интереса, похожи на некоторые симптомы депрессии у человека, а терапия антидепрессантами корректирует эти изменения. Как и хронический лёгкий стресс, стресс социального поражения имеет хорошую прогностическую валидность (идентичное лечение), феноменологическое сходство и аналогичную патофизиологию (воспроизводятся многие симптомы депрессии). Недостатками модели стресса социального поражения является продолжительность, трудоёмкость и невозможность использования самок.

Модели стресса раннего периода жизни. Стресс раннего периода жизни, травмирующий детскую психику, приводит позже к повышенной чувствительности к стрессу, что может быть причиной развития депрессивного состояния во взрослой жизни. Модели стресса раннего периода жизни включают пренатальный стресс, ранний послеродовый хендлинг и лишение матери. У взрослых животных после стресса в раннем периоде жизни наблюдаются повышенная тревожность, страх, снижение двигательной активности, уменьшение социальной мотивации, снижение гедонистического ответа, нарушение сна, эндокринные и нейрохимические изменения.

Лишение матери или модель материнской депривации является наиболее широко используемой моделью стресса раннего периода жизни. Детеныши отделяются от матки на 1–24 ч в сутки в течение первых двух недель после рождения. Материнская депривация приводит к увеличению тревожности, развитию депрессивного состояния и усилению реакции ГГНО в зрелом возрасте [35, 36].

Методы, базирующиеся на тревоге

Вызванная новизной гипофагия [37]. Гипофагия является одним из симптомов тревожности у грызунов и определяется как сокращение потребления пищи в ответ на новизну. Гипофагия может быть вызвана различными новыми факторами окружающей среды, в том числе новым кормом, новой средой, где осуществляется тестирование, новыми кормушками. Вызванная новизной гипофагия является относительно недавно разработанным тестом, который измеряет задержку в потреблении пищи в новой незнакомой обстановке. Тест скорее отражает анксиолитическое действие антидепрессантов и эффект соединения выявляется только после его хронического применения.

Тест открытое поле [38]. Фиксируется стратегия поведения грызунов по избеганию ярко освещённых участков на открытой площадке (открытом поле). Это избегание интерпретируется как симптом тревоги. Открытое поле представляет собой хорошо освещённую установку и во время тестирования грызуны помещаются в ней, таким образом, что вынуждены взаимодействовать с новой и хорошо освещённой окружающей средой. Регистрируется ориентировочно-исследовательское поведение и двигательная активность.

Приподнятый крестообразный лабиринт [39]. Методика приподнятого крестообразного лабиринта состоит из крестообразно расходящихся от центральной площадки под прямым углом четырёх рукавов: два противоположных, открытых, без стенок и два закрытых, тёмных. Животных помещают на центральную площадку установки и в течение 5 мин регистрируют время пребывания животного в открытых, закрытых рукавах, на центральной площадке, количество заходов в открытые и закрытые рукава, латентный период первого захода в рукав. Увеличение времени в открытых рукавах является показателем снижения уровня тревожности у грызунов.

Тёмная/светлая камера [38] основан на врождённом избегании грызунами ярко освещённых мест (норковый рефлекс) и на спонтанном ориентировочно-исследовательском поведении животных. Ситуация естественного конфликта возникает, когда животное оказывается в незнакомой среде или среди новых объектов. Конфликт создается между естественным ориентировочно-исследовательским поведением и реакцией избегания неизвестного. Поисковая активность животного отражает результат этих тенденций в новых условиях. Установка тёмная/светлая камера состоит из тёмного и освещённого отсеков с отверстием для перехода из одного отсека в другой. Увеличение пребывания животного в освещённой части двухкамерной установки свидетельствует об анксиолитической активности тестируемого соединения.

Тесты открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт и тёмная/светлая камера используются для оценки тревожности, которая является эндофенотипом депрессии и важна для скрининга антидепрессантов.

Некоторые другие модели депрессии

Удаление обонятельных луковиц [40, 41]. Удаление обонятельных луковиц у грызунов приводит к нарушению ГГНО с поведенческими, нейрохимическими, нейроэндокринными и нейроиммунными изменениями, многие из которых напоминают изменения, наблюдаемые у пациентов с депрессией. До сих пор не ясно, как удаление обонятельных луковиц у животных соотносится к депрессий у людей. Это может быть просто результатом высокой интенсивности хронического стрессора, вызванной хронической сенсорной депривацией. Эта модель показывает высокую прогностическую валидность, так как имитирует медленное начало действия антидепрессанта по аналогии с клиническими наблюдениями. Стоит отметить, что, в отличие от моделей, связанных со стрессом, крыса в условиях этой модели ажитирована по гипосеротонинергическому фенотипу депрессии.

Отмена психостимуляторов (амфетамин, кокаин) [42, 43]. Отмена хронического приёма психостимуляторов вызывает симптомы, имеющие сильные поведенческие и физиологические параллели с депрессией. В связи с этим, исследование поведенческих проявлений после отмены психостимулятора у животных может дать представление о нейробиологических механизмах и помочь в создании моделей депрессии на животных, чувствительных к антидепрессантам. После отмены наркотиков, таких как амфетамин или кокаин, грызуны демонстрируют поведенческие изменения, которые очень похожи на некоторые аспекты депрессии у людей, такие как ангедония и поведение, противоположное тому, которое наблюдается после лечения антидепрессантами.

Описанные выше методы, судя по цитируемости в научной литературе [10], являются наиболее широко используемыми. Вместе с тем, прогресс в области нейрофизиологических наук, молекулярной биологии, генетики позволил расширить представления о механизмах, лежащих в основе формирования депрессивных состояний и способствует разработке новых методов, в частности, генетических моделей депрессии с использованием генетически модифицированных животных. В этом аспекте, довольно широко используются крысы линий Wistar Kyoto [44] и FSL (Flinders sensitive line rat) [45], мутантные [46, 47],

трансгенные и нокаутные мыши [9, 48, 49]. Вместе с тем, использование трансгенных и нокаутных животных предполагает, как правило, их тестирование с помощью описанных выше методов, которые остаются на сегодняшний день базисными поведенческими моделями депрессии на животных [10, 50].

Особенную сложность представляет моделирование на животных биполярных депрессивных расстройств [10, 51]. Если маниакальные состояния возможно моделировать с помощью нокаутных животных, или используя стимуляторы ЦНС [10, 42], то добиться цикличности в поведении животных, моделировать периодическое падение настроения не удаётся. Созданные трансгенные мыши с мутантной митохондриальной ДНК-полимеразой (Polg), которые по свидетельству авторов способны проявлять фенотипы, подобные расстройствам настроения [52], лишь частично воспроизводят эту патологию.

В заключение следует отметить, что перечисленные выше поведенческие модели депрессивноподобного состояния у животных, разработанные для оценки соединений с антидепрессивной активностью, не являются исчерпывающими, имеют многочисленные модификации и часто используются в комплексе с другими исследованиями. Кроме того, каждая из перечисленных моделей имеет свои особенности и ограничения в применении. В связи с этим для более объективной оценки действия соединения, особенно нового, определения особенностей его свойств как антидепрессанта требуется тестирование с использованием нескольких поведенческих моделей совместно с определением биохимических и молекулярных механизмов [50].

Литература

1. *Wang S-M., Han C., Lee S-J., et al.* Second Generation Antipsychotics in the Treatment of Major Depressive Disorder: An Update. Chonnam Med J. 2016; 52 (3): 159–172.
2. *Kessler R.C. et al.* Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. Arch Gen Psychiatry. 2005; 62 (6): 593–602.
3. *Hasler G. et al.* Discovering endophenotypes for major depression. Neuropsychopharmacology. 2004; 29: 1765–1781.
4. *Vogel H.G.* Drug discovery and evaluation: pharmacological assays. Springer. Berlin. 3rd Edition; 2008; 1800.
5. *Willner P., Mitchell P.J.* The validity of animal models of predisposition to depression. Behav. Pharmacol. 2002; 13: 169–188.
6. *Anisman H., Matheson K.* Stress, depression, and anhedonia:caveats concerning animal models. Neurosci. Biobehav. Rev. 2005; 29: 525–546.
7. *Vollmayr B., Mahlstedt M.M., Henn F.A.* Neurogenesis and depression: what animal models tell us about the link. Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci. 2007; 257: 300–303.
8. *Яузина Н.А., Комлева Ю.К., Салмина А.Б., Петрова М.М., Морозова Г.А., Малиновская Н.А., Герцог Г.Е.* Современные экспериментальные модели депрессии. Биомедицина. 2013; 1: 61–71.
9. *Григорьян Г.А., Гуляева Н.В.* Моделирование депрессии на животных: поведение как основа методологии, критериев оценки и классификации. Журнал ВНД. 2015; 65 (6): 643–660.
10. *Kato T., Kasahara T., Kubota-Sakashita M., Kato T.M., Nakajima K.* Animal models of recurrent or bipolar depression. Neuroscience. 2016; 321: 189–196.
11. *Nestler E.J., Hyman S.E.* Animal models of neuropsychiatric disorders. Nat Neurosci. 2010; 13(10):1161–1169.
12. *Petit-Demouliere B., Chenu F., Bourin M.* Forced swimming test: a review of antidepressant activity. Psychopharmacology. 2005; 177: 245–255.
13. *Porsolt R.D., Pichon M.Le, Jalfre M.* Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature. 1977; 266: 730–732.
14. *Porsolt R.D., Bertin A., Jalfre M.* Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. Arch. Int. Pharmocodyn. Ther. 1977; 229:327–336.
15. *Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M.* Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. Eur. J. Pharmacol. 1978; 47: 379–391.
16. *Borsini F., Meli A.* Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? Psychopharmacology (Berl.). 1988; 94: 147–160.
17. *Cryan J.F., Mombereau C., Vassout A.* The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. Neurosci. Biobehav. Rev. 2005; 29: 571–625.
18. *Steru L., Chermat R., Thierry B., Simon P.* The tail suspension test: a new method for screening antidepressant drugs. Psychopharmacology. 1985; 85: 367–370.
19. *Kurre Nielsen C., Arnt J., Sánchez C.* Intracranial self-stimulation and sucrose intake differ as hedonic measures following chronic mild stress: interstrain and interindividual differences. Behavioural. Brain Research. 2000; 107 (1-2): 21–33.
20. *Maier S.F., Seligman M.E.P.* Learned helplessness – theory and evidence. J Exp Psychol-General. 1976; 105: 3–46.
21. *Durgam R.C.* Rodent models of depression: learned helplessness using a triadic design in rats. Curr. Protoc. Neurosci. 2001; Chapter 8: Unit 8 10B.
22. *Chourbaji S., Zacher C., Sanchis-Segura C., Dormann C., Vollmayr B., Gass P.* Learned helplessness: validity and reliability of depressive- like states in mice. Brain Res. Brain Res. Protoc. 2005; 16: 70–78.
23. *Vollmayr B., Henn F.A.* Learned helplessness in the rat: improvements in validity and reliability. Brain Res. Brain Res Protoc. 2001; 8 (1): 1–7.
24. *Willner P.* Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency andbehavioral-neurobiological concordance in the effects of CMS. Neuropsychobiology. 2005; 52: 90–110.
25. *Willner P., Muscat R., Papp M.* Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. Neurosci. Biobehav. Rev. 1992; 16: 525–534.
26. *Monleon S., D'Aquila P., Parra A., Simon V.M., Brain P.F., Willner P.* Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. Psychopharmacology (Berl). 1995; 117: 453–457.
27. *Stemmelin J., Cohen C., Yalcin I., Keane P., Griebel G.* Implication of [beta]3-adrenoceptors in the antidepressant-like effects of amibegron using Adrb3 knockout mice in the chronic mild stress. Behav. Brain Res. 2010; 206: 310–312.
28. *Blanchard R.J., McKittrick C.R., Blanchard D.C.* Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. Physiol. Behav. 2001; 73 (3): 261–271.
29. *Krishnan V., Han M.H., Graham D.L., Berton O., Renthal W., Russo S.J. et al.* Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. Cell. 2007; 131: 391–404.
30. *Cryan J.F., Slattery D.A.* Animal models of mood disorders: Recent developments. Curr. Opin Psychiatry. 2007; 20: 1–7.
31. *Kudryavtseva N.N., Bakshtanovskaya I.V., Koryakina L.A.* Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. Pharmacol. Biochem. Behav. 1991; 38: 315–320.
32. *McEwen B.S.* Early life influences on life-long patterns of behavior and health. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 2003; 9: 149–154.
33. *Meaney M.J.* Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. Annu. Rev. Neurosci. 2001; 24: 1161–1192.
34. *Duman C.H.* Models of Depression II Vitamins and Hormones. 2010; 82 (10): 1–21.
35. *Plotsky P.M., Meaney M.J.* Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. Brain Res Mol Brain Res. 1993; 18: 195–200.
36. *O'Neil M.F., Moore N.A.* Animal models of depression: are there any? Hum. Psychopharmacol. 2003; 18: 239–254.
37. *Dulawa S.C., Hen R.* Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. Neurosci. Biobehav. Rev. 2005; 29: 771–783.

38. *Drugan R.C., Basile A.S., Ha J.H., Healy D., Ferland R.J.* Analysis of the importance of controllable versus uncontrollable stress on subsequent behavioral and physiological functioning. Brain Res. Brain Res. Protoc. 1997; 2: 69–74.

39. *Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M.* Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Meth. 1985; 14: 149–167.

40. *Cairncross K.D., Wren A., Cox B., Schnieden H.* Effects of olfactory bulbectomy and domicile on stress-induced corticosterone release in the rat. Physiol. Behav. 1977; 19: 485–487.

41. *Schramm N.L., McDonald M.P., Limbird L.E.* The alpha(2a)-adrenergic receptor plays a protective role in mouse behavioral models of depression and anxiety. J. Neurosci. 2001; 21: 4875–4882.

42. *Honma K., Honma S., Hiroshige T.* Disorganization of the rat activity rhythm by chronic treatment with methamphetamine. Physiol Behav. 1986; 38: 687–695.

43. *Ridder S., Chourbaji S., Hellweg R., Urani A., Zacher C., Schmid W. et al.* Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. J. Neurosci. 2005; 25: 6243–6250.

44. *Pajer K., Andrus B.M., Gardner W., Lourie A., Strange B., Carnpo J., Bridge J., Blizinsky K., Dennis K., Vedell P., Churchil G.A., Redei E.M.* Discovery of blood transcriptomic markers for depression in animal models and pilot validation in subjects with early-onset major depression II Transl. Psychiatry. 2012; 2: 2–10.

45. *Overstreet D.H.* Selective breeding for increased cholinergic function: development of a new animal model of depression. Biol Psychiatry. 1986; 21: 49–58.

46. *Roybal K., Theobold D., Graham A. et al.* Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104(15): 6406–6411.

47. *Yamasaki N., Maekawa M., Kobayashi K. et al.* Alpha-CaMKII deficiency causes immature dentate gyrus, a novel candidate endophenotype of psychiatric disorders.Mol Brain. 2008; 1: 18.

48. *Canavello P.R., Egan R.J., Bergner C.L., Hart P.C., Cachat J.M., Kalueff A.V.* Genetic animal models of depression II. Neuromethods. 2009; 44 (24): 191–200.

49. *Bucan M., Abel T.* The mouse: genetics meets behavior. Nat.Rev. Genet. 2002; 3: 114–123.

50. *Krishnan V., Nestler E.J.* Animal models of depression: molecular perspectives. Curr. Top. Behav. Neurosci. 2011; 7: 121–147.

51. *Kato T., Kubota M., Kasahara T.* Animal models of bipolar disorder. Neurosci Biobehav Rev. 2007; 31: 832–842.

52. *Kasahara T., Kubota M., Miyauchi T., Noda Y., Mouri A., Nabeshima T., Kato T.* Mice with neuron-specific accumulation of mitochondrial DNA mutations show mood disorder-like phenotypes. Mol. Psychiatry. 2006; 11: 577–593.

Фармакокинетика дипептидного анксиолитика ГБ-115 после перорального введения у различных видов животных и человека

Раскин С.Ю.[1], Колыванов Г.Б.[1], Литвин А.А.[1], Бочков П.О.[1], Шевченко Р.В.[1], Смирнов В.В.[2,3], Грибакина О.Г.[1], Новицкий А.А.[1], Жердев В.П.[1], Колик Л.Г.[1], Гудашева Т.А.[1], Ивашкина Н.Ю.[4]

[1] – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва
[2] – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, г. Москва
[3] – ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, г. Москва
[4] – АО «Малуна-Фарм», г. Москва

Резюме. Представлены результаты изучения фармакокинетики нового дипептидного анксиолитика ГБ-115 на крысах, кроликах и добровольцах. Выявлены существенные межвидовые различия в фармакокинетике ГБ-115 после его перорального введения/приёма. Так, дозонезависимый параметр – константа скорости элиминации уменьшалась в ряду: крыса > человек > кролик. Период полувыведения ГБ-115, напротив, возрастал в ряду: крыса < человек< кролик.

Ключевые слова: ГБ-115, фармакокинетика, межвидовые различия

Pharmacokinetics of dipeptide anxiolytic GB-115 after oral administration in different animals species and humans

Raskin S.Yu.[1], Kolyvanov G.B.[1], Litvin A.A.[1], Bochkov P.O.[1], Shevchenko R.V.[1], Smirnov V.V.[2,3], Grybakina O.G.[1], Novitskyi A.A.[1], Zherdev V.P.[1], Kolik L.G.[1], Gudasheva T.A.[1], Ivashkina N. Yu.[4]

[1] – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow
[2] – Sechenov University, Moscow
[3] – RC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow
[4] – Joint Stock Company «Maluna-Pharm», Moscow

Resume. Results of pharmacokinetic study of a new dipeptide anxiolytic GB-115 in rats, rabbits and volunteers were presented. After oral drug administration significant differences were found. For example, a dose-independent parameter – the elimination rate constant was decreased: rat < human < rabbit. By contrast the half-life of GB-115 was increased: rat<human<rabbit.

Keywords: GB-115, pharmacokinetics, interspecies differences

Автор, ответственный за переписку:
Литвин Александр Алексеевич — д.б.н. ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; e-mail: litbiopharm@yandex.ru

Введение

Разработка препаратов на основе эндогенных соединений – регуляторных пептидов, является одним из направлений в области создания эффективных и безопасных средств для фармакотерапии психоэмоциональных расстройств. Так, синтезированный аналог тафтсина селанк не уступает по выраженности эффекта медазепаму при лечении пациентов с генерализованными тревожными расстройствами [4], однако, особенности гептапептидной структуры не позволяют использовать его для введения внутрь. С другой стороны, для коротких пептидов установлены переносчик-опосредованные транспортные системы, которые определяют их способность к всасыванию в кишечнике, открывая перспективы создания пептидных препаратов для перорального применения [10].

Основываясь на данных о вовлечённости эндогенной холецистокининовой системы в формировании панических состояний и тревожных расстройств, в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» сконструирован дипептидный аналог тетрапептида холецистокинина – амид N-(6-фенилгексаноил) глицил-L-триптофана (соединение ГБ-115), обладающий антагонистической активностью по отношению к центральным холецистокининовым рецепторам [1] и проявляющий в опытах *in vivo* выраженный анксиолитический эффект [5], не вызывая при этом толерантности и формирования синдрома «отмены» [6]. На этапе доклинического изучения нового анксиолитика пептидной природы изучен с фармакологической/фармакокинетической точки зрения ряд фармацевтических композиций с целью выявления наиболее оптимальной композиции для получения твёрдой лекарственной формы ГБ-115 [2].

Необходимым этапом разработки оригинального лекарственного средства является изучение его экспериментальной фармакокинетики и метаболизма [7]. Выявление общих закономерностей и различий в фармакокинетике фармакологически активных ве-

ществ у экспериментальных животных разных видов позволяет наиболее точно экстраполировать значения фармакокинетических параметров на человека. Анализ доклинических исследований очень важен для оценки вероятности развития и характера побочных эффектов, расчёта начальной дозы для изучения свойств препарата у человека, обеспечивает полезной информацией при переносе данных с животных на человека для выбора пути введения, а также для разработки оптимальной лекарственной формы, обеспечивающей фармакологическую активность и биодоступность.

В то же время при разработке нового препарата невозможно обойтись без клинических исследований, поскольку экстраполяция результатов исследований у животных на человека возможна только в общем виде [8].

Цель исследования – клинико-экспериментальное изучение фармакокинетики нового оригинального дипептидного анксиолитика ГБ-115, выявление общих закономерностей и различий в фармакокинетике у экспериментальных животных и человека.

Материалы и методы

В качестве стандартного вещества использовали фармацевтическую субстанцию ГБ-115 (№ серии ЕК-544-В производства ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», дата выпуска 12.01.2015 г., годен до 02.2018 г.) содержание основного вещества в котором было не ниже 98%. Общая характеристика исследуемого вещества приведена в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика объекта исследования

Химическая формула	Физ.-хим. свойства
C_6H_5-$(CH_2)_5$CO-Gly-Trp-NH_2	М.м. = 434,52 а.е.м. т.пл. 178–179°С. pH 1% водного раствора ≈7. хорошо растворим в спирте (96%), практически нерастворим в воде

Синтез осуществлён в опытно-технологическом отделе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Крысы

Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах-самцах (с массой тела 180–220 г), полученных из питомника «Столбовая» (Московская область). Животных содержали по 6 особей в клетке (580×375×200 мм) в стандартных условиях вивария ФБГНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при естественном освещении, постоянной температуре (21–23 °С) и свободном доступе к брикетированному корму и воде. Все эксперименты были проведены в осенне-зимний период.

До проведения исследования крысы находились в течение 12 ч на водной диете. Субстанцию ГБ-115 вводили в виде водной суспензии с добавлением 1% твина 80 перорально в дозе 100 мг/кг. Животных декапитировали до введения препарата и через 10, 15, 20, 30, 45 и 60 мин после введения суспензии. Плазму крови получали центрифугированием образцов крови животных при 2 500 об/мин в течение 10 мин и 4°С.

Исследование выполнено согласно требованиям «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [7].

Кролики

На 6 кроликах-самцах породы шиншилла (питомник «Манихино», Московская область) массой 2,75–3,10 кг проведено открытое, фармакокинетическое исследование. Животные содержались в стандартных условиях вивария при 12-часовом цикле освещения. За 12 ч до эксперимента животных лишали корма. Кроликам с помощью зонда внутрь вводили субстанцию препарата. Объём суспензии лекарственного средства – 3,0 мл (общая доза ГБ-115 составила 100 мг).

Образцы крови объёмом 1,5 мл отбирали из краевой ушной вены с помощью игл и переносили в конические полиэтиленовые пробирки, предварительно обработанные раствором K_2ЭДТА. Взятие образцов крови для последующего определения содержания препарата в плазме крови осуществлялось в дискретные интервалы времени: до введения препарата (0,0) и через 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 и 4,0 ч после введения суспензии. Затем полученные пробы крови центрифугировали в течение 10 мин при 2 500 об/мин и 4 °С. Отбор плазмы крови проводили в стерильные пластиковые криопробирки. Плазма крови хранилась при температуре –50 °С.

Добровольцы

Клиническое исследование ГБ-115 проведено в соответствии с протоколом № КИ 1-2015 «Открытое клиническое исследование I фазы по изучению фармакокинетики, безопасности и переносимости препарата ГБ-115, таблетки 1 мг у здоровых добровольцев при однократном и многократном приёме внутрь» (разрешение МЗ РФ № 600 от 21.10.2015 г.) в условиях стационара Государственного автономного учреждения здравоохранения Ярославской области «Клиническая больница № 2».

После скринингового обследования накануне дня исследования добровольцы находились в стационаре и утром следующего дня под контролем врача-исследователя 3 из 15 добровольцев принимали высшую дозу препарата – 15 мг (таблетки ГБ-115 0,001 г; серия препарата – 10314; производитель – ОАО «Дальхимфарм», Россия).

Отбор образцов крови

Каждому добровольцу на 8 ч в локтевую вену устанавливали кубитальный катетер.

До приёма препарата, после установки катетера отбирали контрольную пробу крови (0 проба). Образцы крови (10,0 мл) отбирали и переносили в конические полиэтиленовые пробирки (предварительно обработанные K_2ЭДТА). Отбор образцов крови для последующего определения содержания препарата в плазме крови осуществлялось в дискретные интервалы времени: через 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 6,0 и 8,0 ч [3].

Пробоподготовка и количественное определение

Исследуемое вещество извлекали из плазмы крови методом осаждения белков. К 250 мкл плазмы крови, содержащей ГБ-115, прибавляли 750 мкл 0,5% раствора муравьиной кислоты в метаноле, тщательно перемешивали. Полученные суспензии центрифугировали при 9 000 g в течение 15 мин при температуре 4°С. Надосадочную жидкость переносили в хроматографические виалы.

Использовали жидкостной хроматограф Surveyor (Thermo scientific, США), оснащённый градиентным насосом, дегазатором, автосамплером, тандемным масс-селективным детектором QQQ Agilent 6460 (Agilent Technologies, США).

Хроматографическое разделение проведено на аналитической колонке Eclipse XDB-C18 (150 × 4,6 мм; 5 мкм), Agilent, США в режиме изократического элюирования. Подвижная фаза: раствор «А» (50 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 5 мл муравьиной кислоты доводили водой деионизованной до общего объёма 1,0 л) и раствор «Б» (50 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 5 мл муравьиной кислоты доводили ацетонитрилом до общего объёма 1,0 л) смешивали в соотношении А:Б = 40:60 (об/об).

Скорость потока подвижной фазы – 0,6 мл/мин; объём вводимой пробы – 5 мкл; тип ионизации: электроспрей при атмосферном давлении (+); детектирование: режим множественных молекулярных реакций (MRM); анализируемые переходы: m/z 435,5→159,0; энергия соударения – 17 эВ; температура капилляра 275 °С; напряжение на капилляре –3000 В.

Для расчёта концентраций ГБ-115 использовался метод абсолютной калибровки по площади пика ГБ-115. Площади пиков оценивались с помощью программы XCalibur (ver. 2.5.6.), Thermo scientific, США, в режиме автоматического интегрирования. Отмечена линейная зависимость между площадью хроматографического пика и концентрацией ГБ-115 в плазме крови в диапазоне 1–50 нг/мл. Предел количественного определения методики составил 1 нг/мл.

Методику валидировали по следующим параметрам: селективность, диапазон применения (верхний и нижний пределы количественного определения), линейность, правильность и прецизионность, стабильность.

Для расчётов фармакокинетических параметров был использован модельно-независимый метод [3].

В таблицах представлены средние арифметические значения величин ($\bar{x}$), стандартные отклонения (SD), коэффициент вариации (C.V.%).

Все процедуры в исследовании выполнены согласно стандартным операционным процедурам (СОП) лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» и соответствующим нормативным актам.

Результаты и их обсуждение

Фармакокинетические исследования на крысах

Хромато-масс-спектрометрический анализ всех образцов плазмы крови показал, что в анализируемых образцах присутствует характеристический молекулярный ион, соответствующий неизмененной молекуле ГБ-115.

На рис.1 представлена усредненная фармакокинетическая кривая ГБ-115 в плазме крови крыс после однократного перорального введения ГБ-115 в виде суспензии (доза 100 мг/кг). Поскольку на каждую временную точку использовали по 6 животных, результирующая фармакокинетическая кривая была построена по усреднённым концентрациям, поэтому при расчётах фармакокинетических параметров отсутствует статистическая обработка результатов. Как видно из рис. 1, ГБ-115 быстро всасывался из ЖКТ в системный кровоток и определялся в плазме крови уже через 5 мин после введения. Максимальная кон-

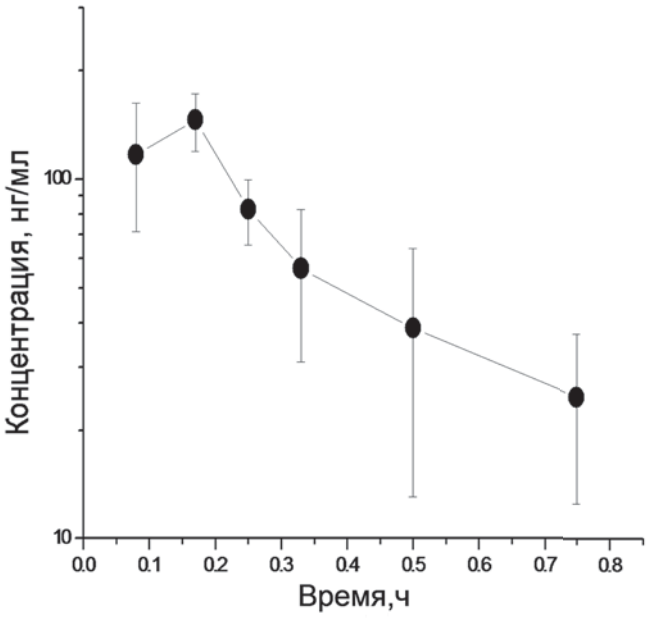


Рис. 1. Усреднённый фармакокинетический профиль ГБ-115 в плазме крови крыс после перорального однократного введения в дозе 100 мг/кг (n = 6; $\bar{x} \pm$ SD)

центрация ГБ-115 в плазме крови крыс (146,16 нг/мл) достигалась через 0,17 ч (10 мин) после введения препарата. Соединение ГБ-115 достаточно быстро выводится из организма животных. Об этом свидетельствуют значения следующих фармакокинетических параметров: период полувыведения исследуемого вещества составил 0,24 ч, а среднее время удерживания (MRT) ГБ-115 в организме животных – 0,28 ч. При этом величина плазменного клиренса (Cl/F) исследуемого вещества составила 2,11 л/ч/кг (табл. 2).

Таблица 2

Фармакокинетические параметры ГБ-115 у крыс после перорального введения субстанции в виде суспензии в дозе 100 мг/кг

Параметр	Значение
$AUC_{0\to T}$, нг/мл×ч	47,464
$AUC_{0\to\infty}$, нг/мл×ч	56,203
T_{max}, ч	0,17
C_{max}, нг/мл	146,16
C_{max}/AUC, $ч^{-1}$	3,0794
Cl/F, л/ч/кг	2,11
k_{el}, $ч^{-1}$	2,8424
$t_{1/2el}$, ч	0,24
MRT, ч	0,28
V_d/F, л/кг	0,74

Параметром, характеризующим степень проникновения лекарственного вещества в ткани, является кажущийся объём распределения (V_d/F). Его величина составила 0,74 л/кг. Кажущийся объём распределения обычно не эквивалентен анатомическому объёму, а отражает распределение препарата и степень его связывания в организме. Так, если препарат связывается преимущественно белками крови, V_d/F будет меньше, чем реальный. С другой стороны, преимущественное связывание препарата во внесосудистом пространстве приводит к превышению значения V_d/F над реальным. В нашем случае расчёт величин V_d/F дал значительно большие результаты, указывающие, что ГБ-115 распределяется во всех жидких средах организма животных [9].

На рис. 2 представлен усредненный фармакокинетический профиль ГБ-115 в плазме крови кроликов после однократного перорального введения субстанции в дозе 100 мг. Тестируемое вещество определялось в биожидкости на протяжении 4 ч. Снижение концентраций ГБ-115 после достижения максимальных концентраций носило монофазный характер.

В табл. 3 представлены основные фармакокинетические параметры ГБ-115 у кроликов после однократного введения внутрь субстанции. Время наступления

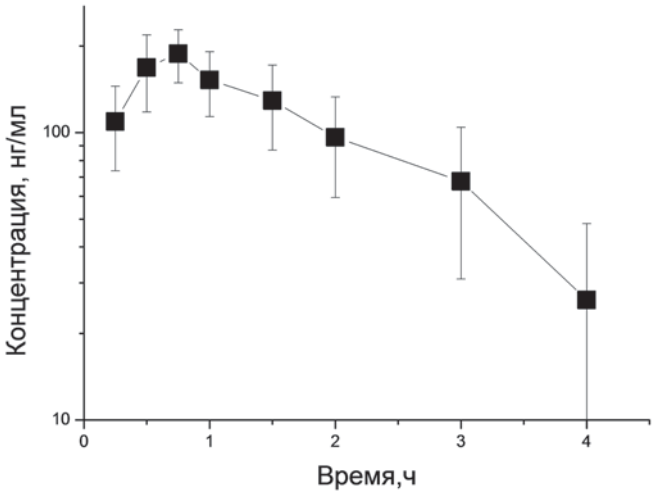


Рис. 2. Усреднённый фармакокинетический профиль ГБ-115 в плазме крови кроликов после однократного перорального введения субстанции в дозе 100 мг ($n = 6$; $\bar{x} \pm SD$)

Таблица 3

Фармакокинетические параметры ГБ-115 в плазме крови кроликов после однократного перорального введения субстанции в дозе 100 мг ($n = 6$)

Параметр	Значение		
	$\bar{x}$	SD	C.V.%
C_{max}, нг/мл	191,50	39,16	20,45
T_{max}, ч	0,71	0,10	14,41
$AUC_{0\text{-}T}$, нг/мл×ч	388,54	137,07	35,28
$AUC_{0\text{-}\infty}$, нг/мл×ч	447,59	165,00	36,86
$C_{max}/AUC_{0\text{-}T}$, $ч^{-1}$	0,5201	0,1012	19,42
k_{el}, $ч^{-1}$	0,5481	0,1332	24,30
$t_{1/2el}$, ч	1,32	0,30	22,85
MRT, ч	1,65	0,38	22,97
Cl/F, л/ч/кг	0,08	0,02	39,37
V_d/F, л/кг	0,15	0,08	53,33

максимальной концентрации анализируемого вещества в плазме крови (T_{max}) составило 0,71 ± 0,10 ч. Уровень максимальной концентрации в плазме крови животных (C_{max}) в среднем составил 191,50 ± 39,16 нг/мл. При этом среднее значение константы скорости элиминации (k_{el}) ГБ-115 из плазмы крови кроликов составило 0,548 ± 0,133 $ч^{-1}$, а период полуэлиминации ($t_{1/2el}$) ГБ-115 из плазмы крови – 1,32 ± 0,30 ч. MRT ГБ-115 в организме животных равнялось 1,65 ± 0,38 ч.

На рис. 3 представлены индивидуальные фармакокинетические профили ГБ-115 в плазме крови добровольцев после однократного перорального приёма таблеток ГБ-115 в дозе 15 мг.

Из рис. 3 видно, что снижение концентраций исследуемого лекарственного вещества после достижения

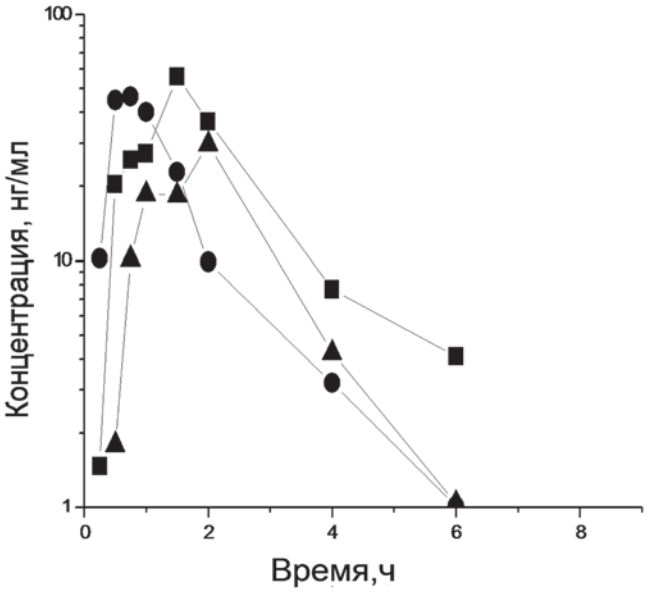


Рис. 3. Индивидуальные фармакокинетические профили ГБ-115 в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток ГБ-115 в дозе 15 мг ($\bar{x}$ ± SD; n = 3)

пиковых значений имеет монофазный характер. ГБ-115 определялся в плазме крови всех 3 добровольцев в течение 6 ч после приёма препарата.

В табл. 4 представлены фармакокинетические параметры ГБ-115 в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток ГБ-115 в дозе 15 мг.

Анализ фармакокинетических параметров показал, что ГБ-115 всасывался в системный кровоток из ЖКТ добровольцев с разной скоростью. Параметр, характеризующий скорость всасывания препарата в системный кровоток C_{max}/AUC_{0-T}, изменялся от 0,4838 до 0,6477 $ч^{-1}$. При этом время достижения C_{max} – T_{max} ГБ-115 в плазме крови изменялось от 0,75 до 2,0 ч и в среднем составило 1,42 ± 0,63 ч.

Величины C_{max} изменялись от 29,72 до 55,89 нг/мл (44,02 ± 13,25 нг/мл).

ГБ-115 достаточно быстро выводится из плазмы крови. Так, период полувыведения ($t_{1/2el}$) исследуемого вещества колебался от 0,83 ч до 1,17 ч и в среднем составил 0,98 ± 0,17 ч. Быстрое выведение препарата из организма характеризуется также величиной MRT. Величина данного параметра изменялась от 1,56 ч до 2,38 ч (2,04 ± 0,43 ч).

Общий плазменный клиренс (Cl/F) ГБ-115 находился в диапазоне значений 1,367–3,734 л/ч/кг (2,643 ± 1,194 л/ч/кг).

Параметром, характеризующим степень проникновения лекарственного вещества в ткани, является кажущийся объём распределения (V_d/F). Его величина для ГБ-115 после перорального введения в дозе 15 мг составила в среднем 3,60 ± 1,42 л/кг (2,31–5,12 л/кг).

Представляется целесообразным сравнить фармакокинетические характеристики ГБ-115 у животных разных видов и человека. Причём, следует сравнивать параметры, которые не зависят от введённой дозы, поскольку исследуемые дозы у животных и добровольцев отличались друг от друга на два порядка (100 мг/кг – для крыс и около 0,2 мг/кг – для добровольцев). Прямое сопоставление полученных значений, на наш взгляд, некорректно, поскольку отсутствует доказательство линейной зависимости фармакокинетики ГБ-115 в этом диапазоне доз.

Рассчитанные дозонезависимые фармакокинетические параметры у крыс, кроликов и человека после перорального введения ГБ-115 представлены в табл. 5.

При сравнении этих параметров ГБ-115 у крыс и кроликов выявлены межвидовые различия.

Так, параметр, характеризующий скорость всасывания препарата C_{max}/AUC_{0-T} из ЖКТ крыс в среднем составил 3,0794 $ч^{-1}$ и для кроликов – 0,5201 $ч^{-1}$. Таким образом, ГБ-115 всасывался в системный кровоток крыс в 6 раз быстрее, чем у кроликов. Выведение пре-

Таблица 4

Фармакокинетические параметры ГБ-115 в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток ГБ-115 (доза 15 мг)

Параметр	Добровольцы			$\bar{x}$	SD	C.V.%
C_{max}, нг/мл	55,89	46,46	29,72	**44,02**	**13,25**	**30,11**
T_{max}, ч	1,50	0,75	2,00	**1,42**	**0,63**	**44,41**
AUC_{0-T}, нг/мл×ч	115,53	71,73	65,88	**84,38**	**27,13**	**32,16**
$AUC_{0-\infty}$, нг/мл×ч	122,47	73,12	67,12	**87,57**	**30,37**	**34,68**
C_{max}/AUC_{0-T}, $ч^{-1}$	0,4838	0,6477	0,4511	**0,5275**	**0,1053**	**19,97**
k_{el}, $ч^{-1}$	0,5925	0,7289	0,8381	**0,7198**	**0,1231**	**17,09**
$t_{1/2el}$, ч	1,17	0,95	0,83	**0,98**	**0,17**	**17,54**
MRT, ч	2,38	1,56	2,18	**2,04**	**0,43**	**20,96**
Cl/F, л/ч/кг	1,367	3,734	2,828	**2,643**	**1,194**	**45,17**
V_d/F, л/кг	2,31	5,12	3,37	**3,60**	**1,42**	**39,44**

Таблица 5

Усредненные значения дозонезависимых фармакокинетических параметров, рассчитанных у крыс, кроликов и добровольцев после перорального введения/приёма ГБ-115

	Фармакокинетические параметры				
	C_{max}/AUC_{0-T}, $ч^{-1}$	T_{max}, ч	$t_{1/2el}$, ч	k_{el}, $ч^{-1}$	MRT, ч
Крыса	3,0794	0,17	0,24	2,8424	0,28
Кролик	0,5201±0,1012	0,71±0,10	1,32±0,30	0,5481±0,1330	1,65±0,38
Человек	0,5275±0,1053	1,42±0,63	0,98±0,17	0,7198±0,1231	2,04±0,43

парата из плазмы крови крыс и кроликов также происходило с различными скоростями (для крыс $t_{1/2el}$ – 0,24 ч и для кроликов – 1,32 ч, MRT – 0,28 и 1,65 ч, соответственно). Об этом также свидетельствуют величины k_{el}. Так, данный параметр у крыс составил 2,8424 $ч^{-1}$, у кроликов – 0,5481 $ч^{-1}$. Другими словами, выведение ГБ-115 из организма кроликов происходило в 5 раз медленнее, чем у крыс.

Фармакокинетические параметры ГБ-115, рассчитанные для добровольцев значительно отличалась от таковых, полученных для крыс. В то же время, при сравнении параметров, полученных у добровольцев и кроликов выявлены незначительные расхождения. Исследуемое соединение всасывалось из ЖКТ в системный кровоток у кроликов и добровольцев с одинаковой скоростью (0,5201 и 0,5275 $ч^{-1}$, соответственно). Среднее значение k_{el} у добровольцев была на 30% выше аналогичного параметра у кроликов. $t_{1/2el}$ ГБ-115 из плазмы крови добровольцев составил 0,98 ч, что на 30% меньше, чем у кроликов (1,32 ч). Аналогичная зависимость прослеживается при сопоставлении значений MRT добровольцев, крыс и кроликов.

После однократного перорального введения C_{max} ГБ-115 в плазме крови крыс регистрировались через 0,17 ч, у кроликов – 0,71 ч и через 1,42 ч – у добровольцев.

Заключение

Выявлены существенные межвидовые различия в фармакокинетике ГБ-115 после его перорального введения/приёма у крыс, кроликов и человека. Так, дозонезависимый параметр – константа скорости элиминации уменьшалась в ряду: крыса > человек > > кролик. Период полувыведения ГБ-115, напротив, возрастал в ряду: крыса < человек < кролик.

Литература

1. *Гудашева Т.А., Лезина В.П., Кирьянова Е.П. и соавт.* Синтез, конформационный анализ и анксиолитическая активность ретропептидных аналогов холецистокинина-4. Хим.-фарм. журнал. 2006; 40: 7: 21–26.
2. *Жердев В.П., Бойко С.С., Константинопольский М.А. и соавт.* Фармакокинетика и фармакодинамика фармацевтических композиций дипептидного анксиолитика ГБ-115. Хим.-фарм. журнал. 2016; 50: 5: 42–46.
3. *Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Литвин А.А. и соавт.* Клиническая фармакокинетика оригинального дипептидного анксиолитика ГБ-115. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2017; 1: 52–55.
4. *Зозуля А.А., Незнамов Г.Г., Сюняков Т.С. и соавт.* Эффективность и возможные механизмы действия нового пептидного анксиолитика селанка при терапии генерализованного тревожного расстройства и неврастении. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2008; 108: 4: 38–48.
5. *Колик Л.Г.* Разработка оригинального анксиолитика с антиалкогольной активностью на основе фармакологического изучения новых производных холецистокинина. Дисс. д-ра. биол. наук, Москва: НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, 2012; 340.
6. *Колик Л.Г., Гарибова Т.Л., Литвинова С.А. и соавт.* Отсутствие толерантности и синдрома отмены у нового L-триптофансодержащего дипептидного анксиолитика ГБ-115. Вестник РАМН. 2011; 7: 37–42.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. А.Н. Миронов (ред.), ЗАО «Гриф и К», Тула, 2013; 942.
8. *Шевченко Р.В.* Клинико-экспериментальная фармакокинетика нового дипептидного препарата дилепт. Автореф. Дисс. канд. мед. наук, М.: 2016; 24.
9. *Davies B., Morris T.* Physiological parameters in laboratory animals and humans. Pharm Res. 1993; 10: 7: 1093–1095.
10. *Liu Z., Wang C., Liu Q. et al.* Uptake, transport and regulation of JBP485 by PEPT1 *in vitro* and *in vivo*. Peptides. 2011; 32: 4: 747–754.

Нейропротекторное действие цикло-L-пролилглицина на моделях повреждения нейрональных клеток *in vitro*

Николаев С.В., Логвинов И.О., Антипов П.И., Колясникова К.Н., Антипова Т.А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

Резюме. Исследовано нейропротекторное действие цикло-L-пролилглицина в экспериментах *in vitro*. Показано, что L-ЦПГ оказывает нейропротекторное действие в условиях оксидативного стресса, глутаматной и 6-гидроксидофаминовой токсичности.

Ключевые слова: нейропротекция, цикло-L-пролилглицин, оксидативный стресс, глутаматная токсичность, 6-гидроксидофаминовая токсичность

Neuroprotective effect of L-cycloprolylglycine on models neuronal cells damage *in vitro*

Nikolaev S.V., Logvinov I.O., Antipov P.I., Kolyasnikova K.N., Antipova T.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. We have studied neuroprotective effect of L-cycloprolylglycine (L-CPG) *in vitro* experiments. It is shown that L-CPG has neuroprotective effect in the conditions an oxidative stress, glutamate and 6-hydroxydopamine toxicity.

Keywords: neuroprotection, L-cycloprolylglycine, oxidative stress, glutamate toxicity, 6-hydroxydopamine toxicity

Автор, ответственный за переписку:

Николаев Сергей Владимирович – научный сотрудник ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; e-mail: cergej.nikolajev@gmail.com

Введение

Нейропептид цикло-L-пролилглицин (L-ЦПГ), синтезированный в ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» [1], был позже обнаружен в мозге крыс [2]. Ноотропный [3], анксиолитический [4], антигипоксический [5] эффекты L-ЦПГ при системном введении были схожи с таковыми при введении пирацетама. Подобно пирацетаму, ЦПГ является положительным модулятором AMPA-рецепторов [6]. Известно, что положительные AMPA-модуляторы обладают нейропротекторным действием на различных моделях *in vitro* [7]. Исходя из этих данных, можно было предположить наличие нейропротекторного действия и у L-ЦПГ.

Целью работы было выявление нейропротекторного действия L-ЦПГ на различных моделях повреждения *in vitro*: оксидативного стресса, глутаматной токсичности, клеточной модели болезни Паркинсона, индуцированной нейротоксином 6-гидроксидофамином.

Материалы и методы исследования

L-ЦПГ синтезирован в отделе химии НИИ фармакологии им. В.В. Закусова [8]. Для экспериментов использовались реактивы: глутаминовая кислота (ICN), 6-гидроксидофамин и MTT (Sigma Aldrich), ДМСО (Panreac), среда ДМЕМ (HyClone), фетальная бычья сыворотка FBS (Gibco).

Клетки культивировали в среде ДМЕМ в случае гиппокампальных клеток линии HT-22 с добавлением 5% FBS, в случае клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y – 15% FBS при температуре 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO_2.

Глутаматную токсичность моделировали путём внесения в культуральную среду раствора глутаминовой кислоты в конечной концентрации 5 мМ. Через 24 ч среду заменяли на обычную. L-ЦПГ вносили за 24 ч до глутаминовой кислоты или сразу после смены среды. Жизнеспособность клеток измеряли методом MTT-теста через 24 ч [9].

Оксидативный стресс моделировали путём внесения перекиси водорода в конечной концентрации 1,5 мМ. Спустя 30 мин среду заменяли на обычную. Ещё через 4 ч выполняли измерение жизнеспособности клеток методом MTT-теста [10].

Клеточную модель болезни Паркинсона воспроизводили путём внесения раствора 6-гидроксидофамина в конечной концентрации 100 мкМ. Через 24 ч среду заменяли на обычную. Через 24 ч измеряли жизнеспособность клеток методом MTT-теста [11].

L-ЦПГ вносили за 24 ч до повреждения или сразу после смены среды в концентрациях 10^{-5} – 10^{-8}М.

Жизнеспособность клеток измеряли с использованием MTT-теста с добавлением 0,5% раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромида (MTT). Для растворения кристаллов формазана использовали ДМСО и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Multiscan EX при длине волны 600 нм [12].

Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Краскела-Уоллеса с последующим тестом по Данну (ANOVA). Данные представлены в виде m. ± s.d.

Результаты и их обсуждение

На модели глутаматной токсичности нами показано, что L-ЦПГ в культуре клеток НТ-22 в концентрациях 10^{-5}–10^{-8} моль/л оказывал нейропротекторное действие, но только в схеме внесения за 24 ч до повреждения. При внесении после глутаминовой кислоты нейропротекторное действие выявлено не было (рис. 1).

При моделировании оксидативного стресса путём добавления к культуре клеток НТ-22 перекиси водорода L-ЦПГ оказывал защитное действие как при внесении за 24 часа до перекиси в концентрациях от 10^{-5} моль/л до 10^{-8} моль/л, так и при внесении после перекиси, но только в концентрации до 10^{-7} моль/л (рис. 2, 3).

На клеточной модели болезни Паркинсона в культуре клеток SH-SY5Y с использованием 6-ги-

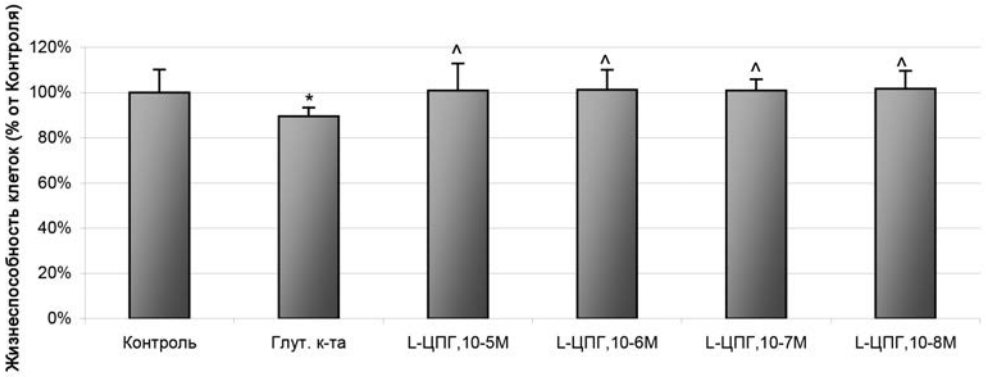


Рис. 1. Нейропротекторное действие ЦПГ на модели глутаматной токсичности (результат МТТ-теста)
Примечание: Внесение L-ЦПГ за 24 ч до глутаминовой кислоты ($p < 0,05$ по критерию Краскела-Уоллеса).
* – достоверность отличия от контроля; ^ – от глутаминовой кислоты

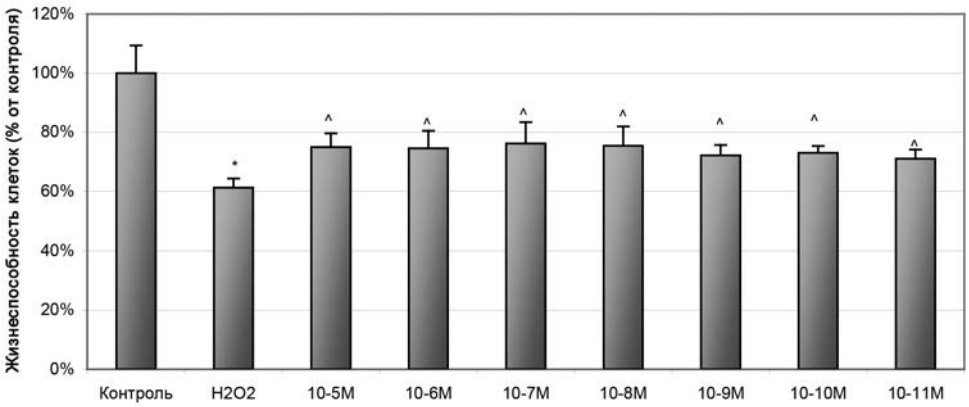


Рис. 2. Нейропротекторное действие ЦПГ на модели оксидативного стресса
Примечание: Внесение L-ЦПГ за 24 часа до перекиси водорода ($p < 0,05$ по критерию Краскела-Уоллеса).
* – достоверность отличия от контроля; ^ – от перекиси водорода

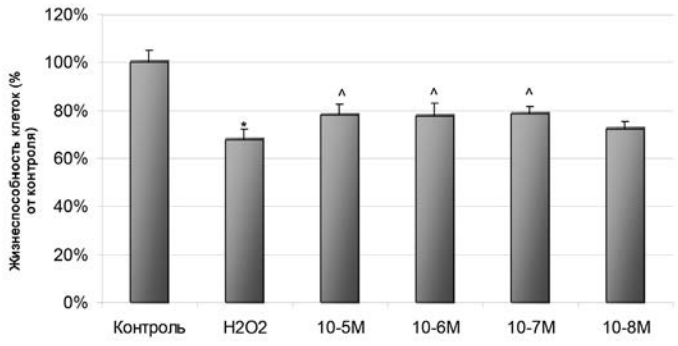


Рис. 3. Нейропротекторное действие ЦПГ на модели оксидативного стресса
Примечание: Внесение L-ЦПГ после перекиси водорода ($p < 0,05$ по критерию Краскела-Уоллеса).
* – достоверность отличия от контроля; ^ – от перекиси водорода

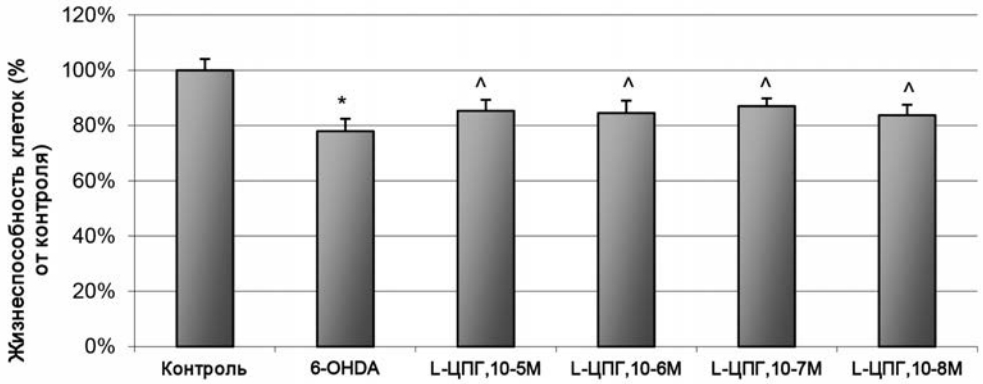


Рис. 4. Нейропротекторное действие ЦПГ на модели 6-гидроксидофаминового повреждения.
Примечание: Внесение L-ЦПГ после 6-гидроксидофамина ($p < 0,05$ по критерию Краскела-Уоллеса).
* – достоверность отличия от контроля; ^ – от 6-гидроксидофамина

дроксидофамина, L-ЦПГ в концентрациях 10^{-5}–10^{-8} моль/л, как и в случае глутаматной токсичности, нейропротекторное действие обнаруживалось только при добавлении пептида за 24 часа до токсина в концентрациях 10^{-5}–10^{-8} моль/л (рис. 4).

Таким образом, нами показано наличие нейропротекторного действия L-ЦПГ на моделях повреждения нейронов *in vitro*, наблюдавшееся преимущественно при внесении препарата до начала действия повреждающего агента. Эти результаты согласуются с данными литературы о наличии протекторного эффекта у L-ЦПГ на моделях кислородно-глюкозной депривации на первичной культуре гиппокампальных нейронов [13], а также майтотоксин-индуцированного некроза и апоптоза, индуцированного сульфатом железа (II) в зёрнах мозжечка [14]. Защитный эффект L-ЦПГ отсутствовал в схеме внесения после повреждения на модели травматического повреждения кокультуры нейрональных и глиальных клеток, а также апоптоза, индуцированного стауроспорином в культуре зёрен мозжечка [14], и NMDA-экзайтотоксичности на гиппокампальных нейронах [15].

Одним из ключевых звеньев механизма действия L-ЦПГ является его способность к положительной модуляции AMPA-рецепторов [16], что, как известно, приводит к усилению синтеза нейротрофинов, являющихся эндогенными нейропротекторами [7]. Поэтому наличие нейропротекторного эффекта только при внесении за 24 ч можно объяснить, исходя из предположения о том, что L-ЦПГ осуществляет своё защитное действие через положительную модуляцию AMPA-рецепторов и последующий синтез нейротрофинов, на который требуется интервал времени 18–24 ч [17]. Выявленное защитное действие L-ЦПГ в обеих схемах эксперимента на модели оксидативного стресса может быть обусловлено его антиоксидантными свойствами [14] и за счёт возможного влияния на систему антиоксидантной защиты клеток.

Выводы

Цикло-L-пролилглицин оказывает нейропротекторное действие в экспериментах *in vitro* и это согласуется с литературными данными о его защитном действии в других модельных системах *in vitro* и *in vivo*. Полученные результаты согласуются с литературными данными о наличии у положительных модуляторов AMPA-рецепторов нейропротекторных свойств.

Литература

1. *Гудашева Т.А., Василевич Н.И., Золотов Н.Н., Лезина В.П., Розенберг С.Г., Кравченко Е.В., Островская Р.У., Воронина Т.А., Розанцев Г.Г., Сколдинов А.П.* О механизме ноотропного действия топологических аналогов пирацетама на основе пролина. Хим.-фарм.ж.. 1991; 6: 25:12–16.

2. *Gudasheva T.A., Boyko S.S., Akparov V.Kh., Ostrovskaya R.U., Skoldinov A.P., Rozantsev G.G., Voronina T.A., Zherdev V.P., Seredenin S.B.* Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain. FEBS Letters. 1996; 391: 149–152.

3. *Гудашева Т.А., Островская Р.У., Трофимов С.С., Воронина Т.А., Сколдинов А.П., Середенин С.Б.* Новый эндогенный дипептид циклопролилглицин подобен пирацетаму по селективности мнемотропного эффекта. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999; 10: 128: 411–413.

4. *Гудашева Т.А., Константинопольский М.А., Островская Р.У., Середенин С.Б.* Анксиолитическая активность эндогенного ноотропа цикло-пролилглицина в тесте приподнятого крестообразного лабиринта стереоселективна. Бюлл. эксп. биол. и мед.. 2001; 5: 131: 545–550.

5. *Колясникова К.Н., Гудашева Т.А., Назарова Г.А., Антипов П.И., Николаев С.В., Антипова Т.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б.* Сходство цикло-пролилглицина с пирацетамом по антигипоксическому и нейропротекторному эффектам. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2012; 9: 75:3–6.

6. *Гудашева Т.А., Григорьев В.В., Колясникова К.Н., Замойский В.Л., Середенин С.Б.* Нейропептид циклопролилглицин является эндогенным положительным модулятором AMPA-рецепторов. Доклады Академии наук. 2016; 1: 471:106–108.

7. *Joudi H., Hsu Y.-T., Zhou M., Qin Q., Bi X., Baudry M.* Positive AMPA Receptor Modulation Rapidly Stimulates BDNF Release and Increases Dendritic mRNA Translation. Journal of Neuroscience. 2009; 8: 29: 8688–8697.

8. *Гудашева Т.А., Василевич Н.И., Островская Р.У., Трофимов С.С., Воронина Т.А., Сколдинов А.П., Розанцев Г.Г.* Синтез и ноотропная активность пирролидино [1,2-a] диазациклоалканонов. Хим.-фарм. ж. 1996; 9: 30: 12–17.

9. *Tan S., Wood M., Maher P.* Oxidative Stress Induces a Form of Programmed Cell Deathwith Characteristics of Both Apoptosisand Necrosis in Neuronal Cells. Journal of Neurochemistry. 1998; 1: 71: 95–105.

10. *Jackson G.R., Werrbach-Perez K., Ezell E.L., Post J.F.M., Perez-Polo J.R.* Nerve growth factor effects on pyridine nucleotides after oxidant injury of rat pheochromocytoma cells. Brain Research. 1992; 592: 239-248.

11. *Riveles K. Huang L.Z., Quik M.* Cigarette smoke, nicotine and cotinine protect against 6-hydroxydopamine-induced toxicity in SH-SY5Y cells. NeuroToxicology. 2008; 29: 421–427.

12. *Twentyman P.R., Luscombe M.* A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. British journal of cancer. 1987; 56: 279–285

13. *DRA. María Teresa García López,* el potencial terapéuticodel tripéptido n-terminal deligf-1 y de sus miméticos comofármacos neuroprotectores, 2007.

14. *Prakash K.R.C., Tang Y., Kozikowski A.P., Flippen-Anderson J.L., Knoblachc S.L., Fadenc A.I.* Synthesis and Biological Activity of Novel Ne uroprotectiveDiketopiperazines. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 2002; 10: 3043–3048.

15. *Burgos-Ramos E., Martos-Moreno G.A., López M.G., Herranz R., Aguado-Llera D., Egea J., Frechilla D., Cenarruzabeitia E., León R., Arilla-Ferreiro E., Argente J., Barrios V.* The N-terminal tripeptide of insulin-like growth factor-I protects against beta-amyloid-induced somatostatin depletion by calcium and glycogen synthase kinase 3 beta modulation. Journal of neurochemistry. 2009; 109: 360–370.

16. *Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Антипова Т.А., Середенин С.Б.* Нейропептид циклопролилглицин увеличиваетсодержание мозгового нейротрофического фактора в нейрональных клетках. Доклады Академии наук. 2016; 4: 469:492–495.

17. *Tabakman R., Lecht S., Sephanova S., Arien-Zakay H., Lazarovici P.* Interactions between the cells of the immune and nervous system: neurotrophins as neuroprotection mediators in CNS injury. Interactions between the cells of the immune and nervous system: neurotrophins as neuroprotection mediators in CNS injury. 2007; 146: 385–401.

Исследование стереоспецифичности нейропротекторного действия дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 на модели оксидативного стресса в культуре гиппокампальных клеток линии НТ-22

Логвинов И.О., Тарасюк А.В., Антипов П.И., Антипова Т.А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», г. Москва

Резюме. Исследована стереоспецифичность нейропротекторнного действия димерного дипептидного миметика 4-й петли BDNF – ГСБ-106. Для этого изучена активность его диастереомеров ГТ-106DL (гексаметилендиамид бис-моносукцинил-D-серил-L-лизина) и ГТ-106LD (гексаметилендиамид бис-моносукцинил-L-серил-D-лизина) на гиппокампальных клетках линии НТ-22 в условиях оксидативного стресса. Оба диастереомера были не активны. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о зависимости эффекта от конфигурации аминокислотных остатков в структуре ГСБ-106.

Ключевые слова: нейропротекция, оксидативный стресс, BDNF, ГСБ-106, стереоспецифичность

A study of neuroprotective effect stereospecificity of dipeptide mimetic of the Brain-derived neurotrophic factor GSB-106 on the model oxidative stress in the culture hippocampal cell line HT-22

Logvinov I.O., Tarasiuk A.V., Antipov P.I., Antipova T.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. In the present work, the neuroprotective effect stereospecificity of dimeric dipeptide mimetic of the 4th loop of BDNF-GSB-106 is studied. Activity of its diastereomers GT-106DL (hexamethylenediamide bis-monosuccinyl-D-seryl-L-lysine) and GT-106LD (hexamethylenediamide bis-monosuccinyl-L-seryl-D-lysine) in hippocampal HT-22 cells under conditions of oxidative stress is for this purpose studied. Both diastereomers were inactive. Thus, the obtained data indicate dependence of effect on the configuration of amino acid residues in the structure of GSB-106.

Keywords: Neuroprotection, oxidative stress, BDNF, GSB-106, stereospecificity

Автор, ответственный за переписку:

Логвинов Илья Олегович – научный сотрудник ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; e-mail: logvinov_ilya@mail.ru

Введение

Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) относится к семейству нейротрофинов, которое включает в себя фактор роста нервов, нейротрофин-3 и нейротрофин-4/5. Благодаря своей способности увеличивать выживаемость нейронов, нейротрофины рассматриваются как эндогенные нейропротекторы. BDNF особенно привлекателен в этом отношении, так как он улучшает выживание и предупреждает дегенерацию популяций нейронов, вовлечённых в такие заболевания, как болезнь Альцгеймера (базальные холинергичекие нейроны переднего мозга), Паркинсона (дофаминергические нейроны черной субстанции), Хантингтона [1, 2]. Особый интерес к BDNF определяется его участием в патогенезе депрессий [3].

Однако применение BDNF при системном введении ограничено такими факторами, как биодеградация, низкая способность проникать через гематоэнцефалический барьер и наличием нежелательных побочных эффектов [4, 5].

Ранее в ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» был получен димерный дипептидный миметик 4-й петли BDNF – ГСБ-106LL (гексаметилендиамид бис-моносукцинил-L-серил-L-лизина) на основе гипотезы о том, что фармакофорными участками нейротрофинов являются бета-изгибы их шпилькообразных петель [6].

ГСБ-106, аналогично BDNF, проявлял нейропротекторную активность на модели оксидативного стресса в культуре гиппокампальных нейронов линии НТ-22 в интервале концентраций 10^{-5}—10^{-8} М [7].

С целью развития новой группы нейропротекторов на основе димерных дипептидных миметиков BDNF в настоящей работе исследована связь структуры и активности в ряду аналогов ГСБ-106. Для этого были синтезированы два новых диастереомера ГСБ-106 – ГТ-106DL (замена *L*-Ser на *D*-Ser) и ГТ-106LD (замена *L*-Lys на *D*-Lys), и изучена их нейропротекторная активность *in vitro*.

Материалы и методы

Культура гиппокампальных клеток линии НТ-22

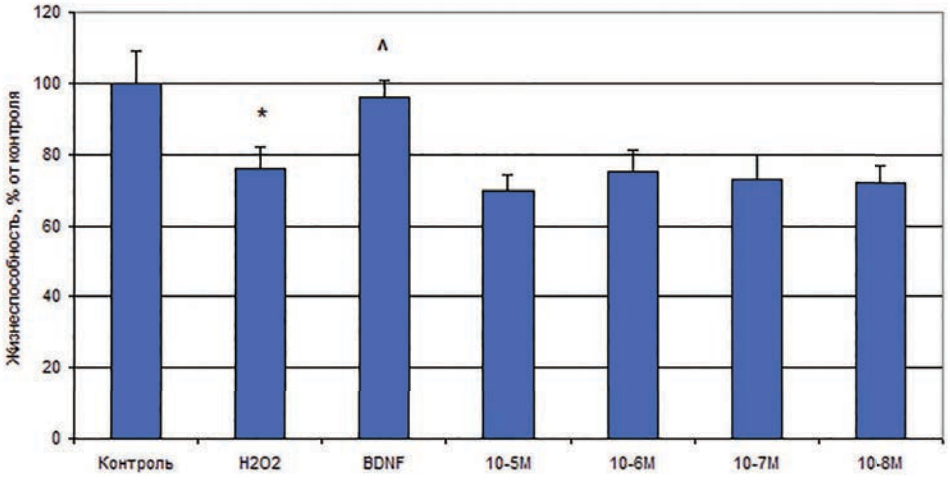
Иммортализованные клетки гиппокампа мыши линии НТ-22 рассеивали на 96-луночные планшеты обработанные поли-Д-лизином (BD Biosciences, San Jose, USA; 5 мкг/см^2), с плотностью 3,5 тыс. на лунку в среде ДМЕМ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), содержащей 5% телячьей эмбриональной сыворотки (Gibco Life Technologies, New York, USA) и 2 мМ *L*-глутамина (ICN, Eschwege, Germany), и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO_2.

Модель оксидативного стресса

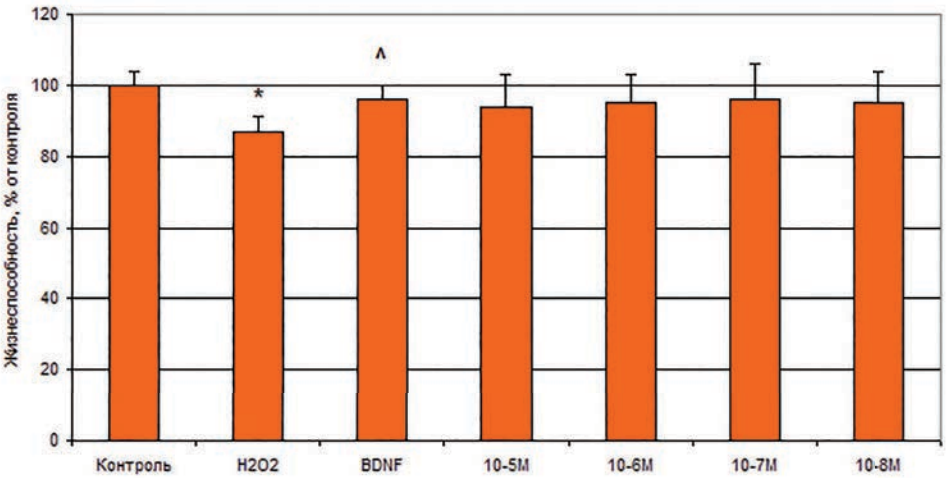
Оксидативный стресс моделировали путём внесения в клеточную среду культивирования раствора перекиси водорода (H_2O_2) в конечной концентрации 1,5 мМ. Клетки с H_2O_2 инкубировали в атмосфере 5% CO_2 при 37 °С 30 мин. Далее среду заменяли на нормальную и через 4 ч определяли жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста (бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5 дифенилтетразолия (МТТ) (Sigma, США)) [8]. В качестве положительного контроля использовали BDNF (BD Bioscience, Великобритания) в конечной концентрации 50 нг/мл. ГТ-106DL и ГТ-106LD вносили в конечных концентрациях 10^{-5}–10^{-8}М за 24 ч до повреждения клеток и после отмывки H_2O_2. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре “Multiscan EX” (Thermo, США) при длине волны 600 нм.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA). Данные представлены в виде m ± s.d.



а



б

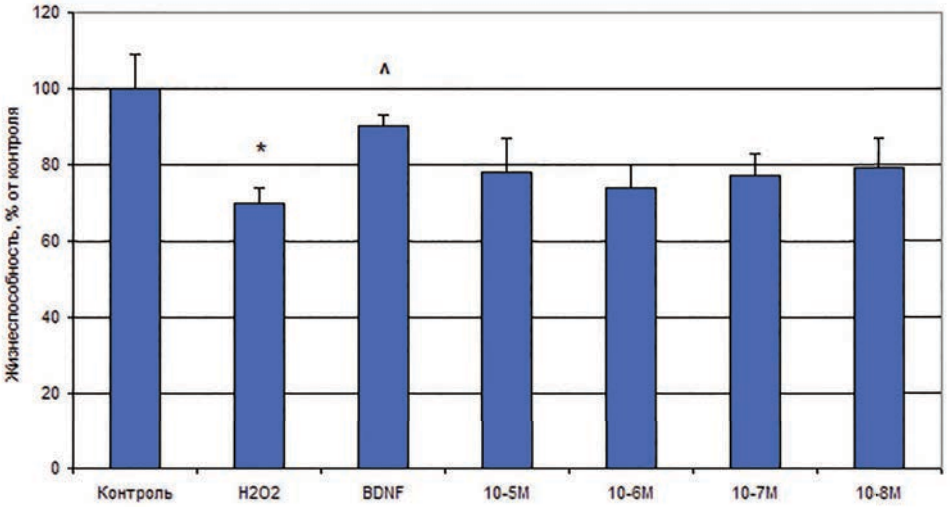
Рис. 1. Влияние различных концентраций ГТ-106DL (*а*) и ГТ-106LD (*б*) на жизнеспособность гиппокампальных нейронов линии НТ-22 на модели оксидативного стресса (результаты МТТ-теста). Внесение пептидов за 24 ч до перекиси водорода
Примечание: * – $p \le 0,05$ по сравнению с контролем; ^ – $p \le 0,05$ по сравнению с перекисью водорода

Результаты и их обсуждение

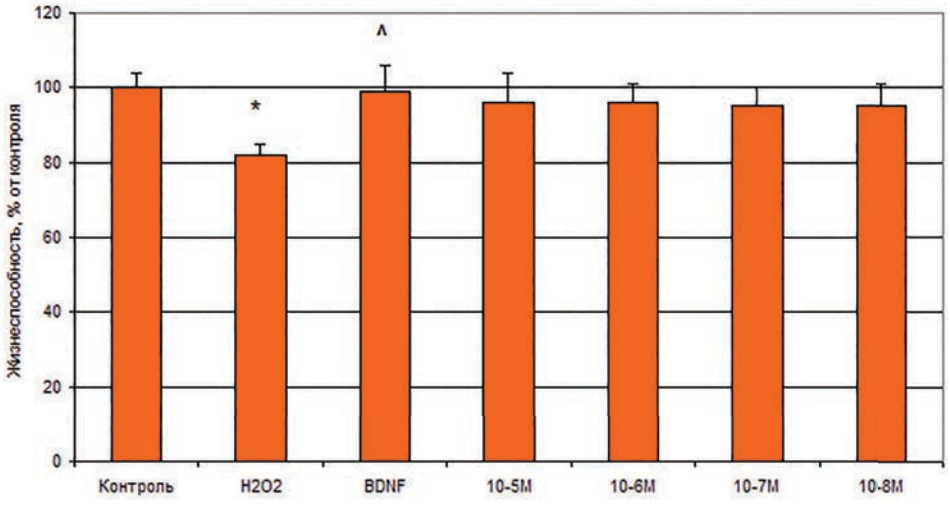
Для выявления нейропротекторного действия димерных дипептидных стереоизомеров ГСБ-106 была использована модель окисидативного стресса. Оксидативный стресс является одним из центральных звеньев нейродегенеративных процессов. Индукция этого стресса в культуре клеток является одной из самых популярных моделей для исследования повреждений нейронов при ишемии и других нейродегенеративных заболеваний. Последовательность событий, происходящих при этом в клетке, достаточно хорошо изучена. Поэтому эта модель особенно интересна с точки зрения исследования действия новых потенциальных нейропротекторов.

Полученные результаты показывают, что внесение перекиси водорода приводило к достоверному снижению жизнеспособности клеток HT-22. BDNF защищал клетки от гибели в обеих схемах эксперимента. ГТ-106DL и ГТ-106LD не оказывали нейропротекторного действия ни в одной из исследуемых концентраций как при внесении в культуру гиппокампальных нейронов линии HT-22 за 24 ч до оксидативного стресса (рис. 1), так и после повреждения перекисью водорода (рис. 2).

Таким образом, показано исчезновение нейропротекторного эффекта при замене остатка L-серина на D-серин (ГТ-106DL), а также при замене L-лизина на D-лизин (ГТ-106LD). Полученные результаты свидетельствуют о ключевой роли L-конфигурации как для остатка лизина, так и для остатка серина, в проявлении нейропротекторной активности стереоизомеров ГСБ-106.



а



б

Рис. 2. Влияние различных концентраций ГТ-106DL (*а*) и ГТ-106LD (*б*) на жизнеспособность гиппокампальных нейронов линии HT-22 на модели оксидативного стресса (результаты МТТ-теста). Внесение пептидов сразу после отмывки перекиси водорода

Примечание: * – $p \le 0,05$ по сравнению с контролем; ^ – $p \le 0,05$ по сравнению с перекисью водорода

Литература

1. *Zuccato C., Cattaneo E.* Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. Nature reviews. Neurology 2009; 5: 311–322.
2. *Schmidt H.D., Duman R.S.* Peripheral BDNF Produces Antidepressant-Like Effects in Cellular and Behavioral Models. Neuropsychopharmacology 2010; 35: 2378–2391.
3. *Castren E., Rantamaki T.* The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. Dev. Neurobiol. 2010; 70: 5: 289–297.
4. BDNF Study Group (Phase III). Neurology. 1999; 52: 1427–1433.
5. *Poduslo J.F., Curran G.L.* Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. Brain Res. Mol. Brain Res. 1996; 36: 280–286.
6. *Середенин С.Б., Гудашева Т.А.* Дипептидные миметики нейротрофинов NGF и BDNF: Патент РФ №2410392. Б.И. 2011; 3.
7. *Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В., Логвинов И.О., Поварнина П.Ю., Антипова Т.А., Середенин С.Б.* Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора. Биоорган. химия 2012; 38: 3: 280–290.
8. *Jackson G.R., Werrbach-Perez K., Ezell E.L., Post J.F., Perez-Polo J.R.* Nerve growth factor effects on pyridine nucleotides after oxidant injury of rat pheochromocytoma cells. Brain Res. 1992; 592: 1–2: 239–248.

Влияние трифтазина на проявления расстройств аутистического спектра у крыс с фетальным вальпроатным синдромом

Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А., Процун Г.В.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

Резюме. На модели фетального вальпроатного синдрома у крыс изучено влияние трифтазина на нарушение социального взаимодействия как основного показателя расстройства аутистического спектра, а также на ориентировочно-исследовательское поведение и способность к обучению животных. Показано, что трифтазин в дозе 0,35 мг/кг не влияет на дефицит социального взаимодействия и показатели пространственного обучения и памяти, но улучшает ориентировочно-исследовательскую активность за счёт снижения тревожности у крыс с фетальным вальпроатным синдромом.

Ключевые слова: трифтазин, вальпроевая кислота, фетальный вальпроатный синдром, расстройства аутистического спектра, социальное взаимодействие, тревожность

Effect of triftazin (trifluoperazine) on the symptoms of autism spectrum disorders in rats with fetal valproatate syndrome

Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Voronina T.A., Protsun G.V.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. The effect of triftazin (trifluoperazine) on social interaction abnormalities as a main feature of autism spectrum disorders, exploratory behavior and learning capacity was studied in rats with fetal valproatate syndrome. It was shown that triftazin at a dose of 0,35 mg/kg does not affect the deficit of social interaction, spatial learning or memory but improves exploratory activity by decreasing anxiety in rats with fetal valproate syndrome.

Keywords: triftazin, valproic acid, fetal valproate syndrome, autism spectrum disorders, social interaction, anxiety

Автор, ответственный за переписку:

Капица Инга Геннадиевна — к.б.н., ст. научный сотрудник ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; e-mail: ingakap73@mail.ru

Введение

Термин расстройства аутистического спектра (РАС, англ.: ASD – autism spectrum disorders) относится к группе состояний, связанных с нарушением развития нервной системы. Растущая с каждым годом распознаваемость этой группы расстройств, эмоциональное влияние, оказываемое ими на семьи, и связанное с их лечением и социальной помощью бремя финансовых затрат, делают РАС важным заболеванием с точки зрения науки, общественного здравоохранения и защиты прав человека [1, 2]. Сегодня распространение аутизма сравнивают по масштабу с эпидемией, охватившей весь мир, а количество больных детей уже достигает одного на 200 и более [2]. Сегодня распространение аутизма сравнивают по масштабу с эпидемией, охватившей весь мир. По данным ВОЗ 1 из 160 детей в мире страдает РАС [20].

РАС – это расстройство развития, характеризующееся стойким дефицитом способности поддерживать и инициировать социальное взаимодействие и социальные связи (использование вербального и невербального языка), а также ограниченными и стереотипными паттернами поведения. Эти качественные нарушения являются общими чертами индивидуального развития при РАС и проявляются во всех ситуациях, хотя могут варьировать по степени выраженности.

На сегодняшний день отсутствуют средства патогенетической терапии РАС [3]. Основные усилия терапии РАС направлены на купирование позитивных симптомов болезни, уменьшение когнитивных нарушений, смягчение тяжести аутизма, социальное взаимодействие, стимуляцию развития функциональных систем, создание предпосылок к возможности обучения. Выбор препарата проводится с учётом особенностей психопатологической структуры расстройства, наличия или отсутствия сопутствующих психических, неврологических и соматических нарушений [4]. Трудности проведения психофармакотерапии РАС заключаются, прежде всего, в том, что препараты нового поколения (например, атипичные нейролептики, антидепрессанты) не рекомендованы к применению в детском возрасте по тем или иным причинам (отсутствие апробации препарата, доказательной эффективности и т. д.). Именно поэтому арсенал лекарственных средств для лечения РАС ограничен [4].

Основными группами препаратов, входящих в комплексное лечение РАС, наряду с методами психологической и педагогической коррекции, являются нейролептики, ноотропные препараты (нейроме-

таболические стимуляторы, церебропротекторы), антидепрессанты и транквилизаторы [5].

К основным фармакологическим особенностям нейролептиков относится своеобразное успокоительное действие, сопровождающееся уменьшением реакций на внешние стимулы, ослабление психомоторного возбуждения и аффективной напряженности, подавление чувства страха, ослабление агрессивности [5]. При РАС нейролептики обычно используются для коррекции таких проявлений, как агрессия, аутоагрессия, двигательная расторможенность, страхи, тревожность, стереотипное двигательное возбуждение. Некоторые нейролептики оказывают активирующий эффект, повышают речевую активность, улучшают интеллектуальную продуктивность, на фоне терапии некоторыми из них наблюдается увеличение социальных контактов [5, 6].

Нейролептики фенотиазинового ряда при курсовом применении в малых дозах повышают активность больных, восстанавливают мотивации, интерес к своему состоянию, родным, окружающему, создают стремление к деятельности, увеличивают моторную активность, ослабляют негативные симптомы – аутизм, речевую обеднённость [7]. Одним из часто назначаемых нейролептиков фенотиазинового ряда больным с РАС является трифтазин (Трифлюоперазин, тразин, трифтазина-гидрохлорид, эсказин), разрешённый для применения у детей старше 3 лет [5]. Его антипсихотическое действие сочетается с умеренным стимулирующим эффектом.

Целью настоящего исследования является оценка влияния трифтазина на проявление симптомов РАС на модели фетального вальпроатного синдрома у крыс.

Материалы и методы

Исследования выполнены на самцах крыс линии Вистар, полученных от самок, которым в период беременности вводили вальпроат натрия. Родительское поколение (самки и самцы линии Вистар) были получены из питомника «Столбовая» (Московская область). Организация и проведение экспериментов осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России №199н от 1 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Животные содержались в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (виварием)» от 29 августа 2014 г. № 51.

Расстройства аутистического спектра диагностируются наличием нескольких критериев, в числе которых: нарушение социального взаимодействия; дефицит общения; стереотипное, повторяющееся поведение, настойчивое требование постоянных, одинаковых условий; ограниченность интересов; нарушение когнитивных функций и др.

На основе этих представлений разработаны специальные экспериментальные модели аутизма у животных, позволяющие воспроизвести нарушения ЦНС в эксперименте, в их числе модель дисфункции нервной системы, вызываемая пренатальным введением тератогенного агента – высокой дозы вальпроевой кислоты (ВПК). Данное воздействие приводит к появлению фетального вальпроатного синдрома (ФВС), который характеризуется комплексом признаков схожими с РАС, в том числе нарушениями в социальном взаимодействии [8–11], и является пригодной для поиска терапевтических агентов для лечения данных расстройств [12]. В высоких дозах (600–800 мг/кг) ВПК и её соли проявляют свойства нейротоксина, вызывая дисфункции нервной системы, описываемые как ФВС у потомства. Воздействие ВПК на эмбрион является причиной дефектов развития нервной трубки [13] и появления таких поведенческих отклонений, как снижение социального взаимодействия (общительности), низкая болевая чувствительность, повышение тревожности и страха у щенят и взрослых животных [9, 10].

ВПК (Sigma-Aldrich Company) вводили однократно внутрибрюшинно в дозе 500 мг/кг самкам крыс линии Вистар на 13-й день гестации. Для получения животных пассивного контроля самкам крыс линии Вистар на 13-й день гестации вводили воду для инъекций в эквивалентном объёме. Новорождённых крысят содержали в одной клетке с самкой до 21-го дня постнатального развития, после чего проводили их отлучение от матери, равномерное распределение по экспериментальным группам. В каждой экспериментальной группе было по 8–10 животных.

С 30 по 35-й дни жизни крысята получали трифтазин в дозе 3,5 мг/кг или воду для инъекций (активный и пассивный контроль) перорально (внутрижелудочно) при помощи зонда однократно ежедневно. В день проведения экспериментов вещества не вводили.

Тест «Социальное взаимодействие». Тест нарушения социального взаимодействия широко используется в экспериментальных исследованиях по изучению влияния веществ на проявления РАС. Чаще всего исследования проводят в установке, разделённой прозрачными стенками на три равных отсека [9, 10, 12, 14]. Тестируемое животное помещают в центральный отсек, а в крайние отсеки помещают новые, незнакомые объекты: незнакомую крысу того же пола и возраста и новый несоциальный объект. Оценивают время, проведённое животным в каждом из отсеков, время обследования объектов и число заходов в отсеки в течение 10 мин. По полученным показателям вычисляют коэффициент предпочтения социального объекта по формуле: К = Б / (А + Б), где А – время нахождения животного в отсеке с несоциальным объектом и Б – время нахождения тестируемой крысы в отсеке с социальным объектом [15].

Тест «Открытое поле». Изучение влияния трифтазина на локомоторную и ориентировочно-исследовательскую активность крысят с ФВС на 36-й день их постнатального развития проводили в установке

«Открытое поле» для мышей (НПК «Открытая Наука», Россия). Установка представляет собой круглую арену диаметром 63 см и высотой стенок – 32 см, пол которой поделён на три ряда секторов (центральный, пристеночный (периферия) и прецентральный – «2/3 поля») и имеет 13 отверстий (норок) диаметром 1 см каждое. Животное помещают в центр поля и в течение 3 мин регистрируют число горизонтальных перемещений, вертикальных движений (стойки), актов поисковой активности (заглядывание в отверстия) и груминга [16]. По полученным показателям вычисляют индекс тревожности (соотношение показателя горизонтальной активности в центральном и прецентральном секторах поля к сумме показателей активности на периферии, прецентральном и центральном секторах поля) [17].

Тест «У-образный лабиринт». Исследование рукавов лабиринта (пространственная память) – характерная форма поведения грызунов, в основе которой лежит исследовательская мотивация и способность выбирать для посещения ранее не исследованный рукав. Y-образный лабиринт представляет собой установку, состоящую из трёх радиально отходящих от центра под одинаковым градусом рукавов длиной 50 см, шириной 10 см и с высотой стенок 12 см, выполненных из непрозрачного материала. За день до опыта один из рукавов лабиринта закрывают, крысу помещают в один из открытых – «домашний» рукав и в течение 5 мин позволяют животному свободно посещать два открытых рукава («домашний» – А и «альтернативный» – Б). Через 24 ч крысу вновь помещают в центр лабиринта с тремя открытыми рукавами. Регистрируют время пребывания в каждом рукаве и число их посещений в течение 5 мин [18].

Статистика. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью статистических пакетов «BioStat» для Windows, пакета Excel. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Достоверность различий рассчитывали, используя непараметрический анализ для независимых переменных (U-тест Манна–Уитни), критерий Уилкоксона и парный критерий Стьюдента для внутригрупповых сравнений. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$. Результаты в таблицах представлены как среднее ± ошибка среднего (Mean ± SEM).

Результаты и обсуждение

Полученные в ходе эксперимента данные подтвердили, что пренатальное введение высокой дозы ВПК вызывает выраженные отклонения в поведении крысят и негативно воздействует на формирование их внутривидовых реакций, что выражалось в снижении социальных контактов, предпочтении несоциального объекта социальному (табл. 1, 2). Так, крысята с ФВС проводили в отсеке с социально значимым объектом на 57,5% меньше времени, чем в отсеке с социально незначимым объектом; что было в 2,3 раза меньше чем в группе контрольных крыс, продолжительность нахождения которых в отсеке с незнакомой крысой было достоверно больше времени, проведённом в отсеке с социально незначимым объектом (см. табл. 1).

При этом, длительность обследования социального и несоциального объектов крысятами группы «ФВС» не отличались друг от друга, тогда как в контрольной группе без патологии продолжительность обследования социального объекта была в 3,3 раза больше, чем несоциального, что было в 2,7 раза достоверно больше соответствующего показателя группы ФВС (табл. 2).

Терапия трифтазином в дозе 0,35 мг/кг не улучшила показатели социального взаимодействия – время нахождения крыс в отсеке с социальным объектом было лишь на 14,2% больше, чем в отсеке с несоциальным объектом, и коэффициент предпочтения социального объекта недостоверно повысился до 0,49, тогда как в группе «ФВС» он составлял – 0,3 (см. табл. 1), а длительность обследования социального объекта была в 1,5 раза недостоверно больше, чем несоциального объекта (см. табл. 2).

Число заходов в отсеки со значимым и незначимым социальными объектами, а также общая двигательная активность как при межгрупповом, так и при внутригрупповом сравнении, у животных всех групп не отличались (см. табл. 2).

У крысят с ФВС на 36-й день их постнатального развития выявлено нарушение локомоторного и ориентировочно-исследовательского поведения в тесте «Открытое поле». Так, отмечалось значимое снижение горизонтальной двигательной активности по всем регистрируемым показателям: общей двигательной активности (в 1,7 раза), числа перемещений в пристеночной (в 1,5 раза), и особенно, в центральной (в 4 раза), и прецентральной (в 3 раза) зонах установки, по сравнению с показателями контрольной группы крыс. Зарегистрированы достоверное уменьшение на 62,6% вертикальной активности и тенденция к снижению на 39% числа заглядываний в норки (табл. 3). Кроме того, у крысят с экспериментальным РАС индекс тревожности в 3,7 раза отличался от показателя интактных крыс, что в совокупности с ростом числа актов груминга, свидетельствует о повышенной тревожности животных с ФВС (см. табл. 3).

Трифтазин (0,35 мг/кг) оказал положительное влияние на ориентировочно-исследовательское поведение крыс с ФВС, что выразилось в достоверном увеличении в 2,2 раза вертикальной активности, в значимом росте числа пересечений прецентральной части поля и в увеличении на уровне тенденции ($p < 0,06$) общей горизонтальной активности, а также в уменьшении числа актов груминга относительно показателя животных группы «ФВС» (см. табл. 3). Индекс тревожности при введении трифтазина был равен 1,37, что в 2,9 раза отличалось от соответствующего показателя группы крыс с ФВС (см. табл. 3).

Таблица 1

Влияние трифтазина в дозе 0,35 мг/кг на поведение крыс с ФВС на 36-й день постнатального развития в тесте «Социальное взаимодействие» (среднее ± стандартная ошибка среднего)

Группа	Время нахождения в отсеке, с			Коэффициент предпочтения социального объекта: Б/(А+Б)
	с несоциальным объектом (А)	с социальным объектом (Б)	центральном отсеке	
Контроль	162,4 ± 51,5#*	368,2 ± 49,6*	68,7 ± 26,0	0,69 ± 0,1*
ФВС	374,0 ± 83,2	158,9 ± 77,8	66,4 ± 25,5	0,30 ± 0,2
ФВС + Трифтазин	264,5 ± 55,8	308,2 ± 53,9	27,3 ± 6,0	0,49 ± 0,1

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «ФВС»; # – $p < 0,05$ относительно времени в отсеке с социальным объектом (внутригрупповое сравнение)

Таблица 2

Влияние трифтазина в дозе 0,35 мг/кг на время обследования социального и несоциального объектов крысами с ФВС на 36-й день постнатального развития в тесте «Социальное взаимодействие» (среднее ± стандартная ошибка среднего)

Группа	Время обследования, с		Времени обследования социального объекта, %	Общая двигательная активность, ед.
	несоциального объекта	социального объекта		
Контроль	71,5 ± 8,7#	234,9 ± 35,3*	72,0 ± 8,4*	10,3 ± 2,0
ФВС	82,3 ± 16,3	86,0 ± 40,0	37,8 ± 14,5	8,2 ± 2,8
ФВС + Трифтазин	75,0 ± 11,6	110,5 ± 14,5	59,6 ± 8,2	9,3 ± 0,5

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «ФВС»; # – $p < 0,05$ относительно времени обследования социального объекта (внутригрупповое сравнение)

Таблица 3

Влияние трифтазина в дозе 0,35 мг/кг на поведение крысят с ФВС в условиях теста «Открытое поле» (среднее ± стандартная ошибка среднего)

Группа	Двигательная активность, ед.					Норки, ед.	Груминг, ед.	Индекс тревожности
	горизонтальная				вертикальная			
	периферия	2/3 поля	центр	общая				
Контроль	65,7 ± 5,5*	10,7 ± 1,0*	1,6 ± 0,3*	78,0 ± 5,7*	15,5 ± 1,5*	9,5 ± 1,2	2,1 ± 0,5*	1,8 ± 0,3*
ФВС	43,0 ± 1,5	3,4 ± 1,2	0,4 ± 0,4	46,8 ± 1,7	5,8 ± 0,9	5,8 ± 1,8	4,4 ± 1,0	0,5 ± 0,4
ФВС + Трифтазин	53,9 ± 5,9	7,6 ± 1,4*	1,3 ± 0,3	62,8 ± 6,4#	12,7 ± 2,2*	5,9 ± 2,0	2,0 ± 0,5*	1,4 ± 0,5

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «ФВС»; # – $p < 0,06$ по сравнению с группой «ФВС»

Особенности поведения и пространственной памяти крысят с ФВС изучали в тесте «Y-образный лабиринт». Введение ВПК самкам на 13-й день гестации вызвало у их потомства нарушение свойственного для грызунов пространственного исследовательского поведения, направленного на изучение новых объектов (территорий), что выразилось в предпочтении ранее исследованных рукавов, тогда как в норме животные проявляли исследовательскую активность в большей степени относительно «нового», ранее не исследованного рукава. Так, в контрольной группе крыс продолжительность исследования «нового» рукава лабиринта (С) было в 1,8 раза в виде тенденции больше по сравнению с суммой времени их нахождения в «домашнем» (А) и альтернативном (Б) рукавах. Доля времени, затраченного на исследование «нового» рукава крысятами пассивного контроля составляла 54,6% (табл. 4).

В группе крыс с ФВС, также как и в группе «Трифтазин», продолжительность исследования «нового» рукава лабиринта (С) была в 1,8 раза достоверно меньше времени нахождения в «домашнем» и альтернативном рукавах. При этом доля времени обследования «нового» рукава «С» животных обеих групп с патологией составляла примерно треть от времени исследования всех рукавов (см. табл. 4).

Во всех группах крыс с ФВС, с терапией Трифтазином и без, наблюдалось гиперактивное поведение, регистрируемое по увеличенному количеству входов в рукава лабиринта по сравнению с контрольной группой. Причём, если в контрольной группе число заходов в новый рукав было в 1,6 раза меньше, то в

Таблица 4

Влияние трифтазина на поведение крыс с ФВС в У-образном лабиринте (среднее ± стандартная ошибка среднего)

Регистрируемые показатели	Группа		
	контроль	ФВС	ФВС + Трифтазин 0,35 мг/кг
Время нахождения в рукавах А + Б, с	62,5 ± 9,1	164,8 ± 9,5*#	147,1 ± 12,7*#
Время нахождения в рукаве С, с	109,1 ± 23,2 $p < 0,09$	93,6 ± 20,6	81,8 ± 17,3
Доля времени,в отсеке С, %	54,6 ± 9,9	35,4 ± 6,6	35,2 ± 5,5
Число заходов в рукава А + Б, ед.	3,6 ± 0,4#	9,0 ± 0,6*#	8,0 ± 0,5*#
Число заходов в рукав С, ед.	2,2 ± 0,3	3,9 ± 0,5*	4,1 ± 0,4*
Общее число переходов, ед	5,9 ± 0,8	12,9 ± 1,5*	12,1 ± 1,2*
Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «Контроль»; # – $p < 0,05$ относительно времени в рукаве «С» (числа заходов в рукав «С»), внутригрупповое сравнение			

группах «ФВС» и «ФВС + Трифтазин» – в 2,3 и 1,95 раза меньше, соответственно, чем сумма числа заходов в «домашний» и «альтернативный» рукава (см. табл. 4). Полученные данные хорошо согласуются с данными литературы. Показано, что животным с экспериментальной патологией РАС свойственна стресс-индуцированная стереотипия с фризинговым поведенческим паттерном в новой незнакомой ситуации и смена поведенческих актов на повышение локомоторной активности в знакомой, ранее исследованной обстановке [9, 19]. Трифтазин (0,35 мг/кг) не улучшал показатели, регистрируемые в тесте «У-образный лабиринт».

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что трифтазин в дозе 0,35 мг/кг не уменьшает дефицит социального взаимодействия и не улучшает интеллектуальную продуктивность, но улучшает показатели ориентировочно-исследовательской активности за счёт снижения тревожности у крыс с фетальным вальпроатным синдромом.

Литература

1. IACAPAP Textbook of Child and Adolescent Mental Health. Autism spectrumdisorder 2015; 2: 1–38.
2. *Wallace S., Fein D., Rosanoff M., et al.* A global public health strategy for autism spectrum disorders. Autism Res. 2012; 5 (3): 211–217.
3. Психиатрия детского и подросткового возраста под ред. Гилберга К., Хеллгрена Л., рус. изд. / под общ. ред. акад. РАМН Сидорова П.И. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004; 544.
4. *Симашкова Н.В.* Эффективная фармакотерапия и реабилитация больных с расстройствами аутистического спектра. Неврология и психиатрия 2011; 3: 14–22.
5. *Шапошникова А.Ф.* Медикаментозное лечение при детском аутизме. Аутизм и нарушение развития. 2008; 3:43 –48.
6. *Doyle C.A., McDougle C.J.* Pharmacologic treatments for the behavioral symptoms associated with autism spectrum disorders across the lifespan. Dialogues Clin Neurosci. 2012; 14: 263–279.
7. *Венгеровский А.И.* Лекции по фармакологии для врачей и провизоров. М.: Физматлит. 2007; 3-е изд. 199 –210.
8. *Chomiak T., Turner N., Hu B.* What we have learned about autism spectrum disorder from valproic acid. Pathology Research International 2013; 2013: 712–758.
9. *Kerr D.M., Downey L., Conboy M., et al.* Alterations in the endocannabinoid system in the rat valproic acid model of autism. Behavioural Brain Research 2013; 249:124–132.
10. Gottfried C., Bambini-Junior V., Baronio D., et al. Valproic Acid in Autism Spectrum Disorder: From an Environmental Risk Factor to a Reliable Animal Model. In: Recent Advances in Autism Spectrum Disorders. InTech, Chapters published. 2013; 1. Ch.8.: 143–163.
11. *Silverman J.L., Yang M., Lord K., Crawley J.N.* Behavioral phenotyping assay for mouse models of autism. Nat Rev Neurosci. 2010;11 (7):490 –502.
12. *Foley A.G., Gannon S., Rombach-mullan N., et al.* Class I histone deacetylase inhibition ameliorates social cognition and cell adhesion molecule plasticity deficits in a rodent model of autism spectrum disorder. Neuropharmacology 2012;63(4):750–760.
13. *Ingram J.L., Peckham S.M., Tisdale B., Rodier P.M.* Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. Neurotoxicology and Teratology 2000; 22: 319–324.
14. *Crawley J.N.* Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews 2004; 10: 248–58.
15. *Kaidanovich-Beilin O., Lipina T., Vukobradovic I., Roder J., Woodgett J.R.* Assessment of Social Interaction Behaviors. J. Vis. Exp. 2011; 48: 2473.
16. *Островская Р.У., Раевский К.С., Воронина Т.А. и др.* в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» Часть 1, Москва, изд-во «Гриф и К» ФГБУ «НЦЭМСП» Минздравсоцразвития России, 2012; 251–263.
17. *Калинина Т.С., Шимширт А.А., Кудряшов Н.В. и др.* Нейростероидогенез и ориентировочно-исследовательское поведение грызунов. Экспер. и клин. фармак. 2014; 77 (2): 3–7.
18. *Yusuf S, Adelaiye A, Agunu A.* Effect of Ziziphus mauritiania (L.) seed extracts on spatial recognition memory of rats as measured by the Y-maze test. Journal of Natural Products. 2009; 2: 31–39.
19. *Iwata K., Izumo N., Matsuzaki H., et al.* Vldlr overexpression causes hyperactivity in rats. Molecular Autism 2012; 3: 11.

Исследование острой токсичности Тропоксина

Сорокина А.В., Алексеева С.В., Мирошкина И.А.

Лаборатория лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

Резюме. Определялись переносимые, токсические и летальные дозы нового оригинального противомигреневого лекарственного средства Тропоксина в таблетированной форме при однократном пероральном и внутрибрюшинном введении беспородным белым мышам и крысам. Регистрировались сроки развития интоксикации и гибели животных с подробным описанием наблюдаемой клинической картины. Были определены среднелетальные дозы: LD_{50} = 759 (645–893) мг/кг у самок мышей, LD_{50} = 864 (764–977) мг/кг у самцов мышей при внутрибрюшинном введении; LD_{50} = 1152 (686–1932) мг/кг у самок мышей, LD_{50} = 1006 (605–1673) мг/кг у самцов мышей при пероральном введении; LD_{50} = 490 (400–601) мг/кг у самок крыс, LD_{50} = 515 (507–524) мг/кг у самцов крыс при внутрибрюшинном введении. Тропоксин при пероральном введении крысам вплоть до дозы 5 г/кг не вызывал гибели животных. Установлено, что Тропоксин в таблетированной форме при пероральном и внутрибрюшинном введении является малотоксичным и по классификации *Сидорова К.К.* (1973 г.) относится к 4 классу токсичности.

Ключевые слова: Тропоксин, острая токсичность, мыши, крысы

Study of acute toxicity of the drug Tropoxin

Sorokina A.V., Alekseeva S.V., Miroshkina I.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. It was determined endurable, toxic and fatal doses of a new original anti-migraine medicine Tropoxin in tablet form at unitary oral and intraperitoneal introduction to outbreeding white mice and rats. Periods of intoxication and death of animals with a detailed description of the observed clinical picture were registered. The median fatal doses were identified: LD_{50} = 759 (645 – 893) mg/kg in female mice, LD_{50} = 864 (764 – 977) mg/kg in male mice at intraperitoneal introduction; LD_{50} = 1152 (686 – 1932) mg/kg in female mice, LD_{50} = 1006 (605 – 1673) mg/kg in male mice at oral introduction; LD_{50} = 490 (400 – 601) mg/kg in female rats, LD_{50} = 515 (507 – 524) mg/kg in male rats at intraperitoneal introduction. Tropoxin did not cause death of rats at oral introduction in a dose of up to 5 g/kg. It was determined that Tropoxin in tablet form at oral and intraperitoneal introduction concerns to low-toxic substances. According to classification Sidorov K.K. Tropoxin in tablet form may be related to 4th toxicity class.

Keywords: Tropoxin, acute toxicity, mice, rats

Автор, ответственный за переписку:

Мирошкина Ирина Александровна — научный сотрудник ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; e-mail: iris10.81@mail.ru

Введение

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» синтезировано новое оригинальное фармакологически активное соединение Тропоксин (3-(3,4,5-триметоксибензоилоксиимино)-8-метил-8-азабицикло [1, 2, 3] октана гидрохлорид).

Тропоксин является антагонистом серотонина и перспективным лекарственным средством для клинического использования при лечении мигрени. В ходе доклинических исследований данное соединение проявляло антисеротониновую активность в дозах 10 мг/кг при внутривенном введении и 20 мг/кг при пероральном введении [2, 3]. Оценка острой токсичности является необходимым этапом доклинического исследования безопасности таблетированной формы Тропоксина.

Цель исследования

Целью настоящей работы явилось изучение острой токсичности Тропоксина. В ходе работы было необходимо определить переносимые, токсические и летальные дозы Тропоксина, а также установить выраженность его токсического действия и переносимость при однократном пероральном и внутрибрюшинном введении, зарегистрировать сроки развития интоксикации и гибели животных с подробным описанием наблюдаемой клинической картины [6].

Материалы и методы

В исследовании использовали таблеточную массу (ТРН), предназначенную для формирования таблеток Тропоксина 50 мг. Каждые 100 г массы содержали Тропоксин 62,5 г; крахмал картофельный 25,25 г; кальция фосфат двузамещённый 11,25 г; магния стеарат 1 г.

ТРН был произведён в опытно-технологическом отделе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (серия 040914).

Из таблеточной массы готовили суспензию *ex tempore* дисперсионным методом на 1% растворе крахмала. Эксперименты проводили на белых беспородных мышах (n = 132, масса 18–20 г) и белых беспородных крысах (n = 90, масса 180–200 г) обоего пола. Животные содержались в виварии в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Мышей и крыс случайным образом распределяли в опытные и контрольные группы после предварительного 5-дневного карантина и осмотра, исключающего использование в эксперименте больных

и травмированных животных [1, 6, 7]). ТРН вводили однократно в максимально возможных объёмах перорально с помощью металлического атравматического зонда и внутрибрюшинно с помощью одноразовых шприцов. ТРН вводили в дозах: 500, 1 000, 1 500, 2 000 и 3 000 мг/кг (пероральное введение мышам); 500, 800, 900 и 1 000 мг/кг (внутрибрюшинное введение мышам); 5 г/кг (пероральное введение крысам); 400, 500, 600, 700 и 800 мг/кг (внутрибрюшинное введение крысам). В качестве контроля вводили 1% раствор крахмала однократно в максимально возможном объёме для каждого из способов введения и для каждого из видов животных [4]. Далее наблюдали за опытными и контрольными группами в течение 14 дней. В первые 8 ч после введения препарата каждая особь находилась в индивидуальной камере для непрерывного наблюдения, затем животных помещали в клетки группового содержания и осматривали ежедневно утром и вечером с целью выявления их возможной гибели, а также описания их общего состояния и особенностей поведения [5]. Массу тела животных определяли перед введением препаратов, далее в первую неделю эксперимента ежедневно, со второй недели наблюдения и до окончания эксперимента – еженедельно. Суточное потребление корма и воды фиксировали до введения препаратов, а также в первые, седьмые и четырнадцатые сутки эксперимента. Животных, павших в ходе эксперимента, вскрывали. По окончании эксперимента проводили эвтаназию и патологоанатомическое вскрытие всех выживших мышей и крыс [1].

Среднелетальные дозы LD_{50}, LD_{16}, LD_{84} определяли по методу Литчфилда и Уилкоксона [1] Статистическую обработку полученных данных по динамике массы тела и её прироста проводили следующим образом. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий проверяли с помощью критерия Левена для множественных сравнений. Так как распределение изучаемых данных значимо не отличалось от нормального, а дисперсии были гомогенны, то для определения статистической значимости изменений использовали параметрические методы. Для сравнения нескольких выборок применяли однофакторный дисперсионный анализ или дисперсионный анализ для повторного измерения с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Даннету. В случае сравнения двух выборок использовали *t*-критерий Стьюдента. Полученные результаты описывали с помощью средних арифметических и их стандартных ошибок. Различия считали статистически значимыми при $p \le 0{,}05$.

Результаты и их обсуждение

При внутрибрюшинном введении ТРН мышам регистрировали гибель части животных (табл. 1). Например, ТРН в дозе 500 мг/кг не вызывал гибели мышей. В дозе 1 000 мг/кг ТРН приводил к гибели 6 из 6

Таблица 1

Острая токсичность ТРН при внутрибрюшинном введении беспородным белым мышам

Мыши самки			Мыши самцы		
доза мг/кг	число погибших животных	число животных в группе	доза мг/кг	число погибших животных	число животных в группе
500	0	6	500	0	6
800	3	6	800	1	6
900	5	6	900	4	6
1 000	6	6	1 000	5	6

Таблица 2

Острая токсичность ТРН при пероральном введении беспородным белым мышам

Мыши самки			Мыши самцы		
доза мг/кг	число погибших животных	число животных в группе	доза мг/кг	число погибших животных	число животных в группе
500	1	6	500	0	6
1 000	3	6	1 000	4	6
1 500	3	6	1 500	4	6
2 000	4	6	2 000	5	6
3 000	6	6	3 000	6	6

Таблица 3

Острая токсичность ТРН при внутрибрюшинном введении беспородным белым крысам

Крысы самки			Крысы самцы		
доза мг/кг	число погибших животных	число животных в группе	доза мг/кг	число погибших животных	число животных в группе
400	0	6	400	0	6
500	4	6	500	1	6
600	5	6	600	2	6
700	6	6	700	4	6
–	–	–	800	6	6

животных в группе у самок и 5 из 6 животных в группе у самцов. Были рассчитаны среднелетальные дозы: у самок LD_{50} составила 759 (645–893) мг/кг, LD_{16} – 658 (648–668) мг/кг, LD_{84} – 877 (863–891) мг/кг. У самцов LD_{50} составила 864 (764–977) мг/кг, LD_{16} – 716 (709–727) мг/кг, LD_{84} – 1043 (1032–1054) мг/кг.

При пероральном введении ТРН мышам в указанных дозах также регистрировали гибель части животных (табл. 2). Например, ТРН в дозе 500 мг/кг вызвал смерть только 1 из 6 животных в группе самок, и не вызывал гибели в группе самцов. В дозе 3 000 мг/кг ТРН

приводил к 100% смертности у самок и у самцов. Были определены среднелетальные дозы: у самок LD_{50} составила 1152 (686–1932) мг/кг, LD_{16} – 521 (369–737) мг/кг, LD_{84} – 2545 (1800–3598) мг/кг. У самцов LD_{50} составила 1006 (605–1673) мг/кг, LD_{16} – 533 (413–688) мг/кг, LD_{84} – 1901 (1473–2453) мг/кг.

При внутрибрюшинном введении ТРН крысам также регистрировали гибель части животных (табл. 3). Например, ТРН в дозе 400 мг/кг не вызывал гибели крыс. Гибель 100% животных регистрировали при введении ТРН в дозе 700 мг/кг (самки крыс) и 800 мг/кг (самцы крыс). Были определены среднелетальные дозы: у самок LD_{50} составила 490 (400–601) мг/кг, LD_{16} – 410 (396–424) мг/кг, LD_{84} – 587 (567–608) мг/кг. У самцов LD_{50} составила 515 (507 – 524) мг/кг, LD_{16} – 621 (535 – 721) мг/кг, LD_{84} – 749 (736–761) мг/кг.

В ходе эксперимента у животных, подвергнутых обработке, развивалась сходная клиническая картина: после введения ТРН наблюдалось снижение двигательной активности, дыхание становилось сначала частым

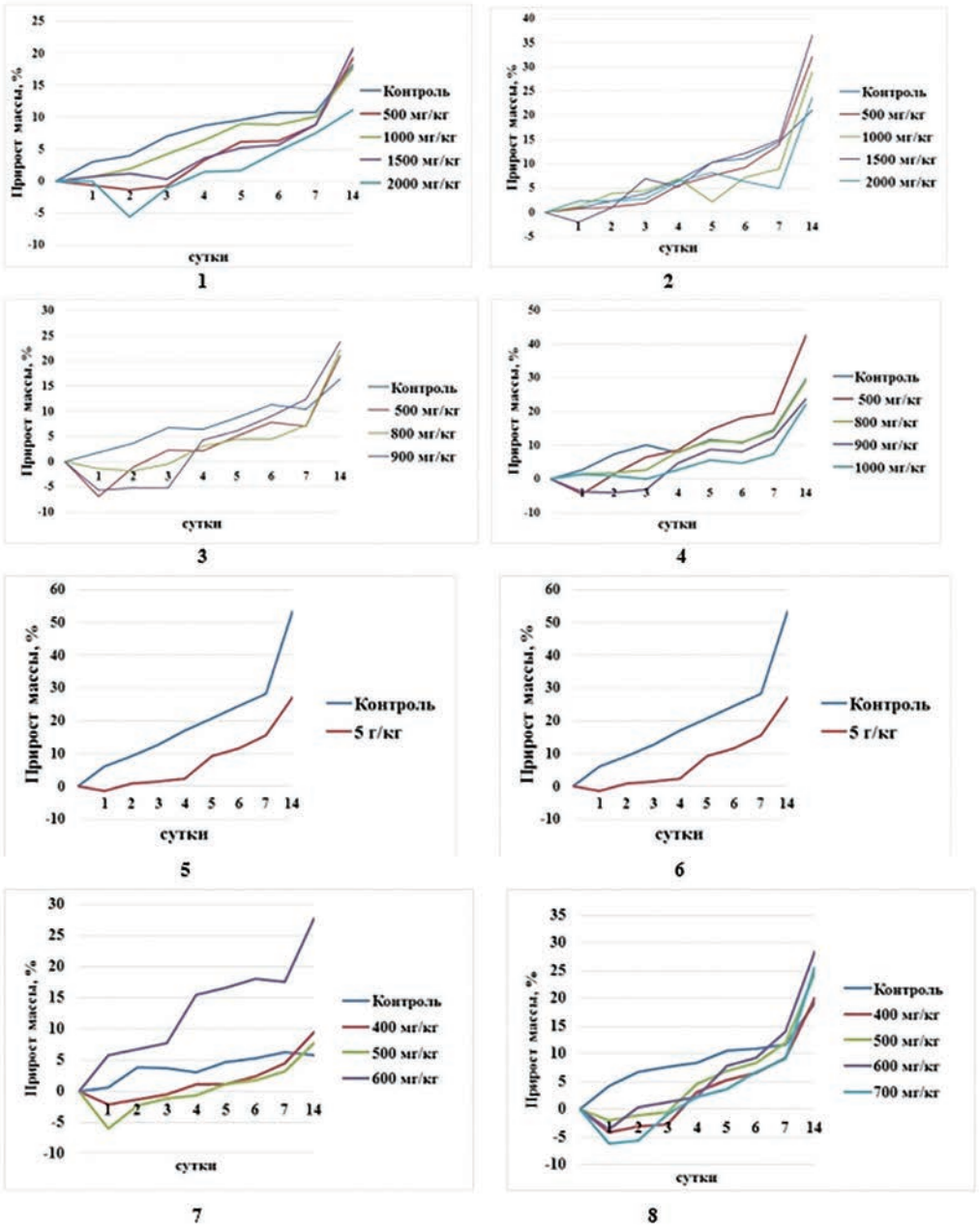


Рис. 1. Динамика прироста массы тела (%) у экспериментальных животных при исследовании острой токсичности ТРН

Примечание: 1 – мыши самки после перорального введения; 2 – мыши самцы после перорального введения; 3 – мыши самки после внутрибрюшинного введения; 4 – мыши самцы после внутрибрюшинного введения; 5 – крысы самки после перорального введения; 6 – крысы самцы после перорального введения; 7 – крысы самки после внутрибрюшинного введения; 8 – крысы самцы после внутрибрюшинного введения

и поверхностным, далее глубоким и судорожным. У большинства особей отмечали тремор, нетипичное вынужденное положение, наличие рефлекса Штрауба. При внутрибрюшинном способе введения для обоих видов животных было характерно втягивание живота. Гибель мышей наступала через 4–14 мин от начала эксперимента после приступа тонико-клонических судорог.

Гибель крыс наступала через 10–40 мин от начала эксперимента после приступа тонических судорог.

При пероральном введении крысам в максимально возможном объёме и максимально возможной концентрации для данного способа введения в дозе 5 г/кг ТРН не вызывал гибели животных, вследствие чего определение средней смертельной дозы не представлялось возможным. После введения препарата наблюдалось снижение двигательной активности, повышенная реакция на звуковые раздражители (вздрагивание, подпрыгивание на месте), частое и поверхностное дыхание (у одной самки в группе – глубокое и судорожное), тремор. Клиническая картина была менее тяжёлой, чем у животных других групп (мыши после перорального введения, мыши и крысы после внутрибрюшиного введения), рефлекса Штрауба не было выявлено.

Большинство выживших после внутрибрюшинного введения ТРН мышей и крыс при перемещении в клетки группового содержания активны, возбудимы, на тактильный контакт реагировали вокализацией. Оставшиеся в живых после перорального введения препарата мыши и крысы были гиперактивны и агрессивны не только при перемещении их в клетки группового содержания, но и в течение всех последующих 14 дней наблюдения. Следует подчеркнуть, что все выжившие животные активно потребляли корм и воду. Если в течение 1–3 суток после введения препарата в некоторых группах отмечали снижение массы тела у животных, то с 2–4 суток все животные прибавляли в массе тела (рис. 1).

Морфологическая картина, обнаруженная при патологоанатомическом вскрытии всех павших животных, которым перорально и внутрибрюшинно вводили ТРН в указанных дозах, была сходной и характеризовалась ярко выраженным нарушением кровообращения. Других патологических изменений органов и их систем не было обнаружено. Важно, что морфологическая картина внутренних органов при патологоанатомическом вскрытии выживших экспериментальных животных не отличалась от таковой, наблюдаемой у контрольных животных.

Таким образом, в результате проведённых экспериментов удалось установить, что ТРН при пероральном и внутрибрюшинном введении является малотоксичным лекарственным средством и по классификации *Сидорова К.К.* (1973 г.) может быть отнесён, соответственно, к 4 классу токсичности (101–1000 мг/кг).

Литература

1. *Беленький М.Б.* Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. М.: 1963.
2. *Ганьшина Т.С.* Разработка методологии поиска новых противомигреневых средств. Создание оригинального препарата – тропоксин. Автореферат дисс. докт. биол. наук. М.: 2004.
3. *Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Литвин А.А.* Оценка взаимосвязи между фармакокинетикой и фармакодинамикой тропоксина у крыс. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2016; 3: 21–25.
4. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (РД 64-126-91). М.: МЗ России, ФК, 1992; 45.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. Медицина. М.: 2005; 41–47.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Часть первая. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств. Изучение острой токсичности. Гриф и К. М: 2012; 15–17.
7. Guide for care and use of laboratory animals. National Academy press. Washington, D.C. 1996.

Харкевичу Дмитрию Александровичу

к 90-летию со дня рождения

От редакции

В этом году исполняется 90 лет крупному советскому и российскому фармакологу, почётному заведующему кафедрой фармакологии ФГБОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России академику РАН *Дмитрию Александровичу Харкевичу.*

Харкевич Д.А. родился 30 октября 1927 г. в Ленинграде в семье служащих. В 1951 г. окончил I Ленинградский медицинский институт и с этого времени работал в области фармакологии. В 1953 г. он защитил кандидатскую диссертацию, и в 1960 г. — докторскую. В 1963 г. был утверждён в звании профессора. С 1964 г. заведовал кафедрой фармакологии лечебного и санитарно-гигиенического факультетов I ММИ им. И.М. Сеченова. В 1967 г. был избран член-корреспондентом АМН СССР, а в 1984 г. — академиком АМН СССР.

Харкевич Д.А. является учеником выдающегося фармаколога академика АМН СССР В.В. Закусова. Во время обучения в институте *Харкевич Д.А.* начал свою научную деятельность и опубликовал две научные статьи. Основное направление исследований *Харкевича Д.А.* в области фармакологии связано с изучением вегетативных ганглиев, нервно-мышечных синапсов, афферентных систем и изучению противогистаминных средств. Данные этих исследований обобщены в монографии «Ганглионарные средства» (1962), изданной в Англии. В 1980 г. под редакцией *Харкевича Д.А.* была издана монография «Pharmacology of Ganglionic Transmission» (Springer-Verlag, FRG).

На основании исследований *Харкевича Д.А.* был предложен ганглиоблокатор короткого действия – гигроний, основные данные о котором обобщены в монографии «Новые курареподобные и ганглиоблокирующие средства» (1970).

Одним из важных итогов фундаментальных исследований *Харкевича Д.А.* является открытие значения гидрофобных взаимодействий для механизма действия и активности курареподобных средств. Наибольший интерес в этом направлении представляет создание первого антидеполяризующего курареподобного препарата короткого действия – диодония.

Под руководством *Харкевича Д.А.* были также внедрены в медицинскую промышленность два оригинальных антидеполяризующих препарата – анатруксоний и циклобутоний, разрешён для медицинского применения препарат пинокурин, характеризующийся высокой избирательностью курареподобного действия. Основные материалы этих исследований опубликованы в многочисленных монографиях *Харкевича Д.А.* (1969, 1970, 1973, 1983, 1986 гг.).

Значительный интерес представляют полученные им данные о возможности избирательного фармакологического выключения м-холинорецепторов сердца (анатруксонием, диодонием, диазолином). Это свидетельствует о неодинаковой морфофункциональной организации м-холинорецепторов разной локализации, что представляет существенный теоретический интерес и открывает перспективы создания препаратов, эффективных при нарушениях ритма сердца, связанных с повышенным тонусом блуждающего нерва.

Большое внимание *Харкевич Д.А.* уделял исследованиям афферентных систем. В частности, это связано с изучением влияния психотропных препаратов, средств для наркоза, анальгетиков, энкефалинов и других пептидов, курареподобных средств на межнейронное проведение возбуждения на разных уровнях спинокортикальных путей. При этом особое внимание уделяется проблеме обезболивания и сравнительной чувствительности к нейротропным веществам соматических и висцеральных афферентных путей.

Ряд работ *Харкевича Д.А.* посвящены изучению противогистаминной активности некоторых производных карболина. Одно из этих соединений (диазолин) внедрено в медицинскую практику.

Харкевич Д.А. неоднократно выступал с докладами на всесоюзных съездах, конференциях и симпозиумах, на международных конгрессах фармакологов.

Харкевич Д.А. опубликовал более 300 научных работ. За создание новых лекарственных препаратов получил более 30 авторских свидетельств и патентов.

Харкевич Д.А. проводит большую педагогическую работу. Под его руководством разработаны новые методы преподавания фармакологии, получившие распространение в большинстве медицинских вузов страны.

Харкевич Д.А. является автором учебника «Фармакология» для медицинских институтов, который многочисленно переиздавался, включая английский вариант учебника.

Значительное внимание *Харкевич Д.А.* уделяет подготовке кадров. За время заведования кафедрой фармакологии он подготовил более 40 докторов и кандидатов наук.

Харкевич Д.А. проводит большую научно-организационную работу. На протяжении многих лет он являлся председателем общества фармакологов нашей страны (в настоящее время почётный президент Российского общества фармакологов), экспертом ВОЗ, членом международного союза по изучению мозга, главным редактором журнала «Экспериментальная и клиническая фармакология» и членом ряда редколегий зарубежных изданий, в течение 6 лет был членом исполкома Международного союза фармакологов.

За успешную научную и педагогическую деятельность награжден многочисленными медалями, дипломами и грамотами. За монографию «Фармакология курареподобных средств» удостоен премии им. Н.П. Кравкова президиума АМН СССР.

Харкевич Д.А. избран членом ряда зарубежных обществ фармакологов.

Таким образом, все сказанное выше характеризует *Харкевича Д.А.* как активного и талантливого учёного, обогатившего медицинскую науку и здравоохранение важными научными трудами, внедрениями, активно готовящего кадры высококвалифицированных специалистов и успешно сочетающего научную работу с плодотворной педагогической, научно-организационной и общественной деятельностью.

Сердечно поздравляем *Дмитрия Александровича* со знаменательной датой и желаем ему здоровья и больших успехов!

Редколлегия журнала
«Фармакокинетика и фармакодинамика»

Основные темы для обсуждения:

1. Современные тренды научных разработок лекарственных средств
2. Лекарственные средства для персонализированной медицины
3. Адекватность биомоделей заболеваниям человека
4. Современные подходы к скринингу молекул-лидеров для таргетной терапии
5. Нормативно-правовые аспекты доклинических испытаний
6. Методы и программы доклинических испытаний
7. Проблемы клинических исследований
8. Актуальные вопросы организации клинических исследований
9. Администрирование клинических исследований в исследовательском центре
10. Клинические исследования в педиатрии
11. Пациентоориентированные технологии в клинических исследованиях
12. Производство фармацевтических субстанций и готовых лекарственных средств
13. Особенности регистрации лекарственных средств за рубежом, в ЕврАзЭС и России
14. Коммерциализация научных разработок лекарственных средств
15. Вызовы рынка лекарственных средств

Участие в конференции бесплатное

ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России
приглашает Вас принять участие в работе Всероссийской конференции: «Реальный путь от научных разработок до лекарственных средств», которая состоится **2 ноября 2017 г.**

Место проведения: РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, ул. Островитянова, д. 1

В рамках конференции планируется обсуждение актуальных вопросов разработки, доклинических и клинических исследований, производства и применения лекарственных средств с участием представителей регуляторных и экспертных органов, фармпроизводителей, контрактных исследовательских организаций, исполнителей научных, клинических и доклинических исследований.

Участникам конференции необходимо направить заявку на участие в конференции на электронный адрес

conf-rw@mail.ru

в срок **до 28.10.2017 г.**

Контакты оргкомитета: Отдел организации доклинических и клинических исследований РНИМУ им. Н.И. Пирогова, тел. (495) 434-36-23, koroleva_nv@rsmu.ru
Королева Наталья Владимировна