

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ОРИГИНАЛЬНЫХ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ
БИОМЕДИЦИНСКИХ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ»

На правах рукописи



Логвинов Илья Олегович

**ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ
ДИПЕПТИДНЫХ МИМЕТИКОВ BDNF *in vitro***

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Антипова Татьяна Алексеевна

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
2.1. Общая характеристика нейротрофинов.....	13
2.1.1. NGF.....	17
2.1.2. BDNF.....	19
2.1.3. NT-3.....	20
2.1.4. NT-4/5.....	21
2.1.5. NT-6.....	21
2.1.6. NT-7.....	21
2.1.7. Рецепторы нейротрофинов.....	22
2.2. Строение молекулы BDNF и его функции.....	27
2.3. Сигнальные пути, регулируемые комплексом BDNF-TrkB.....	30
2.4. Экспрессия BDNF.....	33
2.5. Роль BDNF в развитии патологических состояний мозга.....	38
2.6 BDNF в клинических исследованиях.....	42
2.7. Белки теплового шока.....	43
2.7.1. Регуляция экспрессии гемоксигеназы-1 (HSP32) в головном мозге.....	48
2.7.2 Функции гемоксигеназы-1 (HSP32) в головном мозге.....	49
2.8 Низкомолекулярные аналоги нейротрофинов.....	52
2.9 Конструирование пептидных миметиков BDNF.....	65
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	71
3.1 Материалы и методы исследования.....	71
3.2 Культивирование клеток.....	72
3.3 Подготовка культуральных планшетов.....	73

3.4	Рассев клеток на культуральные планшеты.....	73
3.5	Модель окислительного стресса.....	73
3.6	Методика оценки пролиферативной активности.....	74
3.7	Модель глутаматной токсичности.....	74
3.8	Моделирование болезни Паркинсона в культуре клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y.....	75
3.9	Методы оценки жизнеспособности нейронов в культуре.	75
3.10	Методика Вестерн-блот анализа.....	76
3.11	Статистическая обработка результатов	76
4.1	Изучение нейропротекторного действия ГСБ-104, ГСБ-106, ГСБ-207, ГСБ-214 и ГТС-201 на модели окислительного стресса в культуре гиппокампальных клеток линии НТ-22	78
4.2	Оценка влияния ГСБ-106, ГСБ-214 и ГТС-201 на пролиферацию нейронов линии НТ-22.....	85
4.3	Влияние пептидов ГСБ-106, ГСБ-214 и ГТС-201 на процесс фосфорилирования тирозинкиназы В (TrkB) в культуре нейронов линии НТ-22.....	88
4.4	Влияние димерных дипептидных миметиков ГСБ-106, ГСБ-214 и ГТС-201 на активацию PI3K/Akt-, MAPK/Erk-киназных путей и PLC γ в культуре нейронов линии НТ-22.....	91
4.5	Оценка нейропротекторных свойств ГСБ-106 на модели глутаматной токсичности в культуре гиппокампальных нейронов линии НТ-22.....	97
4.6	Оценка нейропротекторного эффект ГСБ-106 на клеточной модели болезни Паркинсона в культуре клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y	103

4.7 Оценка влияния ГСБ-106 на синтез нейропротекторного белка гемоксигеназы-1 в культуре нейронов линии НТ-22 на модели окислительного стресса.	106
4.8 Влияние ГСБ-106 на содержание фактора роста нервов NGF в культуре клеток линии НТ-22.	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	111
5.1 Заключение	111
5.2 Практические рекомендации	112
ВЫВОДЫ.....	113
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	116

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Экспериментальный и клинический опыт, накопленный со времени открытия фактора роста нервов в 1951 году демонстрируют, что нейротрофины способствуют дифференцировке и поддержанию жизнеспособности периферических и центральных нейронов, а также участвуют в регуляции синаптических связей [60]. Фундаментальными исследованиями установлено, что нейротрофины играют важную патогенетическую роль в развитии нейродегенеративных заболеваний, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона, хорею Хантингтона, рассеянный склероз, последствий острого и хронического нарушений мозгового кровообращения, черепно-мозговой травмы, а также психических заболеваний, включая депрессию, биполярные расстройства и шизофрению [13]. Очевидной является целесообразность разработки фармакологических подходов, включающих как регуляцию содержания и синтеза нейротрофинов, так и моделирование их эффектов.

Одним из представителей семейства нейротрофинов является мозговой нейротрофический фактор (BDNF). BDNF связывается с TrkB рецептором, вызывает его димеризацию, аутофосфорилирование и активацию ряда сигнальных путей, включая фосфатидилинозитол-3 киназный (PI3K/Akt), митоген-активируемый протеинкиназный (MAPK/Erk) сигнальный путь и фосфолипазу C гамма (PLC γ) [148]. Активация PI3K/Akt способствует выживанию нейронов. MAPK/Erk-киназный путь контролирует в основном деление и дифференцировку клеток, а также вовлечен в антидепрессивные эффекты BDNF [85]. Каскад PLC γ регулирует синаптическую пластичность [172]. Фармакологическое использование BDNF ограничено его низкой способностью проникать через гистогематические барьеры, быстрой деградацией и наличием нежелательных побочных эффектов [4]. Интравентрикулярный и субарахноидальный пути введения BDNF достаточно сложны для медицинской практики, небезопасны, и могут вызвать иммунные

реакции. Поэтому актуальным является поиск малых молекул, к критериальным факторам которых следует отнести прохождение через гистогематические барьеры, взаимодействие со специфическим TrkB рецептором, активацию основных пострецепторных сигнальных путей и отсутствие побочных эффектов, характерных для полноразмерного нейротрофина.

Степень разработанности проблемы

В настоящее время за рубежом ряд исследовательских групп разрабатывает низкомолекулярные миметики BDNF. Так, группа австралийских исследователей сконструировала ряд миметиков на основе петель BDNF: мономерные моноциклические пептиды с антагонистической активностью на основе 1-й, 2-й и 4-й петель [50]; димерные бициклические и трициклические пептиды на основе 2-й петли с агонистической активностью; циклопентапептид на основе трипептидного фрагмента 4-й петли -Lys-Lys-Arg-, созданный как лиганд для рецептора p75 и усиливающий выживаемость сенсорных нейронов *in vitro*, и его липофильные производные [51].

Группой американских исследователей [120] путем вставки фрагментов BDNF в структуру NGF выявлен участок 2-й петли, -Ser-Lys-Gly-Gln-Leu-, вовлеченный в специфичное взаимодействие BDNF с TrkB. На основе этой структуры была высказана фармакофорная гипотеза, методом виртуального скрининга проверено 35 миллионов описанных соединений, выявлено 1785 соединений-кандидатов, число которых было уменьшено до 14 на основе критериев молекулярной массы и доступности фармакофорной части для взаимодействия с рецептором. Из этих 14 соединений 7 были коммерчески доступными. После тестирования *in vitro* на клеточных моделях отобрано одно соединение на основе 1,3,5-бензолтрикарбоновой кислоты (LM22A-4). Для последнего при интраназальном введении была показана способность восстанавливать пространственную память у крыс, нарушенную травмой мозга.

Группа исследователей из Нью-Йоркского государственного института фундаментальных исследований нарушений развития [27] получила 5 терапевтически перспективных амидов N-ацетилтетрапептидов, соответствующих последовательностям 6-9, 71-74, 94-97, 72-75, 115-118 BDNF человека. Все пептиды вызывали умеренную активацию TrkB-рецептора. Наиболее активными были пептиды B3 и B5, которые работали как частичные агонисты/антагонисты BDNF. Авторы делают вывод, что эти пептиды более перспективны как лекарственные препараты, чем димерные циклические пептиды Хьюза (Hughes), поскольку имеют меньший молекулярный вес и могут легче проникать через биологические барьеры, и более перспективны, чем непептидные миметики Лонго (Longo), так как метаболизируются до природных аминокислот.

Группа американских ученых из медицинской школы университета Эмори [76] провела *in vitro* скрининг 2000 соединений из базы биологически активных соединений Spectrum Collection Library по критерию способности поддерживать опосредованную TrkB выживаемость клеток, в результате наиболее активным соединением оказался 7,8-дигидроксифлавонол (7,8-DHF). В настоящее время этот миметик BDNF находится на стадии расширенных фармакологических исследований в качестве потенциального лекарственного средства с нейропротекторным и антидепрессивным эффектами.

В лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» под руководством д.б.н., профессора, член-корр. РАН Татьяны Александровны Гудашевой были сконструированы синтезированы дипептидные миметики 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF на основе гипотез о том, что фармакофорными участками нейротрофинов являются β -изгибы их шпилькообразных петель и о связи разных петлеобразных структур нейротрофинов с их разными функциями [3]. Дипептидные миметики имеют наименьший молекулярный вес среди всех возможных миметиков BDNF пептидной природы.

Цель и задачи

Целью данной работы явилось исследование нейропротекторных свойств дипептидных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF *in vitro*, активации TrkB рецептора и его основных пострецепторных сигнальных путей.

Для достижения поставленной цели необходимо выполнить ряд задач:

1. Изучить нейропротекторное действие дипептидных миметиков 1-й (ГСБ-207, ГСБ-214), 2-й (ГТС-201) и 4-й (ГСБ-106, ГСБ-104) петель BDNF на модели окислительного стресса в культуре гиппокампальных клеток линии HT-22.
2. Исследовать влияние на пролиферацию гиппокампальных клеток линии HT-22 наиболее активных миметиков.
3. Оценить влияние наиболее активных миметиков на активацию специфического тирозинкиназного рецептора BDNF – TrkB и его пострецепторных сигнальных путей PI3K/Akt, MAPK/Erk и PLC γ *in vitro*.
4. Исследовать нейропротекторное действие соединения-лидера в условиях глутаматной токсичности на культуре гиппокампальных нейронов линии HT-22 и 6-гидроксидофаминовой нейротоксичности на клетках нейробластомы человека линии SH-SY5Y.
5. Оценить влияние соединения-лидера на индуцированный окислительным стрессом синтез протекторного белка теплового шока гемоксигеназы-1 (HSP32) в культуре нейронов линии HT-22.
6. Исследовать влияние соединения-лидера на содержание фактора роста нервов NGF в культуре гиппокампальных нейронов линии HT-22.

Научная новизна

Изучено нейропротекторное действие оригинальных дипептидных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF и показано, что для проявления нейропротекторной активности необходима димерная структура пептида. Впервые доказано, что для фосфорилирования специфического тирозинкиназного рецептора TrkB, сопоставимого с действием нативного нейротрофина, достаточно взаимодействия рецептора с димерной дипептидной структурой 1-й, 2-й или 4-й петли BDNF. Впервые доказана селективная активация пострецепторных путей передачи сигнала при активации рецептора миметиками 1-й, 2-й, 4-й петель BDNF. Так, миметик 1-й петли ГСБ-214 активирует только PI3K/Akt-киназый и PLC γ и не активирует MAPK/Erk-киназый путь; миметик 2-й петли – активирует MAPK/Erk-киназый путь и PLC γ , но не влияет на фосфорилирование PI3K/Akt-киназного пути; миметик 4-й петли, подобно полноразмерному BDNF, активирует три основных пострецепторных сигнальных пути PI3K/Akt-, MAPK/Erk-киназый и PLC γ . В совокупности, эти данные впервые демонстрируют степень выраженности нейропротекторных свойств в зависимости от структуры миметиков BDNF и дифференциальной активации сигнальных путей.

Впервые установлено, что миметик 4-й петли BDNF, подобно последнему, предотвращает гиперэкспрессию белка теплового шока гемоксигеназы-1 (HSP32), индуцированную окислительным стрессом. Показано, что дипептидный димерный миметик 4-й петли обладает однонаправленным с BDNF действием на содержание другого нейротрофина – фактора роста нервов.

Теоретическая и практическая значимость работы

На основании полученных результатов сформулированы научные положения о перспективности разработки соединения ГСБ-106 в качестве оригинального фармакологического средства, обладающего

нейропротекторными свойствами. Выполнены поисковые исследования, результаты которых позволили начать доклинические исследования ГСБ-106 в качестве антидепрессанта с нейропротекторными свойствами. Установленные свойства ГСБ-106 определяют возможность разработки новой стратегии лечения нейродегенеративных патологий на основе димерных дипептидных миметиков нейротрофинов. Пептидная природа обеспечивает уникально высокий уровень безопасности применения соединений данного класса.

Методология и методы исследования

Методология проведенного исследования основана на методических подходах научных фундаментальных и прикладных исследований отечественных и зарубежных авторов с применением клеточных технологий и биохимических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. Нейропротекторная активность дипептидных миметиков BDNF.
2. Влияние миметиков 1-й, 2-й, 4-й петель BDNF на пролиферацию клеток.
3. Активация TrkB рецептора димерными дипептидными миметиками BDNF.
4. Селективная активация сопряженных с TrkB рецепторами сигнальных путей трансдукции димерными дипептидными миметиками разных петель BDNF.
5. Участие антиоксидантной системы защиты клетки и регуляции содержания эндогенных нейротрофинов в цитопротекторных эффектах ГСБ-106.
6. Миметик 4-й петли BDNF (ГСБ-106) - потенциальный наиболее эффективный нейропротектор в ряду миметиков BDNF по результатам исследований *in vitro*.

Степень достоверности

Работа выполнена на большом экспериментальном материале с использованием адекватных методов исследования. Достоверность представленных в работе результатов подтверждается достаточной величиной и однородностью выборок объектов эксперимента. Статистическая обработка данных проводилась современными методами математической статистики.

Апробация работы

Основные результаты и положения диссертации были представлены: на 5-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Москва, 2010); на научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2010); на 11-ой международной конференции ECNP (Санкт-Петербург, 2011); на 19-ом всемирном конгрессе по болезни Паркинсона и связанным с ним расстройствам (Шанхай, Китай, 2011);) на 28-ом международном конгрессе CINP (Стокгольм, Швеция, 2012); на IV съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 2012); на первой всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (Москва, 2013); на 27-ом конгрессе ECNP (Берлин, Германия, 2014); на 28-ом конгрессе ECNP (Амстердам, Нидерланды, 2015); на всероссийской конференции молодых ученых «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2015); на 6-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Москва, 2015); на V съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (Ярославль, 2018); на 31-ом конгрессе ECNP (Барселона, Испания, 2018); на всероссийской конференции молодых ученых «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2018); на 32-ом конгрессе ECNP (Копенгаген, Дания, 2019) .

Личный вклад соискателя

Автор непосредственно участвовал в получении исходных данных, анализе, систематизации и апробации полученных результатов, публикации их в научных изданиях, докладах на отечественных и международных конференциях, в формулировании теоретических положений и выводов. Автором лично выполнена экспериментальная часть и написание диссертации.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 21 печатная работа, в том числе 8 статей в научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 12 тезисов в материалах российских и международных конференций и симпозиумов и 1 патент.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа объемом 147 страниц машинописного текста состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов и библиографического списка использованной литературы, включающего 213 источников, в том числе 210 зарубежных. Работа содержит 3 таблицы и 34 рисунка.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Общая характеристика нейротрофинов.

Нейротрофины - семейство структурно связанных, секретируемых белков нервной ткани, регулирующих выживание, дифференцировку и поддержание функций различных популяций периферических и центральных нейронов [157]. Нейротрофины образуются из предшественников, которые соответствующе изменяются и секретируются во внешнюю клеточную среду в виде зрелых гомодимерных белков.

Нейротрофины имеют важное значение в развитии и сохранении структур центральной и периферической нервной системы. Среди большого количества свойств нейротрофинов, одним из основных является их участие в функционировании мозга в норме и патологии. Главным считается их участие в контроле процессов физиологического развития нейронов и сохранения структурной и функциональной целостности нервных клеток. Значительную роль нейротрофины играют в нейродеструктивных процессах, связанных с некрозом и апоптозом.

Одной из главных функций нейротрофинов является их способность противостоять окислительному стрессу и апоптозу («программируемой смерти» клетки). Нейротрофины также участвуют в регуляции нейрогенеза, образовании из стволовых нейрональных предшественников новых клеток [209].

Нейротрофины также могут регулировать рост аксонов и дендритов, формирование, созревание и стабилизацию синапсов. В зрелой нервной системе нейротрофины регулируют как краткосрочную синаптическую передачу, так и долговременное потенцирование, участвуя, таким образом, в обеспечении пластичности нервной системы, необходимой для ее нормального функционирования.

Семейство нейротрофинов представлено следующими структурно сходными белками:

- фактор роста нервов, nerve growth factor, NGF [102];
- нейротрофический фактор мозга, brain-derived neurotrophic factor, BDNF [99];
- нейротрофин-3, neurotrophin-3, NT-3 [45, 68, 115, 158];
- нейротрофин-4/5, neurotrophin-4/5, NT-4/5 [64];
- нейротрофин-6, neurotrophin-6, NT-6 [61];
- нейротрофин-7, neurotrophin-7, NT-7 [93, 133].

Кроме того, семейство нейротрофических факторов включает также фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor – FGF), инсулинзависимые факторы роста 1 и 2 (insulin-like growth factors – IGFs), глиальные нейротрофические факторы (glial cell line derived neurotrophic factor – GDNF). Все эти факторы увеличивают уровень жизнедеятельности и функционирования клеток. Нейротрофины, обнаруженные в головном мозгу, обеспечивают рост отростков нейронов, обладают нейропротекторным действием, участвуют в процессе нейропластичности.

Нейротрофины широко представлены в структурах мозга, однако, существует некоторая специфичность распределения в субпопуляциях нейронов. Наибольший уровень возможной экспрессии нейротрофинов (мРНК NGF, мРНК NT-3 и мРНК BDNF) выявлен в гиппокампе мышей, экспрессия BDNF в этой структуре мозга в 50 раз выше, чем остальных нейротрофинов. В онтогенезе происходят колебания уровней нейротрофинов, в частности резкое снижение исходно высокого уровня NT-3 и увеличение BDNF. Нейротрофины секретируются в синапсах. Выявлено соотношение секреторных гранул в дендритах, где больше содержится BDNF и NT-3 и меньше – NT-4 и NGF. Для этих нейротрофинов установлена их локализация в глутаматергических синапсах. BDNF активирует механизмы, регулирующие

индукцию, поддержку ранней и поздней фаз долговременной потенциации мембраны (LTP – Long Term Potentiation) [209].

Основой структуры всех нейротрофинов, позволяющей относить их в одно семейство, являются следующие черты:

1. предполагаемый сигнальный пептид, следующий за инициаторным кодоном [45, 68, 99]
2. про-регион, включающий N-связанный сайт гликозилирования и сайт протеолитического расщепления фуриновыми протеазами [26, 168]
3. трехмерная структура, образованная двумя парами антипараллельных β -слоев и шестью остатками цистеина, которые формируют три дисульфидных мостика [12, 125]

Нейротрофины представляют собой гомодимеры, которые состоят из двух идентичных субъединиц, приблизительно по 120 аминокислотных остатков, связанных гидрофобными взаимодействиями. Рентгеноструктурные исследования, проведенные для гомодимера NGF [124] и для гетеродимера BDNF/NT-3 [153] выявили единую трехмерную структуру нейротрофинов, которая также характерна для других ростовых факторов (transforming growth factor β 2 и др.), что свидетельствует об общности происхождения. Все они содержат экспонированные в воду структурные элементы, получившие название петель 1, 2, 3 и 4 и представляющих собой шпилькообразные структуры, три из которых имеют бета-поворотные участки на концах (так называемые участки A- A", A'''-B и C-D, петли 1,2,4) и один участок, состоящий из трех последовательных реверсных поворотов (названный участком B-C, петля 3). Считается, что именно шпилькообразные структуры ответственны за специфическое связывание с определенным типом нейротрофиновых рецепторов.

Имеются также переменные домены, которые определяют специфичность отдельных членов семейства. Эти сходства и различия отражаются также в распределении, клеточной локализации и регуляции экспрессии нейротрофинов в ходе развития организма.

Наиболее изучены NGF и BDNF [79]. Первым из нейротрофических факторов был обнаружен NGF.

Основными мишенями для NGF являются холинэргические нейроны переднего мозга, играющие значительную роль в таких функциях, как внимание, обучение, память; холинэргические нейроны стриатума, вовлеченные в контроль движения [57, 119, 127]; чувствительные нейроны и большинство нейронов симпатической нервной системы [60, 102].

Для BDNF – дофаминэргические нейроны черной субстанции, холинэргические нейроны переднего мозга, серотонинэргические нейроны коры, ГАМКэргические нейроны стриатума, гранулярные нейроны мозжечка; мотонейроны, нейроны ресничного ганглия; нейроны спинномозговых узлов (DRG, dorsal root ganglion); периферические чувствительные нейроны

Для NT-3 – холинэргические нейроны лобной доли, холинэргические нейроны гипоталамуса, нейроны коры головного мозга, система проприорецепторов, мышечные веретена, нейроны слуховых ядер, клетки глии;

Для NT-4/5 – α -мотонейроны, нейроны ресничного ганглия, чувствительные нейроны [38].

Для NT-6 и NT-7 мишени не определены [79].

Нейротрофины позиционируются как факторы, регулирующие развитие, дифференцировку и выживание нейронов. К этим соединениям относится понятие *нейротрофичности*, которое формулируется как *комплекс биохимических и физиологических процессов, способствующих*

функциональному сохранению структур мозга. Понятие нейротрофичности включает:

- Нейропластичность
- Нейропротекцию
- Нейрогенез

Эти факторы позволяют нейротрофинам проявлять защитные свойства от окислительного стресса, апоптоза и других форм нейрональной деструкции. Функции нейротрофических факторов в мозге охватывают большой спектр процессов, что позволяет говорить о *плейотропности* этих соединений [7].

2.1.1. NGF

NGF был открыт и впервые исследован в 1951 году (R. Levi-Montalcini) и представляет собой димер, содержащий две идентичные субъединицы по 118 аминокислотных остатков, с молекулярным весом около 26 кДа. Выявлено, что предшественник нейротрофина может оказывать влияние на физиологическое состояние нервной клетки. Содержание пре-NGF значительно увеличивается с возрастом, и эта структура обладает нейротоксическими свойствами. Пре-NGF, соединяясь с регуляторным белком сортилином, стимулирует каскад реакций, приводящих к апоптозу. Содержание сортилина в нейронах старых животных заметно увеличено, что делает эти клетки более уязвимыми к действию пре-NGF. В постмортальном материале в мозге старых людей и пациентов болезни Альцгеймера обнаружено повышенное содержание пре-NGF [10]. Многие ненейрональные клетки синтезируют NGF, в частности эпителиальные клетки, фибробласты, лимфоциты и макрофаги. Фактор обнаруживается в клетках нервной, иммунной и эндокринной систем, что может говорить о его существенной роли в регуляции гомеостаза. В ЦНС высокая концентрация NGF обнаружена в крупных холинергических нейронах преимущественно базальных структур

переднего мозга, в гиппокампе, неокортексе, обонятельной луковице. Фактор стимулирует дифференцировку клеток и поддерживает их жизнеспособность в холинергических участках ЦНС, в основном в базальных ядрах переднего мозга и в полосатом теле. Выявлена защитная роль NGF в отношении симпатических сенсорных и холинергических нейронов. Также NGF стимулирует синтез ферментов, вовлеченных в метаболизм катехоламинов и нейрон-специфических пептидов, таких как вещество P, соматостатин и холецистокинин. Эта регуляторная функция NGF осуществляется не только в период нейрональной дифференцировки, но также является важным звеном поддержания нейрональной активности взрослых организмов.

Одной из важных функций NGF является участие в регуляции ретроградного транспорта медиаторов и белков в нейроне. Запускаемая с уровня лиганд-рецептор молекулярная цепочка проводит сигнал от терминальной части аксона к телу нейрона. Установлено, что уровень NGF мРНК в различных отделах коррелирует со степенью холинергической иннервации переднего мозга. В некоторых случаях нейрональная дегенерация, как следствие нарушения холинергической иннервации, связывается с нарушенным ретроградным транспортом нейротрофинов [209].

Обнаруживаемые в поврежденных структурах ЦНС клетки иммунной системы продуцируют различные нейротрофины, которые, соответственно, активируют тирозинкиназные рецепторы *trk-A*, *trk-B*, *trk-C*. Увеличенный синтез NGF и других нейротрофических факторов, тормозит проявление нейроиммунологических воспалительных процессов [188]. Аутоиммунная защита рассматривается как возможный терапевтический подход в регуляции баланса иммунных и нейротрофических факторов в различных формах нейрональных расстройств [178].

Было показано, что NT-3 и BDNF, вовлеченные в процессы нейродеструкции, поначалу промотируют некроз, защищая затем оставшиеся

клетки от развивающегося апоптоза. NGF, наоборот, препятствует обеим формам гибели клеток. [128].

2.1.2. BDNF

Мозговой нейротрофический фактор (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF) является членом семейства нейротрофинов, структурно гомологичных более чем на 50% полипептидных ростовых факторов, включающего в себя также фактор роста нервов (Nerve Growth Factor, NGF), нейротрофин-3 (Neurotrophin-3, NT-3) и нейротрофин-4 (Neurotrophin-4, NT-4). BDNF был впервые описан в 1982 году [18] после выделения из экстракта головного мозга свиньи фактора, поддерживающего жизнеспособность нейронов, не чувствительных к действию NGF.

BDNF – белок с молекулярной массой 13.5 кДа, он состоит из 119 негликозилированных аминокислотных остатков и кодируется геном, который носит название *bdnf*. В организме человека этот ген находится на 11-й хромосоме [20, 43].

BDNF сходен по структуре и биохимическим превращениям с NGF. Он синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме как белковый предшественник с молекулярной массой 32 кДа и аминокислотной последовательность в 249 аминокислотных остатков. При последующей транспортировке в аппарат Гольджи пре-нейротрофин гидролизуется матриксными металлопротеиназами (плазмин, фурин). Упакованная в секреторный везикулы молекула «зрелого» нейротрофина присутствует в пресинаптических терминалиях аксонов и постсинаптических дендритов, откуда они высвобождаются в активной форме под влиянием Ca^{++} . Дальнейшая функция нейротрофина связана с регуляцией активности NMDA- или AMPA- рецепторов. Многочисленные данные свидетельствуют, что

возрастные изменения в мозге сопровождаются сниженным синтезом молекул нейротрофинов и ослабленной экспрессии рецепторов [209].

Подобно другим нейротрофинам, BDNF участвует в развитии и сохранении нейронов мозга, включая сенсорные нейроны, дофаминергические нейроны черной субстанции, холинергические нейроны переднего мозга, гиппокампа, ганглиев сетчатки. В мозге мРНК BDNF и сам полипептид идентифицированы в гиппокампе, амигдале, таламусе, пирамидных клетках неокортекса, в мозжечке. В целом распространение BDNF в нейроструктурах значительно больше, чем NGF. BDNF и его мРНК обнаружены в плаценте и периферических ганглиях.

Баланс глутаматергической и ГАМКергической систем контролирует уровень экспрессии BDNF. Блокада глутаматергического звена и/или стимуляция ГАМК ведет к быстрому снижению уровня мРНК BDNF [81].

2.1.3. NT-3

Структура нейротрофина-3 на 50% гомологична NGF и BDNF. NT-3 обладает активностью, характерной для остальных членов семейства нейротрофинов. Он стимулирует развитие и жизнеспособность нейрональной популяции и дифференцировку клеток.

В период развития мозга NT-3 экспрессируется в больших количествах, чем NGF и BDNF. Наряду с NGF, нейротрофин-3 участвует в эмбриональном и постнатальном развитии симпатических нейронов. Помимо этого, NT-3 способствует регуляции трансмиссивных функций и жизнеспособности нейронов взрослого мозга. NT-3 увеличивает выживаемость дофаминергических нейронов среднего мозга и предотвращает дегенерацию норадренергических клеток голубого пятна.

2.1.4. NT-4/5

Нейротрофин-4/5 экспрессируется во многих тканях и большинстве регионов мозга. Фактор повышает выживание и дифференцировку нейронов различных популяций, включая спинальные нейроны, базальные холинергические нейроны переднего мозга, нейроны гиппокампа и гранулярные клетки мозжечка. В эмбриональном мозге NT-4/5 обнаруживается в небольших количествах основных отделов ствола мозга [87]. Наряду с BDNF, NT-4/5 ускоряет образование дендритов в пирамидных клетках коры за счет аутокринного механизма [196].

2.1.5. NT-6

NT-6 был обнаружен у рыб *Xiphophorus*. Оказывает воздействие подобно NGF на сенсорные нейроны и нейроны симпатической нервной системы.

2.1.6. NT-7

Имеет структуру, сходную со всеми остальными нейротрофинами. Нейротрофическое действие NT-7 заключается в способности влиять на рост нейронов и их способности к выживанию [93].

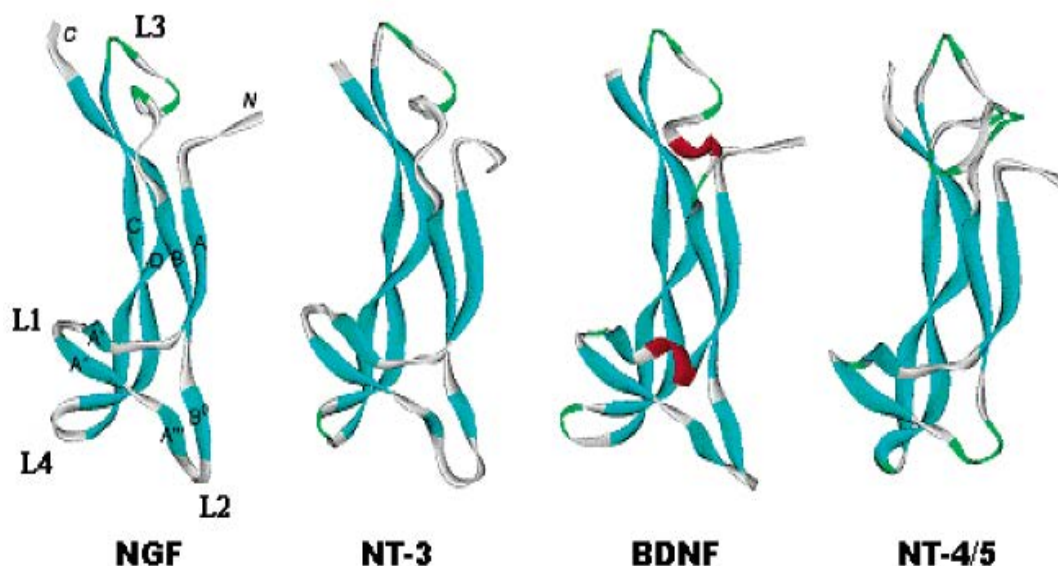


Рисунок 1 – Структура мономеров NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5 [140]

2.1.7. Рецепторы нейротрофинов

Нейротрофины первоначально синтезируются как предшественники белков или пронейротрофины (30 – 35 КДа), которые под действием N – гликозилирования и протеолиза превращаются в зрелые формы. Эти последние белки имеют ряд особенностей: сходное число аминокислот (118 – 120), близкий молекулярный вес мономера (13,2 – 15,9 КДа) и 50% идентичности в первичной структуре. Они формируют стабильные, нековалентные димеры и обладают шестью цистеиновыми остатками, которые формируют три дисульфидных мостика. Основная структура состоит из различных доменов, которые определяют специфичность отдельных членов семейства, связывание со специфическими рецепторами и в результате их биологическое действие.

Нейротрофины выполняют свою функцию, активируют тирозинкиназные рецепторы семейства Trk (TrkA, TrkB, TrkC), которые представляют собой подструктуру низкоаффинного рецептора p75 суперсемейства рецепторов Фактора некроза опухолей (TNF) [155, 156]. Хотя p75 не передает непосредственно сигнал от NGF, этот рецептор, по-видимому,

повышает реактивность Trk рецепторов и играет роль в ретроградном транспорте сигнала нейротрофинов из терминалей аксона в тело клетки. NGF активирует TrkA рецептор, ответственный за сигнальную трансдукцию. BDNF активирует TrkB тирозинкиназные рецепторы. NT-3 активирует тирозинкиназный TrkC рецептор, но может также взаимодействовать в некоторых клеточных системах с остальными рецепторами группы Trk. Все четыре лиганда взаимодействуют с низкоаффинными p75 рецепторами.

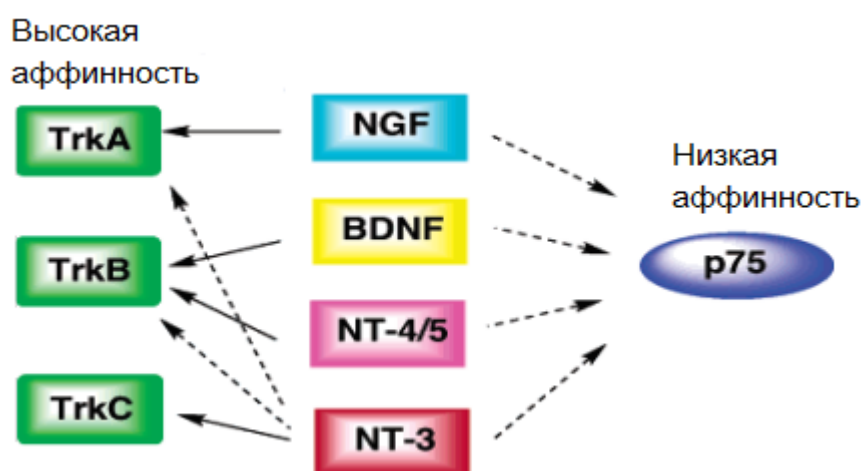


Рисунок 2 – Нейротрофины и их рецепторы [140]

Для всех трех Trk рецепторов были описаны две основные формы: функциональная или каталитическая, т.е. содержащая цитоплазматический тирозинкиназный домен, и некаталитическая, усеченная форма, не содержащая этого домена. Такая укороченная форма образуется путем альтернативного сплайсинга, в результате которого тирозинкиназный домен заменяется коротким усеченным пептидом (truncated peptide). Аминокислотные последовательности, соответствующие усеченным пептидам, отсутствуют в полноразмерном каталитическом рецепторе и, таким образом, являются маркерными для обнаружения некаталитических форм.

Каталитические формы Trk-рецепторов синтезируются почти исключительно в нейронах и выявляются во всех отделах как центральной, так

и периферической нервной системы. В то же время, варианты Trk-рецепторов без тирозинкиназного домена широко продуцируются ненейронными клетками и, в меньшей степени, нейронами [46].

Предполагается, что некаталитическая форма рецептора может конкурировать с каталитической формой за лиганд, выполняя роль доминантно-негативного функционального регулятора. По-видимому, взаимодействие полноразмерной каталитической и усеченной форм играют существенную роль в эмбриональном развитии.

Имеются сведения, что усеченная форма TrkB может функционировать как негативный модулятор антиапоптотического действия BDNF в развивающихся нейронах [54].

Поскольку для передачи сигнала нейротрофинов абсолютно необходимо фосфорилирование внутриклеточных киназных доменов рецептора, некаталитическая форма может ингибировать этот процесс, по крайней мере, двумя способами. Во-первых, некаталитические формы могут просто конкурировать с каталитической формой за лиганд и, таким образом, снижать количество лигандов, способных связаться с функциональным рецептором. Во-вторых, некаталитические формы могут образовывать гетеродимеры с каталитическими формами рецептора, а такие гетеродимеры не способны проводить сигнал, так как отсутствует возможность трансфосфорилирования киназных доменов в ответ на связывание лиганда. Повышение соотношения некаталитической формы по отношению к каталитической снижает вероятность образования функционального гомодимера, способного отвечать на нейротрофин трансфосфорилированием киназных доменов.

Trk рецепторы состоят из 3-х основных доменов: экстраклеточного, трансмембранного и цитоплазматического [14, 17, 84, 139].

Экстраклеточный домен (extracellular domain, ECD) [140] домен расположен на поверхности клетки, при этом N-конец белковой молекулы

ориентирован наружу клетки и имеет гидрофильную природу. В структуру входят 5 субдоменов, соответствующие экзонам d1 – d5:

- D1 – домен, богатый лейцином (leucine-rich motif LRM);
- D2 – домен-1, богатый цистеином;
- D3 – домен-2, богатый цистеином;

иммуноглобулин-подобные последовательности:

- D4 – IgG11 (immunoglobulin-like);
- D5 – IgG12;

Предполагают, что все эти участки могут выполнять функцию “узнающих последовательностей” и участвуют в связывании лигандов, то есть для Trk рецепторов характерна мультиплетность [14].

Выделяют 3 наиболее значимых сайта, которые регулируют связывание и активацию рецептора:

- домен IgG12 выполняет роль основной детерминанты в специфическом связывании с лигандом и последующей активации рецептора (активаторный сайт 1), этим участком рецептор приближен к мембране [145];

- домен IgG11 ингибирует аутоактивацию (регуляторный, или ингибиторный, сайт);

- N-терминальный домен LRM (активаторный сайт 2) также опосредует NGF/TrkA связывание в присутствии p75 рецепторов [14].

Определение структуры и роли этих сайтов рецепторов имеет огромное значение для скрининга и характеристики миметиков и далее для обнаружения биологически активных структур. Лиганды, которые связываются с данными сайтами рецепторов, наиболее вероятно, являются функциональными агонистами или антагонистами [145]. Например, Trk-активатор может быть

или агонистом активирующего сайта 1 (IgC12) или антагонистом регуляторного ингибиторного сайта (IgC11), а Trk-ингибитор может быть или антагонистом IgC12 или агонистом IgC11.

Трансмембранный домен однократно пронизывает мембрану клетки, состоит из 20-24 аминокислот и представляет собой α -спираль липофильной природы, которая соединяет экстраклеточный и цитоплазматический домены и удерживает белок в липидном бислое. По данным мутагенеза трансмембранный домен играет роль в активации рецептора [33].

Цитоплазматический домен (intracellular domain, ICD) состоит из 250-400 аминокислотных остатков. Киназный домен расположен в центре цитоплазматического домена, состоит из около 250 остатков, определяет Trk активность и выполняет эффекторную функцию. Для различных Trk рецепторов характерна высокая степень гомологии аминокислотных последовательностей в этом участке [97].

Структура рецептора нейротрофинов обычно включает два основных компонента: лиганд-связывающий и эффекторные домены. Эффекторный домен после связывания с лигандом инициирует начало биологического ответа. Димерные рецепторные комплексы активируют индивидуальные сигнальные пути, представленные различными эффекторными белками. Димеризация вызывает цепь процессов, начинающихся реакцией фосфорилирования и завершающихся различными типами физиологической реакции. Соответственно, такие реакции определяют выживание клетки, индукцию апоптоза или защиту от него, процессы клеточной дифференцировки и пролиферации. Варибельность этих процессов становится понятной после открытия белков-партнеров, модулирующих направление сигнальных реакций. Определены участки (домены) молекулы NGF, ответственные за такие процессы [209].

2.2. Строение молекулы BDNF и его функции.

Нейротрофин BDNF – димер с молекулярной массой 27,2 кДа, структурно сходен с NGF (Рис. 3). Кристаллографические исследования [92] показывают, что каждый протомер BDNF имеет семь β -тяжей, образующих 3 антипараллельные пары. При этом β -тяжи связаны 3-мя экспонированными наружу нерегулярными участками, называемыми петлями 1 (остатки 29–35), 2 (43–48) и 4 (92–98), а также серией из 3-х последовательных изгибов, или 3-й петлей (остатки 32–40) [99]. Петли преимущественно соответствуют переменным 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 параллельно, вследствие чего шесть петель (1-я, 2-я и 4-я) располагаются на одной стороне димерной молекулы. Отметим, что для BDNF гомодимерная структура до сих пор не установлена рентгеноструктурными методами и в литературе приводятся только гетеродимеры (рисунок 3).

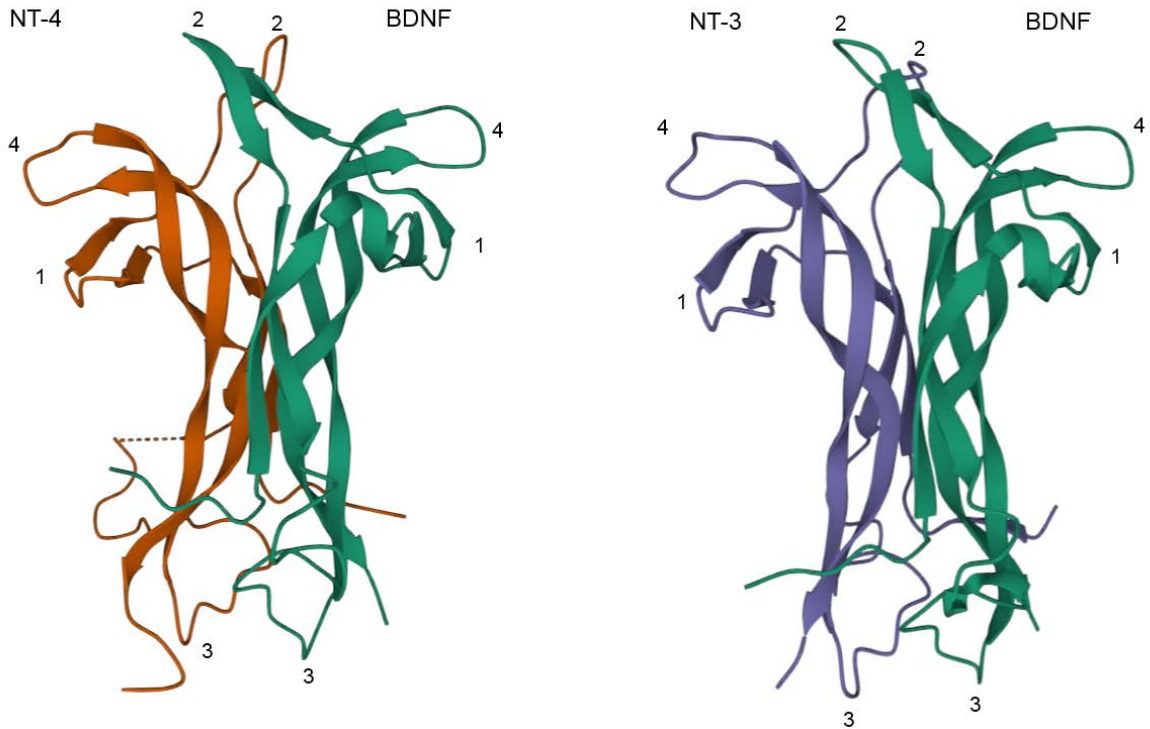


Рисунок 3 - Структура гетеродимеров BDNF/NT-4 (PDB ID: 1b8m) и BDNF/NT-3 (PDB ID: 1bnd)

Рентгеноструктурные данные [153, 154]. Петли - 1, 2, 3, 4. Зеленым цветом выделен мономер BDNF, фиолетовым – мономер NT-3, оранжевым - мономер NT-4.

Подобно другим нейротрофинам, BDNF участвует в правильном развитии и сохранении разных типов нейронов в ЦНС [66].

Изначально BDNF выделяли из мозга свиньи, основываясь на его способности поддерживать выживание субпопуляции клеток базальных ганглиев. Позднее было продемонстрировано, что BDNF и его рецепторы также широко экспрессируются в центральной нервной системе. Особенно высокий уровень экспрессии был обнаружен в областях как развивающейся, так и свойственной взрослым синаптической пластичности, таких, как гиппокамп и кора головного мозга. Другим интересным свойством BDNF

является то, что как его экспрессия, так и его секреция строго регулируются при развитии при нейрональной активности.

В мозге мРНК BDNF и сам полипептид идентифицированы в гиппокампе, амигдале, таламусе, пирамидных клетках неокортекса, в мозжечке. В целом же распространение BDNF в нейроструктурах значительно больше, чем NGF.

В общем плане BDNF рассматривается как регулятор генерализованных физиологических процессов, связанных с адаптацией организма к окружающей среде, реализации адаптивных и когнитивных функций (обучение, память) [15]. Молекулярный и физиологические механизмы определяются, способностью BDNF модулировать синаптическую пластичность, регулировать активность различных нейротрансмиттерных систем и индуцировать необходимое течение сигнальных трансдукторных реакций.

Было показано, что BDNF поддерживает рост спинальных сенсорных нейронов [18], а также выживание и рост мотонейронов, сенсорных, ганглионарных, дофаминэргических, холинэргических, серотонинэргических и ГАМК-эргических нейронов [15, 66]. BDNF дает сигнал к дифференцировке плюрипотентных клеток нервного гребня в сенсорные нейроны [34]. Кроме того, BDNF регулирует экспрессию нейропептидов, а именно, нейропептида Y (NPY) и соматостатина [129].

Процессы обучения и формирования памяти связаны с увеличением уровня мРНК для BDNF и с активацией *trk-B* рецепторов в определенных областях мозга. Депривация BDNF, генетически обусловленная или вызванная фармакологическими агентами, приводит к грубым нарушениям обучаемости и памяти у крыс, мышей и цыплят [202].

Участие BDNF в регуляции программируемой гибели нейронов подтверждено на первичных кортикальных клетках, обработанных

метамфетамином. BDNF предупреждал провоцируемую гибель нейронов, блокируя активацию Akt-зависимого каскада, ведущего к апоптозу.

2.3. Сигнальные пути, регулируемые комплексом BDNF-TrkB.

Тирозинкиназные рецепторы, открытые в конце прошлого века, являются регуляторами критических клеточных процессов - пролиферации и дифференцировки, метаболизма, выживаемости и контроля клеточного цикла. 58 тирозинкиназных рецепторов человека делятся на 20 подсемейств, из которых нейротрофиновое включает TrkA, TrkB и TrkC [100].

Свои функции зрелый BDNF выполняет через высокоаффинный Trk-B рецептор [15]. TrkB рецепторы экспрессируются на телах нейронов, на аксонах и дендритах во многих структурах мозга, включая кору, гиппокамп, стриатум, ядра перегородки, черную субстанцию, клетки Пуркинье мозжечка, ствол мозга, спинальные мотонейроны и чувствительные ядра ствола. Кроме того, TrkB обнаружен на субпопуляции клеток эпендимы, выстилающей желудочки мозга [139].

Связывание BDNF с TrkB индуцирует димеризацию рецептора, и рецептор тирозинкиназы автофосфорилируется, приводя к активации внутриклеточных сигнальных каскадов [15, 163]. Активированный рецептор способен фосфорилировать несколько внутриклеточных мишеней [167]. Существует, по крайней мере, три сигнальных пути, которые регулируются активацией BDNF - TrkB: фосфолипазный путь (PLC γ), который приводит к активации протеинкиназы C; фосфатидил-инозитол 3-киназный путь (PI3K), который активирует серин/треониновую киназу АКТ; MAPK-киназный путь (или ERKs-путь (внутриклеточных сигнал-регулируемых киназы)), активирующий некоторые эффекторы [15]. Каждый из этих сигнальных путей приводит к уникальной функции BDNF в клетке. Например, быстрый эффект синаптических и ионных каналов зависит от PLC γ -зависимого

высвобождения внутриклеточного кальция и последующей активации кальций/кальмодулин-зависимых киназ и казеин-киназы 2, фосфорилированию CREB и дальнейшей активации фосфатидилинозитол-3' киназы [49, 134, 146, 176] (рисунок 4).

Основным фосфолипидными субстратами для фосфолипаз C являются фосфатидилинозитол (PtdIns) и его фосфорилированные производные. Фосфатидилинозитол 3,4 дифосфат (PtdIns (3,4,)P₂) гидролизуется в растворимый в воде инозитол 1,4,5 трифосфат (Ins (1,4,5)P₃) и диацилглицерол (DAG), связанные с мембраной [149]. Ins (1, 4, 5) P₃ связывается с внутриклеточными кальциевыми каналами, расположенными на плотной тубулярной системе (DTS). При связывании кальциевые каналы открываются, кальций выходит в цитоплазму, таким образом, увеличивается уровень свободного кальция. Увеличение концентрации кальция в цитоплазме запускает кальций-зависимые процессы, включая активацию протеинкиназы C (PKC). Также активации PKC способствует действие DAG [98]. PKC фосфорилирует целый ряд белков по сериновым и треониновым остаткам. PKC в том числе фосфорилирует киназу легких цепей миозина и плекстрин (белок, играющий роль в регуляции актина цитоскелета), что приводит к дегрануляции клеток и увеличению концентрации внутриклеточного кальция.

Долговременные же эффекты, связанные с транскрипцией, считаются опосредованными PI3K и MAPK сигнальными путями [15]. Также autofосфорилированным TrkB рецептором активируются адапторные белки Shc, rAPS и SH2-β, Fyn, протеинтирозинкиназа, вовлеченная в регуляцию клеточной адгезии и синаптической пластичности и некоторые другие молекулы).

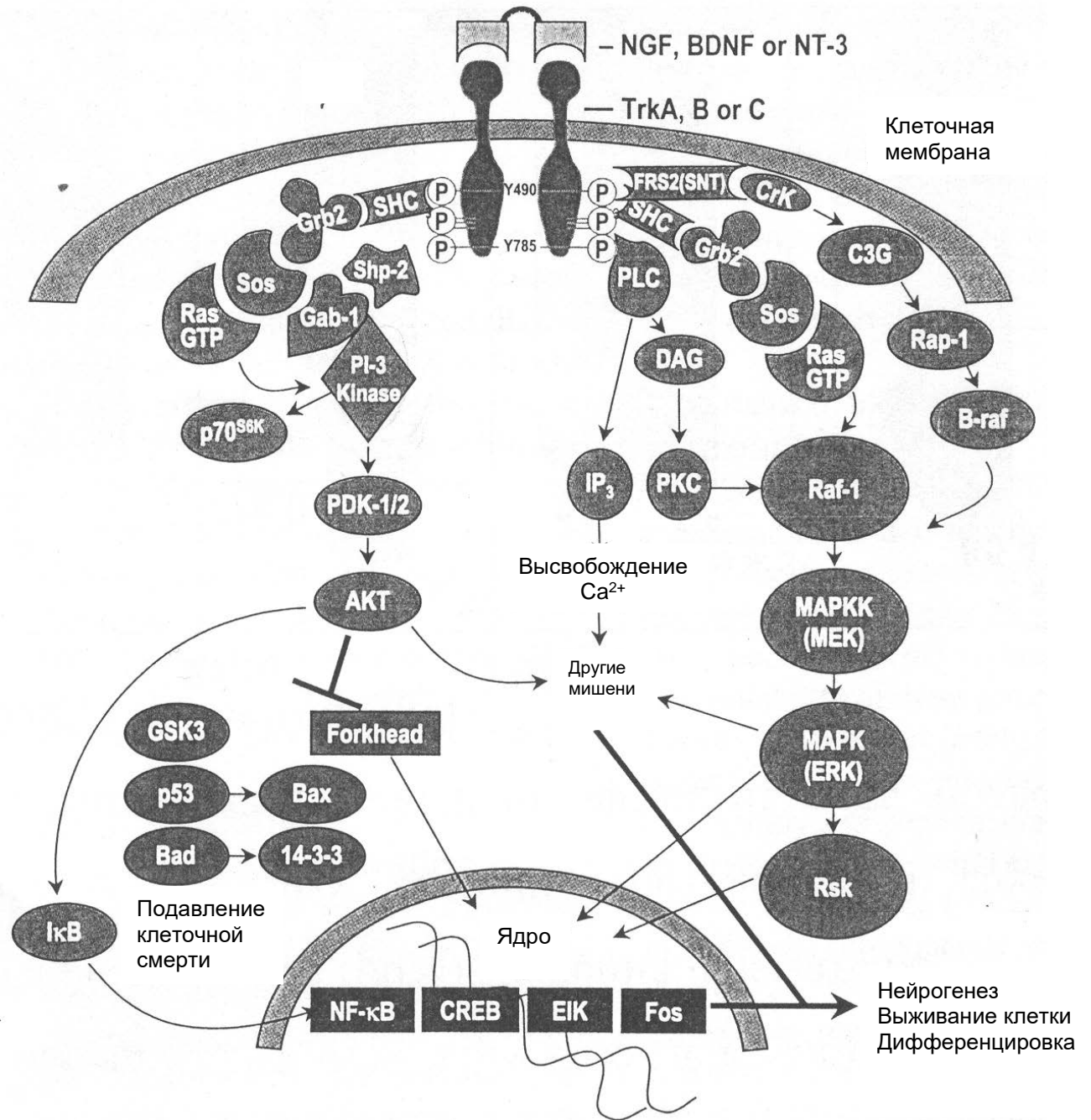


Рисунок 4 – Сигнальный путь, активируемый связыванием нейротрофинов с trk рецептором [145]

Кроме того, как и все нейротрофины, BDNF связывается с $p75^{\text{NTR}}$ (низкоаффинный рецептор нейротрофинов). Рецептор $p75$ представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 75 кДа. Он не обладает внутренней каталитической активностью, но ассоциирован с ERK – семейством

растворимых киназ и играет роль в защите нейронов от апоптоза. Возможно также, что именно через p75 осуществляется ретроградный аксональный транспорт BDNF и NT-4 [36].

Взаимодействие нейротрофинов с p75 рецептором изучено к настоящему времени не так хорошо, как с Trk. Они могут служить корецепторами для TrkB рецепторов, усиливая опосредуемые ими функции или стимулировать апоптоз [85]. Предполагается, что, находясь в комплексе с Trk рецептором, p75 усиливает позитивные эффекты нейротрофина, однако в отсутствие Trk взаимодействие p75, например, с NGF приводит к апоптозу клеток [19]. Trk и p75 рецепторы часто находятся в непосредственной близости на клеточной мембране [25].

Функциональная гетерогенность рецептора p75 обусловлена его способностью взаимодействовать с разными лигандами и формировать комплексы с другими рецепторами [90].

2.4. Экспрессия BDNF.

Ген BDNF (рис. 5) состоит из четырех коротких 5'-некодирующих экзонов (I-IV), каждый из которых содержит отдельный промотор, и одного 3'-концевого экзона (экзон V), кодирующего белок BDNF. Кроме того, каждый из четырех вариантов, полученных в результате альтернативного сплайсинга, подвергается полиаденилированию по одному из двух сайтов, расположенных в 3' области экзона V. Таким образом, получается 8 продуктов, кодирующих один и тот же белок. Смысл подобного разнообразия, по-видимому, состоит в том, что экспрессия BDNF таким образом может селективно регулироваться различными факторами и на нескольких уровнях, что обеспечивает большую гибкость в контроле скорости и величине ответа на то или иное воздействие, приводящее к усилению экспрессии белка BDNF [180].

Ген BDNF считается геном раннего ответа (IEG), то есть в ответ на стимул происходит быстрая инициация транскрипции этого гена, не требующая синтеза белка *de novo*, а в результате посттрансляционной модификации предсуществующих факторов транскрипции [180].

В нейронах рецепция нейротрансмиттера и деполяризация мембраны приводит к открытию лиганд- и потенциал-зависимых кальциевых каналов, что способствует входу кальция в клетку [146]. Кальций, быстро связываясь с соответствующими белками, запускает каскады передачи сигнала в ядро клетки. В ядре, в промоторе гена BDNF транскрипционный фактор CREB, связанный с последовательностью CRE, находится в неактивном состоянии. Кальций-зависимые протеинкиназы фосфорилируют CREB по остатку Ser-133, что запускает транскрипцию мРНК для BDNF.

Однако, мутационный анализ промотора BDNF выявил наличие дополнительных элементов, необходимых для кальций-зависимой транскрипции BDNF, отличных от CREB.

Регуляторные последовательности, контролирующие транскрипцию, находятся обычно в последовательности ДНК, фланкирующей 5'-конец начального экзона. Для гена BDNF таких экзонов четыре. Транскрипты, содержащие I, II и III экзоны, экспрессируются в мозге, тогда как IV экзон обнаружен вне мозга. I и III экзоны индуцируются при судорожной активности во взрослом мозге [74]. Данные, полученные с помощью ОТ-ПЦР показали, что при деполяризации мембраны эмбриональных нейронов коры *in vitro* происходит транскрипция, главным образом, III экзона. Причем этот процесс не останавливается при добавлении в культуру циклогексемида, блокирующего синтез белка. Это говорит о том, что транскрипция экзона III запускается за счет посттранскрипционной модификации уже существующих факторов транскрипции [49].

Изначально синтезируется предшественник белка, известный как препро-BDNF (prepro-BDNF). Prepro-BDNF, в свою очередь, расщепляется до pro-BDNF (35 kDa), который впоследствии превращается в зрелый BDNF (14 kDa) [15]. Расщепление про-белка осуществляется так называемыми про-белок конвертазами (PC1/3, PC2, PC4, PC5/6, PC7, PACE4 и фурин). Активность этих сериновых протеаз зависит от концентрации ионов Ca (около 10 μ M) и уровня pH (около 5-7). Данные условия соблюдаются в секреторных гранулах клетки [101].

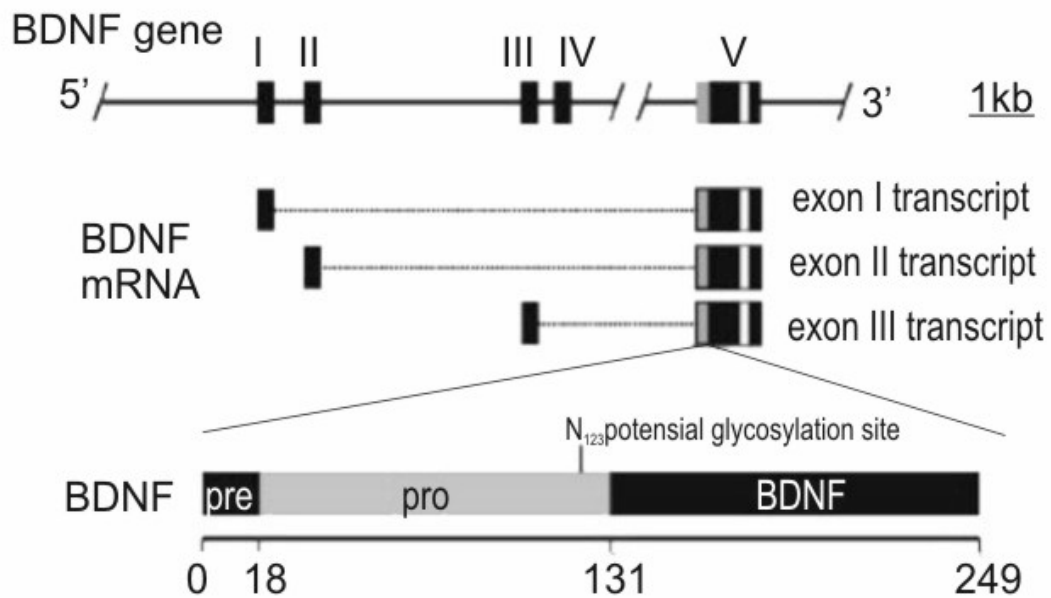


Рисунок 5 – Строение гена BDNF

Изучение распределения нейротрофинов выявило наличие BDNF-иммунореактивности в популяциях нейронов, связанных с развитием нейродегенеративных заболеваний. Снижение синтеза и (или) транспорта BDNF может приводить к нарушению их функционирования и к дегенерации. V слой коры содержит мотонейроны, число которых резко уменьшается на поздних стадиях амиотрофического бокового склероза. При болезни Паркинсона наблюдается гибель дофаминэргических нейронов в черной

субстанции. Холинергические нейроны переднего мозга, имеющие проекции в гиппокамп, содержат BDNF в больших количествах. Известно, что число этих нейронов, а также некоторых нейронов коры резко снижается при болезни Альцгеймера. У пациентов, страдающих болезнью Хантингтона, также снижен уровень BDNF [42]. Роль BDNF показана и в развитии аффективных расстройств [5, 171].

Экспрессия BDNF в ответ на повреждение служит защитой и способствует восстановлению жизнеспособности нейронов, стимулируя рост аксонов и дендритов и реорганизацию синапсов. Изучение роли нейротрофинов и регуляции их выработки способствует пониманию механизмов патогенеза заболеваний, поражающих нервную систему, а также открывает новые возможности в их лечении.

Экспрессия белка и мРНК для BDNF регулируется многими факторами. Уровень BDNF варьирует в ходе развития и роста организма, зависит от его активности, а также меняется в ответ на повреждение нервной ткани при ишемии, гипогликемии, эпилептической активности и травмах [45, 105, 115, 173]. Как при повреждении, так и в физиологических условиях регуляция экспрессии BDNF представляет собой сложное взаимодействие разных нейротрансмиттерных систем [184].

Известно, что уровни мРНК для BDNF и NGF зависят от активности нейронов. Увеличение экспрессии регулируется глутаматом (через NMDA и не NMDA рецепторы), а снижение – в основном через систему ГАМК [204, 205]. Это показано в экспериментах как *in vivo*, так и *in vitro* на нейронах гиппокампа.

Уровни мРНК BDNF в определенных областях гиппокампа колеблются во время эстрального цикла [56]. Как известно, эстрогеновый рецептор принадлежит к суперсемейству рецепторов, активирующих транскрипцию генов путем прямого связывания гормон-специфичных регуляторных

элементов ДНК [138]. Таким образом, эстроген регулирует транскрипцию широкого набора генов. Была определена последовательность в гене BDNF, соответствующая ERE (estrogene response element) [174]. Эта последовательность расположена на 5'-конце экзона V, то есть экзона, кодирующего белок BDNF.

Изучено участие эстрогена в регуляции уровня мРНК для BDNF [174]. Овариэктомированным животным вводили эстроген и анализировали уровень мРНК в коре и обонятельных луковицах. Уже через 4 ч после однократного введения эстрогена наблюдалось 2-2.5-кратное увеличение экспрессии мРНК для BDNF относительно овариэктомированных животных (контроль). Показано, что дефицит эстрогена (двусторонняя овариэктомия) значительно снижает уровень мРНК для BDNF, тогда как применение эстрогена в тех же условиях поддерживает уровень нейротрофина в некоторых областях коры и в гиппокампе [170].

Показано, что физическая активность увеличивает экспрессию мРНК для NGF и BDNF в гиппокампе и коре крыс. При этом наблюдалась прямая зависимость уровня мРНК для BDNF от расстояния, которое крысы пробегали в крутящемся колесе. Авторы полагают, что физическая активность способствует увеличению устойчивости мозга к повреждениям и защищает его от нейродегенерации, связанной со старением [130].

Исследовано влияние иммобилизационного стресса (2 часа/день) на экспрессию нейротрофинов в мозге крысы. В результате было показано, что единичная или повторная иммобилизация приводит к значительному снижению уровней мРНК для BDNF в гиппокампе и зубчатой извилине [173].

Показано, что хроническое потребление этанола приводит к значительному снижению мРНК для BDNF в гиппокампе крыс, а уровень мРНК для NGF, NT-3, а также белка NGF остаются неизменными. Кроме того, при хронической алкоголизации увеличивается уровень TrkB [113, 181].

Острое применение этанола приводит к значительному увеличению экспрессии мРНК для BDNF через 12 ч в зубчатой извилине и СА3 области гиппокампа, а также в супраоптическом ядре гипоталамуса [181].

Пептид AVP(4-8) является поведенчески-активным метаболитом аргинин-вазопрессина (AVP), который способен влиять на процессы обучения и формирования памяти [41]. Изучено действие экзогенного AVP(4-8) на уровни мРНК для NGF, BDNF и NT-3 в мозге взрослой крысы. Экспрессия белков NGF и BDNF значительно увеличивалась под действием AVP(4-8) в коре и гиппокампе, а экспрессия NT-3 не изменялась. Уровень мРНК для NGF в коре увеличивался в 6,43 раза, а уровень мРНК для BDNF - в 4,1 раза. В гиппокампе были обнаружены соответствующие изменения - в 3,05 раза для NGF и в 3,1 раза для BDNF. Применение в тех же условиях поведенчески-активного AVP привело к незначительным изменениям уровня экспрессии белка BDNF, а его поведенчески-неактивный аналог окситоцин вообще не вызвал изменений [212].

Пептиды VIP и родственный ему PACAP, обладающие нейропротекторными свойствами, стимулируют экспрессию мРНК для BDNF в первичных культурах нейронов и астроцитов коры. При этом в культурах нейронов увеличение экспрессии мРНК для BDNF, вызванная VIP и PACAP, полностью отменяется под действием антагонистов NMDA-рецепторов - МК-801 и AP5, что указывает на то, что их действие связано с потенцированием действия глутамата [159].

2.5. Роль BDNF в развитии патологических состояний мозга.

Старение мозга сопровождается постепенным снижением функции митохондрий, основной энергообразующей органеллы клетки. Нарушение баланса про- и антиоксидантных биохимических процессов ведет к индукции апоптоза. Классической формой нарастающей ишемии стареющего мозга

оказывается дисциркуляторная энцефалопатия. Кровоснабжение регионов мозга слабеет и активизируются нейродегенеративные процессы. Физиологическим следствием этих внутриклеточных процессов оказывается нарушение межнейрональных связей, дисбаланс синапсов, невыполнение регуляторных функций, свойственных «нормальному» мозгу: развитие локомоторных расстройств, деменции, социальная адаптивная дезориентация организма. Возрастной мозг становится более уязвимым к ишемическим и нейродегенеративным влияниям.

Как известно, BDNF контролирует баланс глутаматергической и ГАМК-ергической систем. В одном из первых исследований этого направления было установлено, что изменения уровня BDNF в отделах переднего мозга после окклюзии средней артерии демонстрируют значительные вариации. На модельной ишемии, вызываемой окклюзией средней церебральной артерии, было выявлено: (а) последовательное снижение BDNF и рецептора TrkB, в инфарцированной зоне; (б) снижение BDNF-иммунореактивности в зоне пенумбры; эти явления наблюдались через 12 часов окклюзии; (в) сниженная иммунореактивность TrkB в астроцитах, окружающих зону инфаркта; (г) повышенную TrkB иммунореактивность в отдельных нейронах, дистантных от зоны инфаркта, в ипсилатеральной и контралатеральной структурах через 24 и 48 часов после начала ишемии [48]. Определение уровня мРНК BDNF при умеренной (олигомической) ишемии мозга в отсутствие очевидных признаков нейронального нарушения показало его значительную (более 80%) экспрессию в гранулярных клетках гиппокампа уже через 6 часов окклюзии [164].

Эти данные указывают на вероятное участие BDNF в ишемической патологии мозга, однако его конкретизация и специфичность остаются неизученными. Нейропротективное действие BDNF было выявлено с помощью конъюгированной формы BDNF с моноклональными антителами рецептора трансферрина. В этой форме BDNF, введенный внутривенно,

проникал через ГЭБ и оказывал защитное действие на ишемизированный мозг крысы. Эффект выражался в существенном (до 70%) снижении объема кортикального инсульта при наблюдении от 24 часов до 7 суток. Эти позитивные явления не относились к субкортикальным клеткам ишемизированного мозга [208].

В некоторых работах описывается влияние однократного или хронического введения никотина на экспрессию мРНК BDNF в гипоталамусе. Через 2 и 24 часа после *ip* введения 0,5 мг/кг никотина крысам выявлялось существенное снижение уровня мРНК BDNF в зубчатой извилине и в CA3 и CA2 субрегионах гипоталамуса. Однако введение никотина в течение 7 дней приводило, наоборот, к увеличению синтеза BDNF. По-видимому, этот фактор может участвовать в регуляции поведенческих реакций, связанных с одноразовым или длительным употреблением никотина [89].

Болезнь Альцгеймера - стадийное заболевание, которое характеризуется дисфункцией и гибелью холинергических ядер нейронов фронтальной коры и гиппокампа. Нейродегенеративные процессы при болезни Альцгеймера включают нарушение структуры и функций митохондрий, запуск окислительного стресса, но кроме того - измененный процессинг β -амилоидного белка-предшественника (APP) и аккумуляцию нейротоксической формы амилоидного β -пептида (A β). Исследования на экспериментальных моделях показали, что окислительный стресс и A β деструктируют работу нейрональных кальциевых каналов, провоцируя глутаматную эксайтотоксичность, изменения цитоскелета нейронов и образование нейрофибриллярных «клубков». Следствием этих процессов оказывается прогрессирующая потеря синаптических связей и собственно нейронов, которые первично развиваются в энторинальной коре мозга и гиппокампе. Функциональная деструкция характеризуется нарушениями памяти и поведенческих навыков, как первичных признаков деменции.

Функция BDNF как эндогенного регулятора поддержания нейрональных функций, синаптической пластичности и структурной целостности выступает здесь на первый план. Определение концентрации BDNF в сыворотке крови и в цереброспинальной жидкости у 30 пациентов с различными стадиями болезни Альцгеймера выявило увеличение его содержания в начальной стадии заболевания, отражая активацию компенсаторных механизмов. По мере прогрессирования болезни Альцгеймера уровень BDNF снижался [94]. Отмечаются существенные различия в содержании нейротрофинов в различных отделах мозга у пациентов с болезнью Альцгеймера. Анализ постмортального материала показал, что содержание BDNF в гиппокампе, фронтальной и париетальной коре мозга существенно ниже, чем в контрольной группе сходного возраста, тогда как уровень NGF, наоборот, оказывается повышенным. Своеобразным контролем служат данные по содержанию нейротрофинов в мозжечке, где существенных изменений не обнаружено. Сниженный уровень BDNF при болезни Альцгеймера свидетельствует о нивелированной трофической поддержки нейрональной популяции, включенной в базальные ядра холинергической системы переднего мозга [67].

Определение мРНК BDNF на трансгенных моделях болезни Альцгеймера выявило сниженный уровень экспрессии нейротрофина и его отрицательную корреляцию с образованием больших амилоидных агрегатов в коре мозга и тяжестью заболевания [141]. Выявлено сниженное содержание мРНК BDNF в гиппокампе и энторинальной коре пациентов с болезнью Альцгеймера. *Murer et al.* отмечали наличие BDNF-иммунореактивного материала, соответствующего сенильным амилоидным бляшкам, клетках энторинальной коры и других кортикальных структурах мозга [103].

При нейродегенеративных заболеваниях в структурах мозга наблюдается повышение уровня белков теплового шока семейства HSP (heat

shock proteins) и снижением продукции большинства других клеточных белков [191].

2.6 BDNF в клинических исследованиях

Важная роль BDNF в поддержании жизнеспособности и фенотипической стабильности нейронов и глиальных клеток, регуляции нейрогенеза, синаптической пластичности и в целом нейропластичности определяет его терапевтический потенциал для лечения нейродегенеративных заболеваний. Установлена взаимосвязь дефицита BDNF с патогенезом болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, бокового амиотрофического склероза и др. [59, 111, 207]. Несмотря на большое количество доклинических исследований, показавших высокую эффективность BDNF при центральном введении на экспериментальных моделях нейродегенеративных заболеваний, применение нейротрофина в клинике оказалось безуспешным из-за фармакокинетических ограничений, таких как плохая проницаемость через ГЭБ [144], малое время жизни в кровотоке, так период полураспада рекомбинантного BDNF в крови менее 1 мин [144] и побочных эффектов за счет плейотропности. Так, клинические исследования BDNF для лечения бокового амиотрофического склероза не показали эффективности нейротрофина как при интратекальном (25, 60, 150, 400 или 1000 мкг/сут, 11 недель) [135], так и подкожном (25 и 100 мкг/кг, 9 месяцев) [4] введении, при этом при интратекальном введении высокие дозы BDNF (>150 мкг/кг в сутки) вызывали побочные эффекты, такие как парестезии, нарушения сна, сухость во рту, возбуждение. Эти исследования были прекращены на III фазе. Клинические исследования BDNF (подкожно, 25 и 100 мкг/кг, 3 месяца) для лечения диабетической нейропатии также не показали значимых положительных результатов [192].

Основываясь на этих данных, представляется актуальным создание лекарственных средств на основе низкомолекулярных соединений – миметиков нейротрофина, обладающих заданным набором полезных свойств из спектра фармакологических эффектов BDNF.

2.7. Белки теплового шока.

Нейропротекторное действие нейротрофинов связано с их способностью активировать синтез цитопротекторных белков. Одним из представителей эндогенной системы защиты клетки является семейство белков теплового шока (heat shock proteins, HSP).

Своим название HSP обязаны тому случайному обстоятельству, что впервые они были обнаружены в клетках, подвергнутых острому тепловому воздействию. В Международной лаборатории генетики и биофизики (Неаполь) в начале 1960-х годов было обнаружено, что кратковременный подъем температуры вызывает образование пухов (увеличение локальных участков) на хромосомах слюнных желез *Drosophila melanogaster* [151].

В сущности, термин «белки теплового шока» неточен, т.к. ещё в 1984 году было доказано, что синтез этих белков стимулируется холодовыми воздействиями [44]. Далее было показано, что синтез HSP увеличивается при разных ситуациях и воздействиях. Поэтому более компромиссным обозначением для этих белков является название «стресс-белки».

Перечень факторов, усиливающих синтез HSP:

- Тепло
- Аноксия, гипоксия, ишемия
- Инфекции, воспаление
- Лихорадка
- Ультрафиолетовое облучение
- Алькоголь

- Гипер- и гипоосмолярность
- Алкалоз, ацидоз
- Перекись водорода
- Хемотерапевтические агенты
- Мутагены, канцерогены, тератогены
- Анестетики
- Никотин
- Металлы (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+})
- Фенол и его производные
- Инсектициды и пестициды
- Денатурированные белки

В соответствии с молекулярной массой все HSP разделены на 6 основных семейств:

- Высокмолекулярные HSP (100-110 кДа)
- HSP90 (83-90 кДа)
- HSP70 (66-78 кДа)
- HSP60
- HSP40
- Низкомолекулярные HSP (15-30 кДа)

Кроме того, все HSP делятся на конституитивные (с высоким базальным уровнем и слабой индукцией при стрессе) и индуцибельные (в нормальных условиях практически не обнаруживаются, а при стрессе их синтез резко увеличивается) [117].

Конституитивные HSP принимают участие во многих клеточных процессах: рост и дифференцировка клеток, функционирование стероидных рецепторов и тирозиновых киназ, репликации ДНК и др. Однако наиболее важную роль они играют в образовании третичной и четвертичной структур белков [183]. HSP60 и HSP70 связываются с вновь синтезированными цепями белков в тех областях, где может произойти нежелательное гидрофобное

взаимодействие и слипание белковых цепей. Затем, благодаря энергии АТФ, HSP транспортирует белковую цепь к эндоплазматическому ретикулуму, митохондриям или аппарату Гольджи, где происходит передача белковой цепи через мембрану на органельный HSP, способствующий формированию окончательной субъединичной структуры белка. Таким образом, HSP обеспечивает правильное свертывание белка. Благодаря этой функции HSP70 и HSP60 назвали шаперонами (chaperone-посредник, сопровождающее лицо) [117]. Под шаперонной активностью подразумевают способность HSP узнавать и связывать экспонированные гидрофобные поверхности ненативных полипептидных цепей, денатурированных и поврежденных полипептидов.

Было проведено большое количество исследований функций HSP и, особенно, HSP70 в стрессированных клетках. Сразу после стресса общий биосинтез белка снижается, а синтез HSP70 резко увеличивается. При этом большинство HSP70 находится в ядре среди поврежденных в результате стресса прерибосом. Постепенно содержание HSP70 в ядре уменьшается, а в цитоплазме увеличивается. К этому времени поврежденная структура прерибосом восстанавливается, а общий биосинтез белка достигает исходного дострессорного уровня [191].

Среди представителей семейства HSP наиболее мощным нейропротективным эффектом обладают HSP70: они предотвращают агрегацию, ассистируют раскладывание неправильно собранных белков и реорганизацию частично денатурированных белков или разбирают агрегаты денатурированных белков, накапливающихся в результате стресса. Считается, что в основе протективной функции HSP70 лежит шаперонная активность. К семейству этого белка относят содержащиеся в цитоплазме конститутивно синтезирующийся HSP70к и индуцибельный компонент HSP70и, а также митохондриальный Mtp70 и эндоплазматический GRP78 [137, 147].

Конститутивный HSP70 играет важную роль в фазах клеточной пролиферации и дифференцировки, в контроле биологической активности

некоторых регуляторных белков или комплексов, а также в постоянных физиологических клеточных процессах в не стрессовых условиях [11]. Благодаря своей шаперонной активности HSP70к участвует в процессах фолдинга и рефолдинга полипептидов и ускорений транслокации белков через мембраны, а также в протеолитической деградации нестабильных белков, сборке и разборке белковых комплексов, подавлении агрегации белков [136].

С другой стороны, индуцибельный HSP70 синтезируется в ответ на действие стрессовых стимулов [23]. Отличительной особенностью HSP70и является то, что экспрессия генов HSP70 и не контролируется механизмом сплайсинга вследствие отсутствия интронов в его гене. Поэтому скорость и мобильность синтеза у индуцибельной формы HSP70 значительно выше, чем у конститутивной [206].

Шапероны HSP70к и HSP70и, для проявления своих свойств нуждаются в “ассистентах”. Два известных типа DnaJ-подобных белков, csp (cysteine string protein) и HSP40/Hdj, локализованы в пре- и постсинаптических сайтах, соответственно. Они способствуют определению специфики синаптической активности HSP70к и HSP70и [88]. Csp кооперируется с HSP70и, и не взаимодействует с HSP90 и HSP60; он ассоциирован с синаптическими пузырьками и другими регуляторными секторными органеллами и включен в процессы экзоцитоза. Csp в кооперации с HSP70и, действует как молекулярный шаперон, участвуя в сборке и диссоциации белковых комплексов и модулировании активности пресинаптических кальциевых каналов [166]. Постсинаптическая локализация шаперонного комплекса HSP70к/HSP40 может иметь фундаментальное значение для синаптической передачи и ее регуляции в отсутствии стрессовых воздействий. Общая гипертермия вызывает усиление экспрессии HSP27 и HSP32 в постсинаптических структурах мозжечка и в глиальных клетках гиппокампа. Локализация и функциональное значение для синаптических процессов других HSP остаются мало исследованными [21].

Гемоксигеназа-1 (НО-1) имеет молекулярную массу 32 кДа и является членом суперсемейства белков теплового шока (HSP32). Этот фермент катализирует превращение гема в биливердин в мозге и других тканях. Различают три формы гемоксигеназы: гемоксигеназа-1, гемоксигеназа-2, гемоксигеназа-3 [162]. Гемоксигеназа-2 является внутриклеточным модулятором оксида азота (NO) [114]. Гемоксигеназа-3 недостаточно хорошо изучена, но существует предположение об её участии в регуляции гемзависимых генов, экспрессирующих гемоксигеназу-1 [123]. Гемоксигеназа-1 является индуцибельной изоформой. Гемоксигеназа-2 и гемоксигеназа-3 являются конститутивными изоформами и обеспечивают функционирование клетки в нормальных физиологических условиях.

Гемоксигеназа играет важную роль в жизни бактерий, морских водорослей, растений и животных. Она участвует в окислительном расщеплении молекулы гема (Fe-протопорфирин) с дальнейшим образованием биологически активных молекул, открытых тетрапирролей, оксида углерода (II) – CO и свободного железа [39, 165]. Гемоксигеназная система является основной, но не единственной системой, катализирующей окисление молекулы гема. Гемоксигеназа-1 выполняет ряд функций в клетке, одной из которых является регуляция уровня клеточного гема.

Гем необходим для регуляции определенных генов, для связывания газов и их транспортировки, также он участвует в различных путях биотрансформации и является одним из самых мощных катализаторов образования свободных кислородных радикалов. Уровень свободных радикалов увеличивается при различных заболеваниях ЦНС и раке [179].

В различных жизненных формах каталитическое расщепление молекулы гема используется для различных целей:

- в бактериях таким образом обеспечивается накопление железа;
- в морских водорослях и растениях способствует образованию предшественников хлорофилла, который опосредует реакцию растений на свет [182];

- в организме животных также способствует поддержанию уровня железа, является источником СО и белка биливердина, обладающего антиоксидантными свойствами. Последние два продукта являются очень важными для мозга и нервов [47].

В центральной части гемоксигеназы расположен каталитический центр, содержащий 24 аминокислотных остатка. В центре гидрофобного участка располагается остаток гистидина (гистидин в положении 132 - в НО-1, в 151 - в НО-2, в 128 – в НО-3), который необходим для выполнения функции расщепления молекулы гема [121]. Для работы гемоксигеназной системы необходима NADPH-цитохром с редуктаза. Гемоксигеназа связывает гем и вместе с редуктазой формирует «переходную электрон-транспортную цепь» [161]. Изоформы гемоксигеназы не только расщепляют гем b, который более распространен в различных биологических системах, но также катализируют расщепление производных гема с. Гем с входит в состав митохондриального цитохрома с. Предполагается, что гем с вовлечен в процесс апоптоза, обеспечивая образование свободных радикалов кислорода. В свою очередь, гемоксигеназная система участвует в защите клетки от гибели.

Взаимодействие кислорода с α -углеродными атомами молекулы гема способствуют расщеплению тетрапиррольного кольца в этом положении с образованием биливердина IX α и превращает углеродные мостики в СО. Биливердин далее превращается в билирубин под действием фермента биливердинредуктазы. Связанное железо высвобождается при расщеплении порфиринового кольца [193].

2.7.1. Регуляция экспрессии гемоксигеназы-1 (HSP32) в головном мозге.

Гемоксигеназа-1, которая впервые была открыта как металл-индуцибельный фермент, является формой, отвечающей на стрессовые состояния. Помимо металлов, экспрессию гемоксигеназы индуцируют

различные химические элементы и стимулы, такие как снижение уровня глутатиона, NO и производных NO [47]. В промоторе гена гемоксигеназы обнаружена определенная последовательность регуляторных элементов, которая включает AP-1 связывающий сайт, регуляторную нуклеотидную последовательность, обозначаемую как heat shock consensus element (HSE), необходимую для стресс-опосредованной транскрипции HSP гена белков теплового шока и, возможно, NF- κ B связывающий сайт [95]. Связывание факторов с этими специфичными сайтами приводит к активации гена гемоксигеназы-1. Многие из этих стимулов появляются обычно при стрессе. Описан полиморфизм данного гена [201].

При таких состояниях как гипоксия, гипертермия, инсульт, вызванный ишемическим повреждением или геморрагией, или при травме происходит активация экспрессии гена гемоксигеназы-1. Индукция гена происходит очень быстро. Например, при гипоксии или гипертермии уровень мРНК гена гемоксигеназы-1 увеличивается в 30-50 раз в течение 1 часа по сравнению с исходным и возвращается к нормальному в течение 24 часов [47].

В ряде исследований была показана важная роль стероидных гормонов надпочечников в регуляции экспрессии гемоксигеназы. Стероидные гормоны усиливают экспрессию гемоксигеназы-2, но не влияют на экспрессию гемоксигеназы-1 [177]. Хотя был обнаружен эффект гормонов надпочечников на экспрессию гемоксигеназы-1 в пирамидной системе и гиппокампе, где обычно гемоксигеназа-1 не экспрессируется [114].

2.7.2 Функции гемоксигеназы-1 (HSP32) в головном мозге.

В здоровом организме гемоксигеназа-1 присутствует в отдельных частях головного мозга, таких как мозжечок, зубчатой извилине и стволе мозга. С другой стороны, уровень гемоксигеназы увеличивается в глиальных клетках и в макрофагах в ответ на стресс [47, 177].

Экспрессия гена гемоксигеназы-1 была исследована на трансгенных мышцах (Tg) с усиленной экспрессией гена на модели локальной ишемии мозга. В мозге трансгенных мышей через 6-24 часов после моделирования ишемии развивался очень маленький очаг повреждения, в отличие от нетрансгенных мышей. Считается, что нейропротективный эффект был достигнут следующими механизмами: ингибированием ядерной p53, увеличением антиоксидатного потенциала клетки, снижением в липидах окисления, увеличением уровня белка ферритина, содержащего железо. Увеличение уровня CO приводит к активации фермента гуанилатциклазы, которая способствует образованию цГМФ и ингибирует агрегацию тромбоцитов. цГМФ также влияет на работу ионных каналов, активирует фосфодиэстеразу и способствует фосфорилированию белков под действием цГМФ-зависимых протеинкиназ [187].

Усиленная экспрессия гемоксигеназы-1 также защищает клетку от химических стимулов, таких как глутамат и H_2O_2 , которые приводят к некрозу и апоптозу нервных клеток.

Кроме того, изоформы гемоксигеназы и их активные продукты обладают эффекторными функциями в клетках. Усиление экспрессии гена гемоксигеназы-1 влияет на функции клеточного иммунитета, а именно, ингибирует опосредованную Т-клетками цитотоксичность и лимфопролиферативный ответ [195, 197].

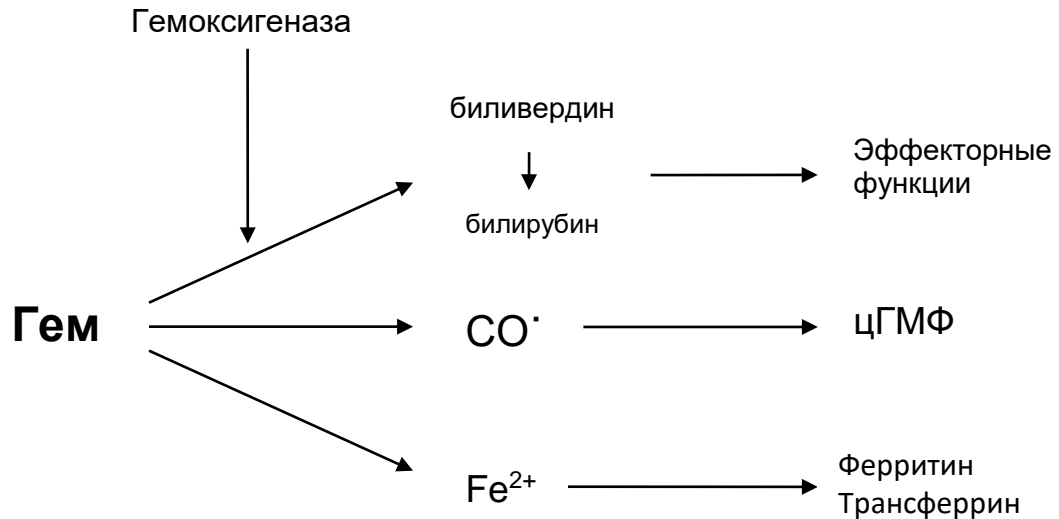


Рисунок 6 - Схема гемоксигеназной реакции [114]

Но, несмотря на протективные свойства гемоксигеназы-1, в некоторых случаях эта система может приводить к нейродегенеративным заболеваниям. Ответ гемоксигеназы-1 на гормоны надпочечников может приводить к дегенерации нервных клеток при хронических стрессовых состояниях. Увеличение содержания гемоксигеназы в нервных клетках приводит к повышению содержания CO. В результате этого снаружи клетки активируются глутаматные рецепторы и возрастает поток ионов кальция в клетку. Ионы кальция необходимы для активации нейрональной NO-синтазы белком кальмодулином. Изменение уровня кальция в клетке приводит к увеличенному синтезу оксида азота – NO, которое может привести к образованию цитотоксичных пероксинитритов и к гибели нейронов. Доказано вовлечение фермента гемоксигеназа-1 в патофизиологию болезни Паркинсона и Альцгеймера. Поэтому очень важно ограничить чрезмерный синтез гемоксигеназы-1, чтобы избежать повреждения нейронов [162].

Эффективных методов лечения нейродегенеративных заболеваний с помощью лекарственных средств, разрешенных к применению, на сегодняшний день не существует. Важным направлением в лечении

нейродегенеративных заболеваний является нейропротекторная терапия, которая направлена на предотвращение гибели нейронов. На основании многочисленных экспериментальных данных было высказано предположение, что одним из возможных путей замедления или приостановки распространения нейродегенеративного процесса может быть увеличение продукции или поступления в клетки головного мозга трофических факторов, в том числе и BDNF. Однако в действительности нейротрофины оказались неудачными лекарствами. Несмотря на многообещающие данные доклинических исследований, клинические испытания BDNF для лечения амиотрофического латерального склероза не увенчались успехом в первую очередь из-за фармакокинетических ограничений, таких как малое время жизни в кровотоке (период полураспада нейротрофина у крыс меньше 1 мин) и низкая способность проникать через гематоэнцефалический барьер [4]. Поэтому поиск аналогов нейротрофинов является чрезвычайно актуальным направлением современной фармакологии.

2.8 Низкомолекулярные аналоги нейротрофинов.

Способность нейротрофинов защищать нейроны на экспериментальных моделях нейродегенеративных заболеваний породила оптимизм о возможности их терапевтического применения. Однако в действительности нейротрофины оказались неудачными лекарствами, поскольку, как белки, они орально недоступны, не способны преодолевать гематоэнцефалический и другие биологические барьеры и быстро деградируют в крови. Кроме того, нейротрофины обладают плеiotропным действием и могут вызывать канцерогенез. Взаимодействие нейротрофинов с p75 рецептором вызывает гибель нейронов за счет апоптоза. Существенным недостатком нейротрофинов является развитие болевого синдрома при их использовании. Это связано с участием нейротрофинов в эндогенной регуляции боли. Клиническое применение нейротрофических факторов оказалось

безуспешным [142]. Это привело к попыткам создания низкомолекулярных аналогов нейротрофинов, стабильных в крови и способных преодолевать гастроинтестинальный и гематоэнцефалический барьер. Предполагалось, что низкомолекулярные аналоги нейротрофинов могли бы реализовывать только часть биологических эффектов благодаря тому, что они будут селективно взаимодействовать только с некоторыми участками связывания части нейротрофиновых рецепторов и, таким образом, будут активировать только нужные звенья сигнальных каскадов.

Разработкой новых лекарственных средств на основе низкомолекулярных миметиков BDNF занимались несколько исследовательских групп, наиболее крупные из которых находятся в РФ, США, Канаде и Австралии.

В 90-х годах серия исследований по сайт-направленному мутагенезу позволила Ибаньесу и сотрудникам [71, 72, 73] предположить, что петли 1, 2 и 4 являются носителями аминокислотных остатков, непосредственно участвующих в связывании нейротрофинов с рецепторами.

Для BDNF было установлено, что важную роль в связывании с TrkB и/или проявлении активности играют следующие последовательности: -Lys²⁶-Thr²⁷-Ala²⁸-Val²⁹-Asp³⁰-Met³¹-Ser³²-Gly³³-Gly³⁴-Thr³⁵- (1 петля) [72]; -Ser⁴⁵-Lys⁴⁶-Gly⁴⁷-Gln⁴⁸-Leu⁴⁹- (2 петля) [71]; а также остатки 4 петли Lys⁹⁵, Lys⁹⁶ и Arg⁹⁷ [73] и участок бета-тяжа -Gln⁷⁹-Cys⁸⁰-Arg⁸¹-Thr⁸²-Thr⁸³-Gln⁸⁴-Ser⁸⁵-Tyr⁸⁶-Val⁸⁷-Arg⁸⁸- [72]. С конца 90-х годов на основе этих данных различными исследовательскими группами разрабатывались соединения - низкомолекулярные миметики BDNF.

Имеется несколько патентов на низкомолекулярные пептидные аналоги нейротрофинов. Линейные пептиды с последовательностью, соответствующей последовательности шпилькообразных структур проявляли антагонистическую активность [109]. Пептидные агонисты нейротрофинов

были получены среди циклопептидов, способных сохранять конформацию, близкую к поворотной конформации нейротрофиновых петель. При этом необходимым условием для получения агонистической активности было создание бивалентных аналогов, имитирующих гомодимерную структуру нейротрофинов. Так, Лонго и др. [110] запатентовал циклические мономерные и димерные пептиды, соответствующие последовательностям 43-47 и 92-97 NGF (2-я и 4-я петли). Циклы образованы с помощью дисульфидных связей по остаткам цистеина или пеницилламина, которые дополнительно вводились в состав указанных пептидов. Бициклические аналоги демонстрировали агонистическую активность в тестах *in vitro*.

Аналогичные соединения запатентованы Сарагови и др. [160]. Циклические пептидные аналоги образованы с помощью дисульфидной или иной (ионной, металл-хелатной и др.) связи между линейными пептидами, полностью или частично соответствующими последовательностям 28-36 петли 1 NGF, 42-49 петли 2 NGF, 59-67 и 91-99 петель 3 и 4 NGF. Минимальная молекулярная масса циклического пептида с агонистической активностью составила 1500 дальтон, пептид состоял из 16 аминокислот. Пептиды активны *in vitro*.

Ричард Хьюз [70] подал заявку на моно- би- и трициклические пептидные аналоги 2-й и 4-й петель BDNF с агонистической и антагонистической активностью (рисунок 7). Для циклизации использованы дисульфидные мостики, связь между циклами осуществляется как через дисульфидные мостики, так и через боковые карбокисльные и аминогруппы аминокислот. Длина спейсера влияла на активность- максимальной активностью обладали бивалентные аналоги с расстоянием между циклопептидными фрагментами, равным таковому у BDNF. Агонистической активностью обладали и мономерные циклические пептиды- аналоги участка связывания р75-го рецептора 4-й петли BDNF.

Таким образом, во всех случаях связывание с нейротрофиновым рецептором обеспечивалось наличием протяженного участка, обычно соответствующего пептиду (за исключением трипептидного участка 4-й петли BDNF, взаимодействующего с p75 рецептором), причем для образования активной поворотной конформации этот участок было необходимо заиклизовать. При наличии связывания с Trk рецепторами агонистическая активность достигалась путем объединения двух таких циклов в бивалентную структуру. Среди всех соединений самым активным было трициклическое соединение TDP6, протекторный эффект которого составлял 35% от эффекта самого нейротрофина.

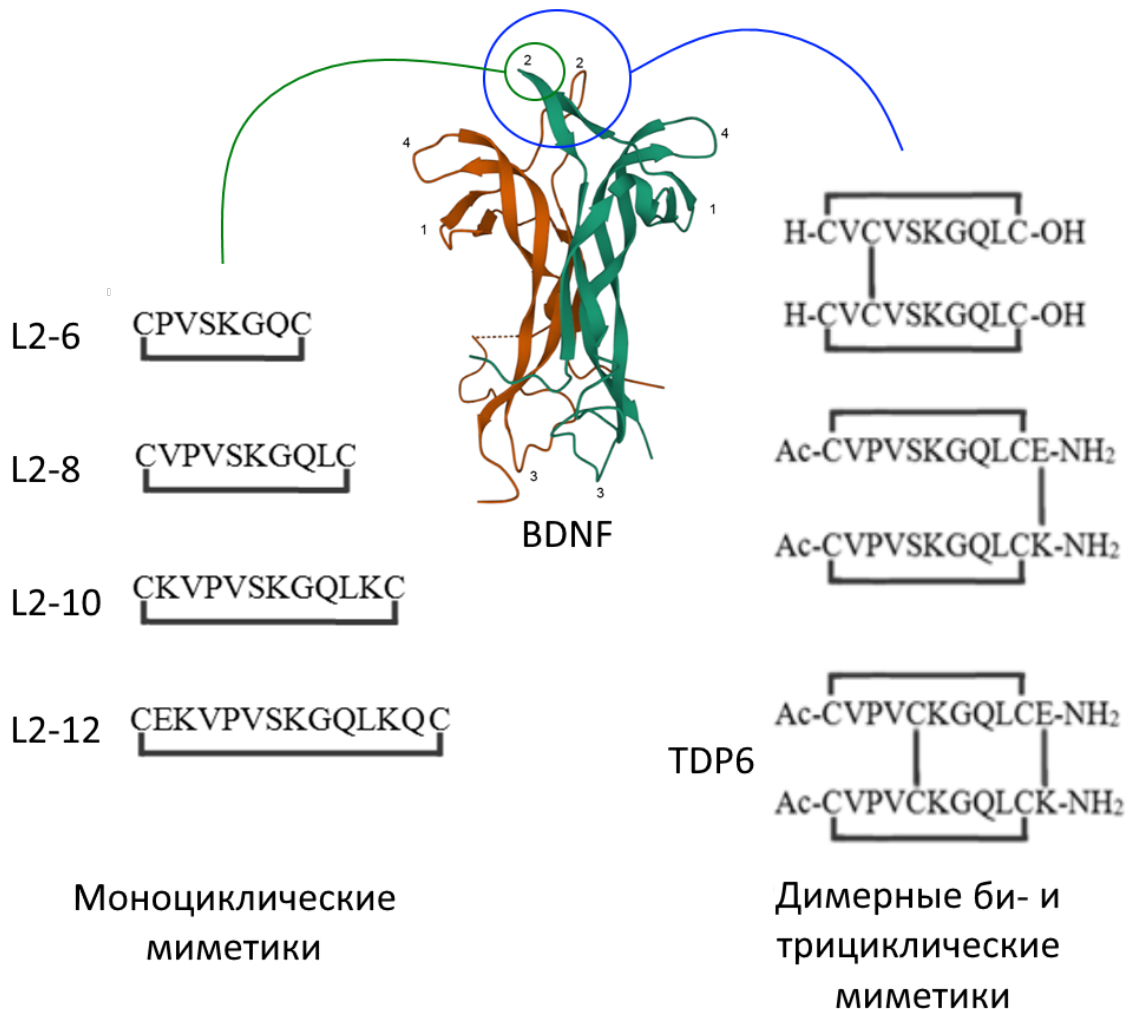


Рисунок 7 - Мономерные и димерные пептидные миметики BDNF

Группа исследователей из США сконструировала и синтезировала пять перспективных нейропротекторных лекарственных средств. Эти соединения представляют собой тетрапептиды B1-B5, соответствующие последовательностям а.к.о. 6-9, 71-74, 94-97, 72-75, 115-118 BDNF [27]. Пептидные последовательности были определены как эпитопы моноклональных антител к активным сайтам BDNF. Для сохранения протеолитической стабильности и блокирования концевых зарядов тетрапептиды переводили в амид по С-концу, по N-концу получали ацетильные производные (кроме соединения B5): B1 (Ac-RRGF-NH₂), B2 (Ac-IDKR-NH₂), B3 (Ac-SKKR-NH₂), B4 (Ac-DKRH-NH₂) и B5(H-IKRG-NH₂). Все пептиды умеренно активировали TrkB рецептор, вызывая фосфорилирование по остатку Tyr706. Неселективный ингибитор семейства Trk K252a блокировал активацию. Наиболее выраженным эффектом обладали пептиды B3 и B5, которые работали как частичные агонисты/антагонисты BDNF. Оба пептида аналогично BDNF в наномолярной концентрации стимулировали экспрессию нейрональных маркеров MAP2, β -III тубулина, NTM и NeuN, а в концентрациях 100-1000 нМ увеличивали жизнеспособность нейронов E18 (культура первичных нейронов гиппокампа мыши).

Группой датских ученых [52, 200] на основе последовательности а.к.о. BDNF, получены два пептидных лиганда рецепторов TrkB и p75. Авторы приводят гипотезу о важной роли 3-й и 4-й петель как наиболее пространственно экспонированных и, таким образом, участвующих во взаимодействии BDNF с рецептором. На основе последовательности остатков 3-й петли 69-76 (R⁶⁹GIDKRHW⁷⁶) сконструирован 11-членный пептид Бетрофин 3 (RGIDKRHWNSQ), а на основе последовательности, включающей 4-ю петлю (M⁹²DSKKRI⁹⁸) 16-ти членный пептид Бетрофин 4 (SYVRALTMDSKKRIGWR).

Методом поверхностного плазмонного резонанса было установлено, что оба бетрофина связываются и с TrkB, и с p75 рецепторами с аффинностью

примерно в 1000 раз ниже BDNF. Бетрофин 3 имеет следующие константы связывания – K_d (TrkB) = $1.8 \cdot 10^{-6}$ М, K_d (p75) = $4 \cdot 10^{-7}$ М), Бетрофин 4 - K_d (TrkB) = $1.3 \cdot 10^{-6}$ М, K_d (p75) = $2.1 \cdot 10^{-6}$ М. В этом же эксперименте BDNF - K_d (TrkB) = $5.4 \cdot 10^{-10}$ М, K_d (p75) = $8.7 \cdot 10^{-10}$ М, полученные значения K_d согласуются с ранее опубликованными [29, 190].

Пептиды бетрофин 3 и бетрофин 4 в микромолярных концентрациях в условиях *in vitro* экспериментов (первичная культура гранулярных нейронов мозжечка) увеличивали выживаемость клеток и усиливали рост нейритов. Рост нейритов концентрационно зависимо подавлялся в присутствии самого нейротрофина, который в условиях эксперимента (1–100 нг/мл) не проявлял нейритогенного эффекта. Оба бетрофина вызывали фосфорилирование киназ АКТ и ERK, при этом максимальный уровень активации сигнальных путей TrkB наблюдался в концентрациях 9-27 мкг/мл.

Исследовательская группа Вильямса [194] для конструирования пептидных миметиков, использовала данные о кристаллической структуре комплекса NT-4:TrkB [16]. В структуре нейротрофина-4 была выделена пептидная последовательность -SRRGELA-, участвующая в связывании с рецептором TrkB. Затем с С- и N-концов гептапептида были добавлены остатки цистеина, образующие циклическую структуру. N-конец циклопептида защищали ацетильным остатком, а С-конец переводили в амид, таким образом получали соединение Ac-CSRRGELAC-NH₂. Полученный конформационно жесткий циклический пептидный миметик связывался с TrkB и действовал как антагонист, блокируя взаимодействие как BDNF, так и NT-4 с рецептором [194].

Для получения миметика-агониста авторы сконструировали димеризованный циклический миметик следующей структуры - Ac-CSRRGELAASRRGELC-NH₂ (шифр BAG). Полученный пептид BAG дозозависимо стимулировал рост нейритов в культуре нейронов мозжечка 3Т3

с максимальным эффектом в концентрации $6 \cdot 10^{-6}$ М. Выраженность эффекта соответствовала действию нативных нейротрофинов BDNF и NT-4. Эффект BDNF и его миметика BAG полностью нивелировался ингибитором Trk-рецепторов K252a и ингибитором PI3K LY294002.

Группой итальянских исследователей под руководством Травальи [186] в качестве основы для конструирования миметиков BDNF был рассмотрен N-концевой участок нейротрофина. Были выбраны первые 12 а.к.о. H¹SDPARRGELSV¹², C-конец пептида амидировали (пептид HSDPARRGELSV-NH₂ под шифром BDNF(1-12)). Для усиления протеолитической стабильности по C-концу получали ацетилированное производное (шифр Ac-BDNF(1-12)). В эксперименте *in vitro* на культуре клеток нейробластомы SHSY5Y было показано наличие у миметиков пролиферативной активности (в концентрации 10^{-7} М), подобной нейротрофину BDNF. Более выраженным эффектом обладал ацетилированный миметик Ac-BDNF(1-12).

Созданы миметики и непептидной природы. Так, группа Лонго [120] разработала непептидные аналоги 2-й петли BDNF, исходя из данных [71, 72] о важности участка -Ser⁴⁵-Lys⁴⁶-Gly⁴⁷-Gln⁴⁸-Leu⁴⁹- для проявления активности нейротрофина, полученных с помощью химерных белков NGF/BDNF. На основе пространственной структуры участка 2-й петли Лонго сформулировал фармакофорную гипотезу. На основе гипотезы был проведен скрининг *in silico* более миллиона доступных соединений из химических библиотек, отобранные соединения дополнительно просеивали по критериям разницы энергии фармакофора и конформера соединения менее 10 ккал/моль, затем использовали критерии Липинского, значение молекулярной массы (был задан диапазон 500-600 дальтон), кроме того, рассматривалась стерическая доступность функциональных групп в структуре отобранных соединений. В итоге для семи прошедших отбор соединений был проведен анализ *in vitro* на гиппокампальных нейронах мыши E16. Нейротрофической активностью

обладали три соединения непептидной природы LM22A-2, LM22A-3 и LM22A-4 (рисунок 8). Протекторный эффект этих соединений составлял 80-89% от активности BDNF.

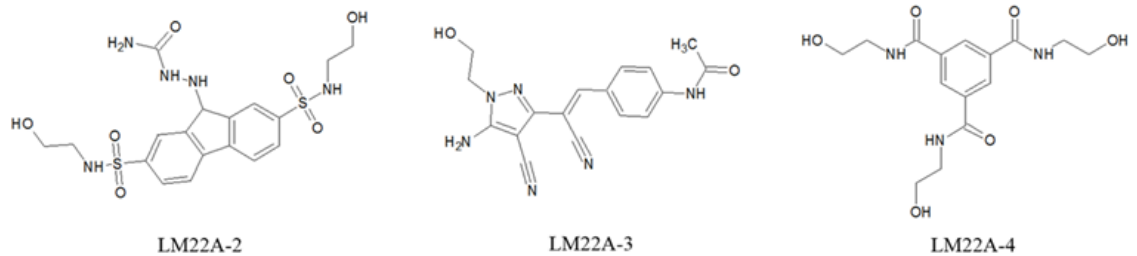


Рисунок 8 – Непептидные миметики 2-й петли BDNF с агонистической активностью [120]

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. Наиболее активное соединение с агонистической активностью LM22A-4 расширено изучали несколько групп исследователей. Были продемонстрированы целый ряд положительных нейропротекторных эффектов в животных моделях:

1. Восстанавливал моторные функции после экспериментальной травмы мозга у крыс (3.4 мкг, интраназально, 2 недели).
2. Снижал выраженность судорог, индуцированных пентилентетразолом на модели коркового посттравматического эпилептогенеза у крыс (50 мг/кг, в/б, 2 недели) [62].
3. Способствовал ремиелинизации, увеличению толщины миелиновой оболочки, увеличению плотности олигодендроцитов в мозолистом теле на модели рассеянного склероза, индуцированного купризоном на мышцах ($0.5 \cdot 10^{-4}$ M, внутримозговое, 1 неделя) [131].

4. Улучшал восстановление двигательных функций и усиливал нейрогенез (0.5 мг/мл, интраназально) после моделирования гипоксически-ишемического повреждения головного мозга у мышей [65].
5. Корректировал гиппокампальную дисфункцию, оказывая когнитотропные эффекты и восстанавливая нарушенную долговременную потенциацию у мышей с генетической моделью синдрома Ретта (50 мг/кг, в/б хроническое) [104]

В экспериментах *ex vivo* с использование изолированных брыжеечных артерий крыс был показан вазодилатирующий эффект LM22A-4 [185]. С помощью ингибиторного анализа было установлено, что этот эффект опосредован TrkB и PI3K/АКТ, но не MAPK/ERK.

Показаны эффекты агониста TrkB LM22A-4 в ряду *in vitro* экспериментов:

1. Увеличение выживаемости ганглиозных клеток сетчатки в экспериментах *in vitro* на моделях передней ишемической нейропатии зрительного нерва [8].
2. Показано, что LM22A-4, аналогично BDNF, регулирует дифференцировку цементобластов, осуществляющуюся через TrkB-ERK/АКТ сигнальный каскад. Исследование открывает новый лекарственный способ лечения пародонтоза [82].
3. LM22A-4 эффективно на моделях синдрома Ретта в экспериментах *in vitro* (0.5 мкМ) и *in vivo* (150 мг/кг, однократно в/б, мыши) [91, 120].

Соединение 7,8-дигидроксифлавонол (7,8-DHF) (рисунок 9) - низкомолекулярный агонист TrkB, который в настоящее время разрабатывается в качестве потенциального антидепрессанта исследовательской группой из Университета Эмори (США) [107, 211]. 7,8-

DHF был отобран из 2000 биологически активных соединений из базы Spectrum Collection Library. Выборка проводилась на основе *in vitro* скрининга нейропротекторной активности с использованием клеток, экспрессирующих TrkB [76].

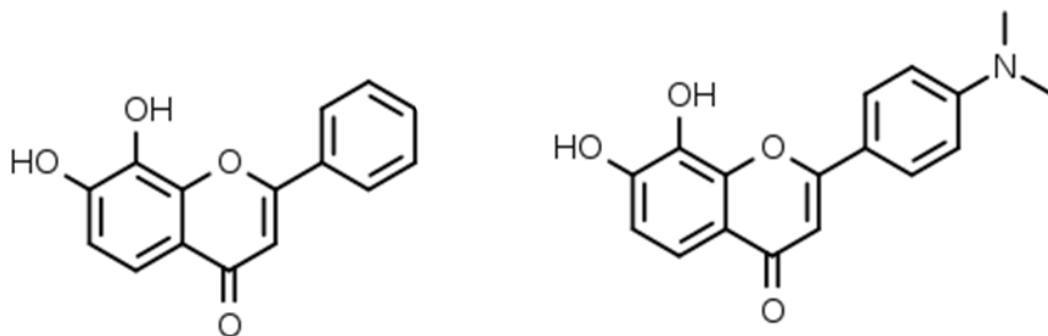


Рисунок 9 – Структура гидроксифлавона [76] и 4'-диметиламино-7,8-дигидроксифлавона (4'-DMA-7,8-DHF) [107]

7,8-DHF продемонстрировал нейропротекторную активность на первичной культуре человеческих нейронов в условиях окислительного стресса [76]. С использованием иммунофлуоресцентного анализа и Вестерн-блота было показано, что 7,8-DHF, в отличие от других производных флавоноидов, вызывает фосфорилирование TrkB в гиппокампальных нейронах. 7,8-DHF также активировал АКТ и ERK1/2. Эти результаты были подтверждены ингибиторным анализом. Фосфорилирование TrkB под действием 7,8-DHF блокировалось K252a. Нейропротекторная активность 7,8-DHF *in vitro* блокировалась ингибиторами MEK или PI3K..

7,8-DHF проявил активность в ряду *in vivo* моделей неврологических и психических заболеваний, таких как болезнь Паркинсона [112], Хантингтона [55] и Альцгеймера [30, 210] рассеянный склероз [116], синдром Ретта [80], шизофрения [203], ишемический инсульт [189].

У соединения 7,8-DHF были выявлены антидепрессивные свойства. На модели хронического умеренного стресса у мышей 7,8-DHF (10-20 мг/кг, в/б,

28 дней) 7,8-DHF восстанавливал сниженный уровень фосфорилирования TrkB и активировал экспрессию синаптических маркеров PSD95 и синаптофизина [211]. При хроническом введении 7,8-DHF (5 мг/кг, перорально, 21 день) значительно увеличивал пролиферативную активность нейрональных стволовых клеток в зубчатой извилине гиппокампа у взрослых мышей [107].

Этой же группой исследователей был синтезирован аналог 7,8-DHF - 4'-диметиламино-7,8-дигидроксифлавоон (4'-DMA-7,8-DHF), превосходящий природный 7,8-DHF в способности активировать TrkB [175] (рисунок 10).

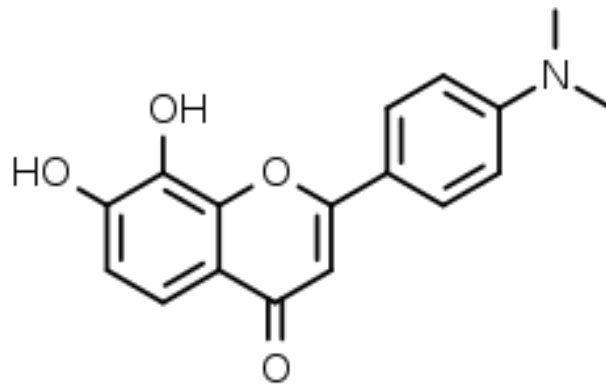


Рисунок 10 – Структура 4'-диметиламино-7,8-дигидроксифлавоона (4'-DMA-7,8-DHF) [107]

4'-DMA-7,8-DHF проявляет нейропротекторные эффекты на генетической модели болезни Хантингтона у мышей [78]. Хроническое пероральное введение через желудочный зонд 7,8-DHF (5 мг/кг) или 4'-DMA-7,8-DHF (1 мг/кг) уменьшало выраженность атрофии головного мозга, корректировало двигательные нарушения и увеличивало выживаемость животных.

У соединения 7,8-DHF были выявлены антидепрессивные свойства. На модели хронического умеренного стресса у мышей 7,8-DHF (10-20 мг/кг, в/б, 28 дней) ослаблял агедонию в тесте предпочтения раствора сахара,

восстанавливал сниженный уровень фосфорилирования TrkB и активировал экспрессию синаптических маркеров PSD95 и синаптофизина [211]. При хроническом введении 7,8-DHF (5 мг/кг, перорально, 21 день) значительно увеличивал пролиферативную активность нейрональных стволовых клеток в зубчатой извилине гиппокампа у взрослых мышей [107].

Исследовательской группой из Университета Эмори [77] с помощью *in vitro* скрининга, на ряду с 7,8-DHF был найден агонист TrkB - природный тетранортритерпеноид дезоксигедунин (рисунок 11).

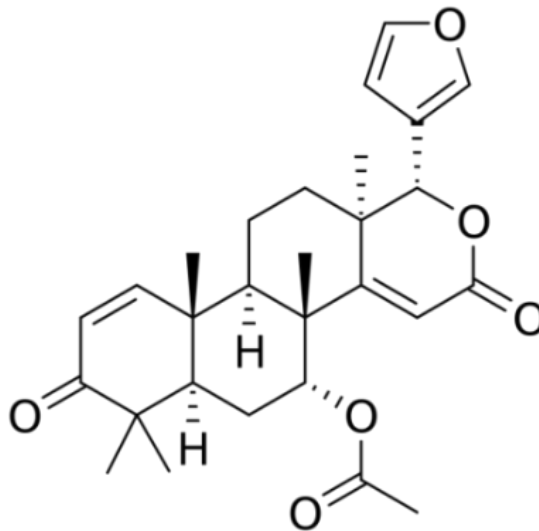


Рисунок 11 – Структура дезоксигедунина [77]

TrkB-зависимый механизм действия дезоксигедунина был подтвержден *in vitro* и *in vivo* с использованием нейрональных культур, лишенных TrkB и трансгенных мышей с дефицитом этого рецептора. Установлено, что дезоксигедунин предотвращает дегенерацию вестибулярного ганглия у детенышей трансгенных BDNF $-/-$ мышей.

Дезоксигедунин эффективен при пероральном введении. Для дезоксигедунина продемонстрирован целый ряд положительных эффектов в исследованиях *in vivo*:

1. Антидепрессант-подобные и когнитотропные эффекты.
2. Нейропротекторные эффекты в отношении дофаминергических нейронов у мышей с паркинсоническим синдромом, индуцированным внутрибрюшинным введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (MPTP) (диоксигедунин 5 мг/кг, в/б, 2 недели) [132].
3. Значительное улучшение двигательных функций у крыс с гемипаркинсонизмом, индуцированным введением 6-гидроксидофамина в стриатум [132].
4. Препятствует накоплению β -амилоида и гиперфосфорилированного белка тау в головном мозге, способствует снижению окислительного стресса на модели болезни Альцгеймера у крыс, вызванной введением *D*-галактозы и хлорида алюминия [31].

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, скрининг по библиотеке биологически активных природных соединений, рентгеноструктурные данные по *N*-концевому участку цепи BDNF

Как было показано, BDNF является перспективной терапевтической мишенью. Однако применение нативного нейротрофина в клинике ограничено его неудовлетворительными фармакокинетическими свойствами: нестабильностью в биологических жидкостях, низкой способностью проникать через ГЭБ, а также плейтропностью. Эти проблемы могут быть решены с помощью низкомолекулярных миметиков BDNF.

На сегодняшний день в мире созданы как непептидные, так и пептидные миметики. Коротким пептидам, особенно дипептидам, присуща повышенная

энзиматическая стабильность, дающая возможность перорального использования. В связи с важностью коротких физиологически активных пептидов как основы для создания нового поколения лекарственных веществ развитие новых подходов к их поиску представляется актуальным.

В лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» под руководством д.б.н., профессора, член-корр. РАН Татьяны Александровны Гудашевой на основе оригинальной гипотезы о том, что фармакофорными участками нейротрофинов являются центральные дипептидные фрагменты бета-изгибов петлеобразных структур полипептидной цепи, была разработана новая технология создания низкомолекулярных миметиков нейротрофинов – дипептидных агонистов Trk-рецепторов. С ее помощью были созданы дипептидные миметики NGF [18, 63, 169]. Данная работа посвящена развитию этого оригинального подхода и изучению биологических эффектов *in vitro* дипептидных миметиков нейротрофина BDNF.

2.9 Конструирование пептидных миметиков BDNF.

Подобно другим членам нейротрофинового семейства BDNF представляет собой симметричный гомодимер, мономерные единицы которого содержат 7 β -тяжей, связанных тремя экспонированными в растворитель шпилькообразными петлями – петли 1 (остатки 28—36), 2 (43—49) и 4 (92—98) [154].

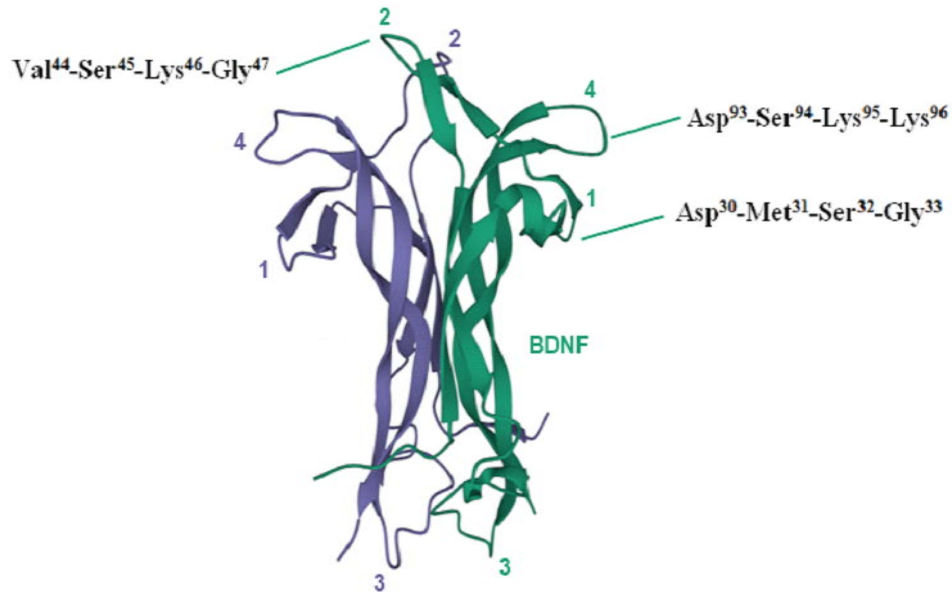


Рисунок 12 – Структура гетеродимера BDNF (PDB ID: 1bnd)

Указано положение бета-изгибов петель 1, 2, 4 BDNF

Путем визуального анализа этой структуры было обнаружено, что наиболее экспонированными в растворитель являются бета-изгибы 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF -Asp³⁰-Met³¹-Ser³²-Gly³³-, -Val⁴⁴-Ser⁴⁵-Lys⁴⁶-Gly⁴⁷- и -Asp⁹³-Ser⁹⁴-Lys⁹⁵-Lys⁹⁶-. В свою очередь, наиболее экспонированное и, следовательно, предположительно геометрически наиболее выгодное для взаимодействия с рецептором положение занимают центральные дипептидные фрагменты бета-изгибов этих петель: -Met³¹-Ser³²-, -Ser⁴⁵-Lys⁴⁶-, -Ser⁹⁴-Lys⁹⁵-. Поэтому в качестве основы для моделирования были выбраны последовательности этих бета-изгибов, и их центральные фрагменты были нами полностью сохранены.

Для воспроизводства активной конформации миметики петель нейротрофинов обычно получают путем ковалентной циклизации их фрагментов. Был использован другой подход, апробированный ранее при получении дипептидных миметиков фактора роста нервов [2] и состоящий в получении амидов N-ацилдипептидов, которые в растворе часто

воспроизводят конформацию β -изгиба, стабилизированную внутримолекулярной водородной связью [1]. Дипептид по своей последовательности совпадал с центральным фрагментом β -изгиба петли, а предшествующий ему аминокислотный остаток был заменен его биоизоостером. В данном случае остаток аспарагиновой кислоты Asp⁹³ или Asp³⁰ был заменен на остаток янтарной кислоты. Последующий за центральным фрагментом аминокислотный остаток был представлен амидной группой.

В результате был сконструирован миметик β -изгиба 4-й петли BDNF HO–Suc–Ser–Lys–NH₂ (ГСБ-104) и миметик β -изгиба 1-й петли HO–Suc–Met–Ser–NH₂ (ГСБ-207).

Поскольку BDNF взаимодействует с рецептором TrkB в димерной форме, миметики бета-изгиба были димеризованы с помощью гексаметилендиамина или гептаметилендиамина. Ранее, для аналогичных миметиков NGF было показано, что эти спейсеры являются оптимальными, так как уменьшение длины до пентаметилендиамина приводило к уменьшению и далее – к обращению активности, а удлинение не увеличивало биологическую активность [6].

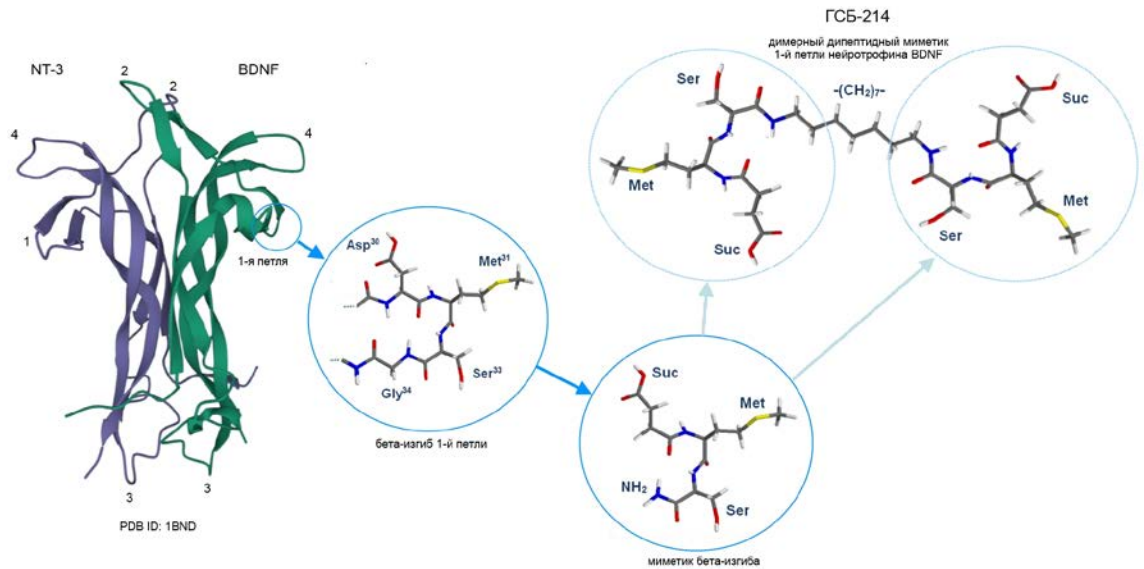


Рисунок 13 – Конструирование дипептидного миметика 1-ой петли BDNF ГСБ-214 – гептаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-*L*-метионил-*L*-серина)

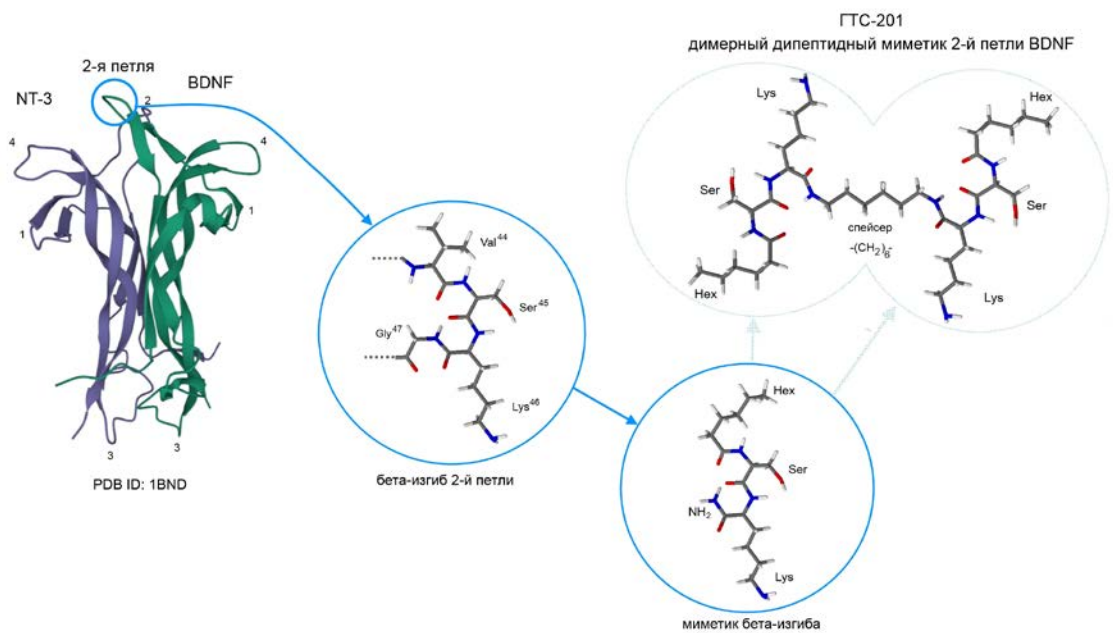


Рисунок 14 – Конструирование дипептидного миметика 2-ой петли BDNF ГТС-201 – гексаметилендиамида бис-(*N*-гексаноил-*L*-серил-*L*-лизина)

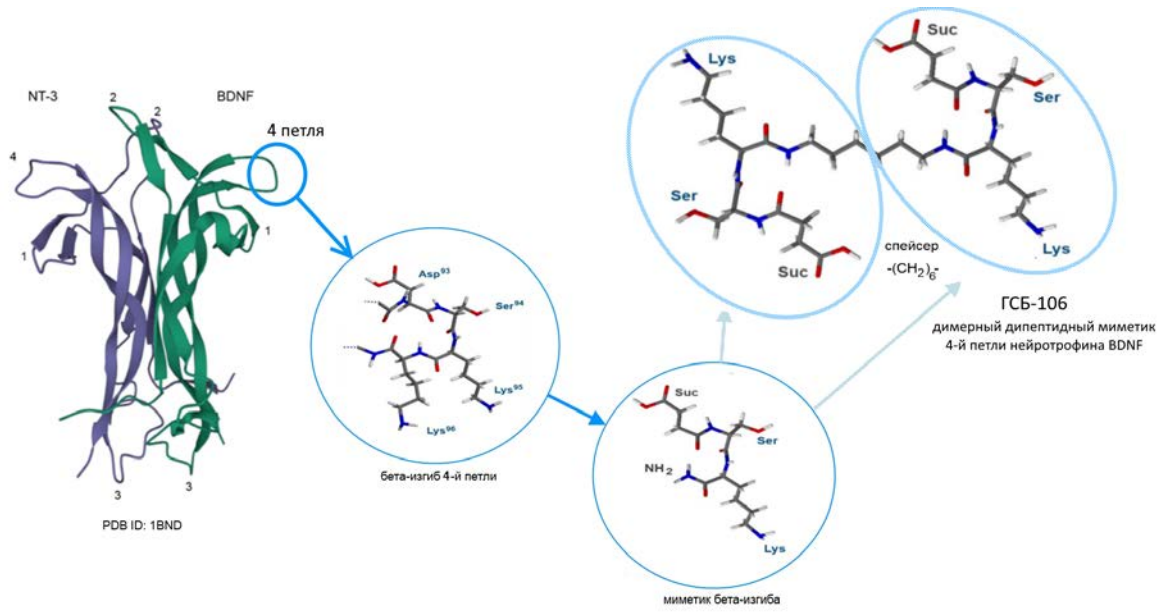


Рисунок 15 – Конструирование дипептидного миметика 4-ой петли BDNF ГСБ-106 – гексаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина)

Таким образом, были сконструированы два мономерных и три димерных миметика BDNF.

Таблица 1 – Структура и физико-химические свойства миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF

Шифр	Миметик	Структура	Свойства
ГСБ-207	Мономерный миметик 1-й петли BDNF	Suc-Met-Ser-NH₂	T _{пл.} =101-105°C МВ=335,4 [α] ²⁰ _D - 14.25 (с 0.4; MeOH)
ГСБ-214	Димерный миметик 1-й петли BDNF	(Suc-Met-Ser-NH-)₂(CH₂)₇	T _{пл.} =162-163°C МВ=766,9 [α] ²⁵ _D + 9.0 (с 0.4; DMF)
ГТС-201	Димерный миметик 2-й петли BDNF	(Hex-Ser-Lys-NH-)₂(CH₂)₆	T _{пл.} =110-125°C МВ=743,0 [α] ²⁵ _D - 14.9 (с 0.6; MeOH)
ГСБ-104	Мономерный миметик 4-й петли BDNF	Suc-Ser-Lys-NH₂	T _{пл.} =136-138°C МВ=332,3 [α] ²⁰ _D - 15.75 (с 0.4; DMF)
ГСБ-106	Димерный миметик 4-й петли BDNF	(Suc-Ser-Lys-NH-)₂(CH₂)₆	T _{пл.} =143-145°C МВ=746,85 [α] ²⁵ _D - 44.5 (с 1; вода)

Синтез пептидов проводили методом активированных эфиров и очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Структура пептидов и их диастереомерная чистота были доказаны методом ¹H-ЯМР. Вещества охарактеризованы физико-химическими константами (Табл.). Все соединения были хорошо растворимы в воде [63].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Материалы и методы исследования

Исследования проводились на клетках линии НТ-22 (иммортиализованные клетки гиппокампа) подарок профессора Ф. Виеганта из Утрехтского университета (Голландия), а также на клетках нейробластомы человека линии SH-SY5Y из Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН.

Иммортиализованные клеточные линии, полученные из определённых тканей, являются ценным инструментом для изучения молекулярных и клеточных процессов, происходящих в этих тканях. Линейные клетки представляют собой недорогой, быстрый и простой способ выявления и изучения молекулярных и клеточных механизмов, которые было бы сложнее, труднее, а иногда и вовсе невозможно исследовать *in vivo*.

НТ-22 – это иммортиализованная линия клеток гиппокампа мыши, полученная путём субклонирования из линии клеток НТ-4. Родительская линия клеток НТ-4 была получена в результате иммортализации тканей нейронов мыши с помощью чувствительного к температуре Т-антигена SV40. НТ-22 является одной из широко используемых в различных исследованиях линий нейрональных клеток гиппокампа. Клетки НТ-22 очень чувствительны к глутамату и поэтому часто используется в качестве модельной системы для изучения токсического воздействия глутамата на нейроны [106]. В клетках НТ-22 экспрессируются специфические нейротрофиновые тирозинкиназные рецепторы TrkA [198] и TrkB [108].

Клетки нейробластомы человека линии SH-SY5Y широко используются в качестве модели дофаминовых нейронов для исследования болезни Паркинсона поскольку обладают многими их свойствами. В них экспрессируются тирозингидроксилаза, дофамин бета-гидроксилаза, дофаминовый транспортер, нейрофиламенты, дофаминовые, опиоидные,

мускариновые рецепторы, а также рецепторы для NGF [32]. По литературным данным SH-SY5Y используют для экспериментальных нейробиологических исследований, включая анализ нейрональной дифференцировки, метаболизма, нейроадаптивных и нейродегенеративных процессов, нейротоксичности и нейропротекции [199].

В работе использованы низкомолекулярные дипептидные миметики мозгового нейротрофического фактора BDNF – ГСБ-207 (мономерный дипептидный миметик 1-й петли), ГСБ-214 (димерный дипептидный миметик 1-й петли), ГТС-201 (димерный дипептидный миметик 2-й петли), ГСБ-104 (мономерный дипептидный миметик 4-й петли) и ГСБ-106 (димерный дипептидный миметик 4-й петли), синтезированные в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», культуральную среду ДМЕМ (ICN, HyClone), ростовую сыворотку (FBS (ICN)), фосфатно-солевой буфер (PBS (Sigma)), поли-L-лизин гидробромид, поли-D-лизин гидробромид (ICN), МТТ-реагент (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид ((ICN)), диметилсульфооксид (DMSO) (ICN), NGF (Sigma), Tris (Serva), ингибиторный протеазный коктейль (Biomol, Sigma), реактив Фолина (Merck), бычий сывороточный альбумин (Sigma), додецилсульфат натрия (SDS), Tween-20, Темед, бис-акриламид (Bio-Rad), ингибиторный протеазный коктейль (Bio-Rad), реактив Фолина (Merck). Первые антитела на HSP70, HSP32, NGF, p-TrkA, p-Akt1/2/3, p-ERK (Santa Cruz Biotechnology, Stressgen, Abcam). Вторые антитела (Santa Cruz Biotechnology, Abcam). Культуральные флаконы, пробирки, планшеты (Corning and Costar).

3.2 Культивирование клеток.

Все манипуляции с клетками выполнялись в строго стерильных условиях. Клетки культивировали при температуре 37°C, 5% CO₂ в среде ДМЕМ (Dulbecco's modified Eagle's medium), содержащей 5% FBS (фетальной бычьей сыворотки) для клеток линий НТ-22 и 10% FBS для нейробластомы

человека линии SH-SY5Y, 2мМ L-глутамин. Смену культуральной среды производили через 24 часа после посева и каждые последующие 3 дня. Посев на культуральные флаконы общей площадью 75см² («Costar-Corning») осуществляли каждую неделю.

3.3 Подготовка культуральных планшетов.

Эксперименты проводили с использованием 96-ти и 6-луночных культуральных планшетов. Лунки покрывали в течение 30 минут раствором поли-L-лизина или поли-D-лизина (0,1 мг/мл). Затем лунки промывали трижды стерильной деионизированной водой и высушивали в ламинарном боксе при комнатной температуре.

3.4 Посев клеток на культуральные планшеты.

После достижения монослоя клетки считали в камере Горяева и рассеивали с плотностью 3,5 тыс. на лунку в 96-луночные планшеты и 280 тыс. на лунку в 6-луночные планшеты. Клетки рассеивали в среде ДМЕМ с 5% или 10% сывороткой FBS. Эксперименты проводились на 3 день после пассажа. Клетки культивировались до образования монослоя.

3.5 Модель окислительного стресса.

Окислительный стресс является одним из центральных звеньев нейродегенеративных процессов. Индукция окислительного стресса в культуре клеток одна 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 нейропротекторов.

Исследование проводили на клетках линии НТ-22. Культивирование и посев клеток производили, как показано выше. После достижения монослоя окислительный стресс моделировали путем внесения в культуральную среду

свежеприготовленный раствор H_2O_2 в конечной концентрации 1,5 мМ и инкубировали в течение 30 минут при 37°C и 5% CO_2 . После этого культуральную среду, содержащую перекись водорода, заменяли на нормальную среду и инкубировали в течение 4 часов в аналогичных условиях [75]. Жизнеспособность клеток определяли через 4 часа с использованием МТТ-теста.

Пептиды вносили в культуральную среду в конечных концентрациях 10^{-5} – 10^{-10} М за 24 часа до или после повреждения клеток. В качестве положительного контроля использовали BDNF 50 нг/мл ($\sim 10^{-9}$ М).

3.6 Методика оценки пролиферативной активности

Пролиферативную активность исследуемых миметиков определяли с использованием МТТ-теста. Гиппокампальные нейроны НТ-22 инкубировали с ГСБ-106, ГСБ-214 и ГТС-201 (10^{-5} – 10^{-8} М) в течение 48 и 72 часов, после чего среду удаляли, в лунки вносили раствор МТТ. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре “Multiscan EX” (Thermo, США) при длине волны 600 нм.

3.7 Модель глутаматной токсичности

Эта модель является наиболее часто используемой, так как повреждение нейронов по механизму глутаматной эксайтотоксичности вносит основной вклад в гибель нейронов при ишемии.

Глутаматную токсичность моделировали на культуре иммортализованных клеток гиппокампа линии НТ-22 внесением в культуральную среду глутаминовой кислоты в конечной концентрации 5 мМ [179]. Глутаминовую кислоту добавляли в культуральную среду и инкубировали 24 часа при 37°C и 5% CO_2 . После этого меняли среду на нормальную и определяли жизнеспособность клеток через 24 часа с использованием МТТ-теста. ГСБ-106 вносили в те же временные диапазоны, что и при моделировании окислительного стресса.

3.8 Моделирование болезни Паркинсона в культуре клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y.

Для моделирования болезни Паркинсона в культуре клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y применялся нейротоксин 6-гидроксидофамин, который используется как экспериментальная модель дегенерации дофаминергических нейронов *in vitro*. 6-гидроксидофамин вносили в клеточную среду в конечной концентрации 100 мкМ [152] через 24 часа после пассажа клеток. Затем клетки инкубировали в течение 24 часов. После этого среду с нейротоксином отбирали, заменяли на обычную без 6-гидроксидофамина. ГСБ-106 добавляли в клеточную среду за 24 часа до 6-гидроксидофамина или после него. Жизнеспособность клеток определяли через 24 часа с использованием МТТ-теста.

3.9 Методы оценки жизнеспособности нейронов в культуре.

Определение жизнеспособности клеток проводили с использованием МТТ-теста. МТТ - тест отражает энергетическое состояние клетки (митохондриальное дыхание) и уровень обменных процессов, т.е. жизнеспособность клеток. МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромид) представляет собой водорастворимую соль тетразолия желтого цвета, легко проникающую в клетки. В живых клетках МТТ превращается в нерастворимые в воде кристаллы формазана фиолетового цвета. По окончании реакции их растворяют в органических растворителях (изопропанол, диметилформамиде, диметилсульфооксиде) и измеряют поглощение на спектрофотометре.

По окончании эксперимента среду культивирования заменяли раствором МТТ (0,5 мг/мл) и инкубировали 30 минут при температуре 37°C. Затем отбирали раствор МТТ из лунок и добавляли для растворения формазана DMSO (диметилсульфооксид). Через 15 минут измеряли светопоглощение на спектрофотометре "Multiscan" (Thermo) при длине волны 600 нм.

3.10 Методика Вестерн-блот анализа.

Содержание TrkB, p-TrkB, Akt1/2/3, p-Akt1/2/3, Erk1/2, p-Erk1/2, PLC γ , p-PLC γ , HSP32, NGF определяли с использованием метода Вестерн-блот анализа. Клетки отмывали от культуральной среды раствором PBS. Затем клетки лизировали в буфере (50 mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 1mM DTT, 1% Triton X-100), pH 7,5 при температуре 4°C, после этого снимали с пластика, помещали в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировали 10 минут при 13000 rpm и 4°C. Белки разделяли в 8-12% полиакриламидном геле (ПААГ). Перенос белков с ПААГ на мембрану PVDF осуществляли электроэлюцией в течение 45-55 минут. Преинкубацию Вестерн-блотов проводили в буфере TBS-T (с добавлением 1% Tween-20) с 5% (вес/объем) обезжиренным молоком или 3% BSA в течение 2 часов. Затем мембраны инкубировали в присутствии первых поликлональных антител против TrkB, p-TrkB, Akt1/2/3, p-Akt1/2/3, Erk1/2, p-Erk1/2 (Invitrogen), PLC γ , p-PLC γ (Cell Signaling) при разведении 1:1000, первых моноклональных антител против HSP32 (Stressgen) и NGF (Santa Cruz Biotechnology) при разведение 1:1000 в течение 1 часа. Затем после отмывки в буфере TBS-T (с добавлением 1% Tween-20) мембраны инкубировали в присутствии вторых антител (Invitrogen), конъюгированных с пероксидазой хрена (разведение 1: 1000) в течение 1 часа. Детектирование белков осуществляли после отмывки от вторых антител в буфере TBS-T (с добавлением 1% Tween-20) в реакции с ECL-реагентами (ThermoFisher Scientific) с использованием гель-документирующей системы Alliance UVITEC. Денситометрию полученных изображений проводили с помощью программы GIMP2.

3.11 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в пакете программ Prism 3,0 с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и критерия Краскела-Уоллиса с последующим тестом по Данну и U-критерия Манна-Уитни, для обработки выбросов - программы

анализа статистических данных AtteStat (автор И. Гладышев) с использованием правила Томпсона. Данные представлены с указанием стандартного отклонения $\text{mean} \pm \text{s.d.}$. Результаты считались достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Изучение нейропротекторного действия ГСБ-104, ГСБ-106, ГСБ-207, ГСБ-214 и ГТС-201 на модели окислительного стресса в культуре гиппокампальных клеток линии НТ-22

Механизму окислительного стресса придается особая роль при различных неврологических заболеваниях – нейродегенеративных (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона), сосудистых, а также при нормальном старении [96]. В настоящее время существуют экспериментальные данные, свидетельствующие о роли окислительного стресса в патогенезе сосудистой деменции [213]. Головной мозг является весьма уязвимой целью для свободно-радикального поражения. Он содержит большое число липидов, являющихся субстратом свободно-радикальных реакции, а также ионов железа, являющихся катализатором подобных реакции. Помимо увеличения образования избыточного количества свободных радикалов, имеет значение патология антиоксидантной системы. Так, исследования, проведенное С.Д.Фой и соавт. [53], показало, что у пациентов с деменцией сосудистого и первично-дегенеративного генеза имеется снижение ряда антиоксидантов, особенно витаминов А, С и Е, в сыворотке крови. Роль оксидативного стресса с образованием продуктов перекисного окисления липидов в патогенезе болезни Альцгеймера подтверждается клиническими и экспериментальными данными [24]. Окислительный стресс может нарушать метаболизм белка-предшественника β -амилоида в стенках церебральных артерий и капилляров является одним из характерных проявлений болезни Альцгеймера и само по себе может приводить вследствие нейротоксичности к увеличению образования свободных радикалов.

Окислительный стресс является важным звеном повреждения нейронов при различных нейродегенеративных заболеваниях, в том числе при ишемическом инсульте. Причиной окислительного стресса могут быть увеличение продукции клеточных оксидантов: свободных радикалов

(супероксиданион – O_2^- , гидроксид радикал – OH^\cdot , гидроперокси радикал – HO_2^\cdot , NO^\cdot - радикал, пероксинитрит – $ONOO^-$) или снижение защитных свойств антиоксидантной системы (ферментативной - супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и не ферментативной – глутатиона, аскорбиновой кислоты, токоферола) [83]. Увеличение свободных радикалов в ткани мозга при ишемии приводит к образованию липидных гидроперекисей и изменению свойств клеточной мембраны. В случае, если образование свободных радикалов не будет остановлено системой антиоксидантной защиты, окислительный стресс приводит к гибели клеток.

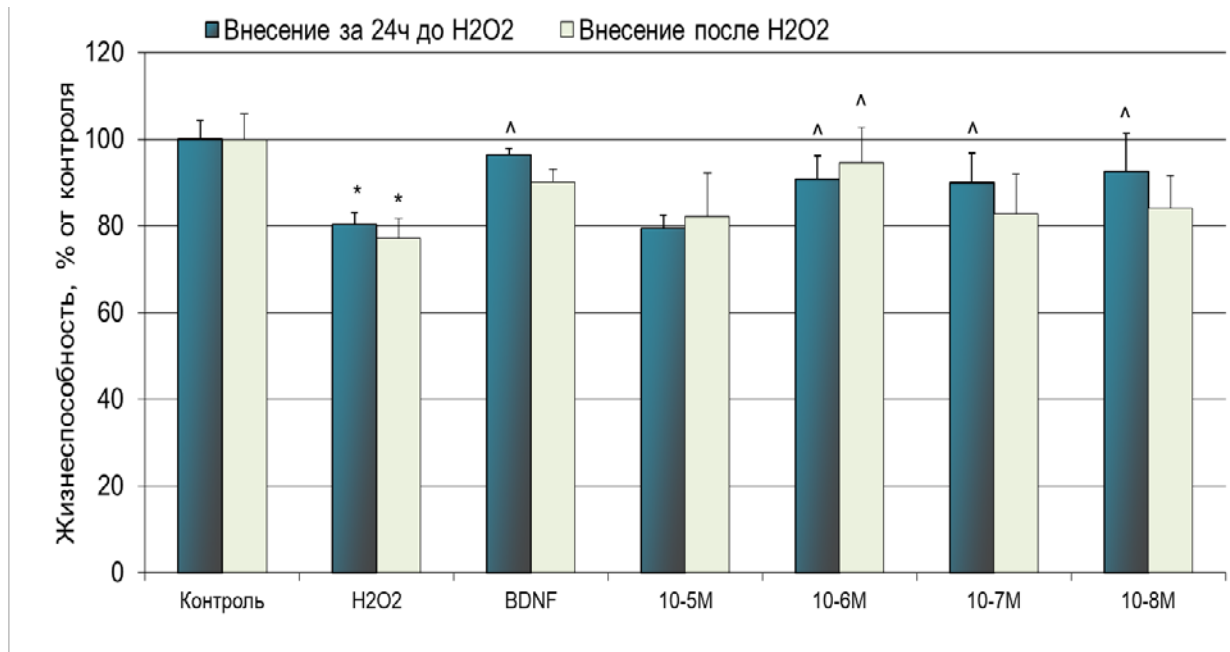
В данное время можно считать доказанным вовлечение окислительного стресса в механизм повреждения мозга при ишемии, нейродегенеративных заболеваниях и других патологических состояниях. Показано, что мозговой нейротрофический фактор BDNF проявляет антиоксидантные свойства.

Эксперименты проводили на гиппокампальных клетках линии HT-22, поскольку исследования Nota et al. [69] показали, что гиппокампальные нейроны повреждаются в большей степени при оксидативном стрессе, чем нейроны мозжечка и префронтальной коры. Окислительный стресс моделировали путем внесения в культуральную среду перекиси водорода в конечной концентрации 1,5 мМ. Обработка H_2O_2 гиппокампальных клеток HT-22 активирует токсические внутриклеточные механизмы, что приводит к увеличению интенсивности свободно-радикального окисления, нарушению функционирования митохондрий и, в конечном итоге, к гибели клеток [150].

Ранее нами было исследовано нейропротекторное действие всех полученных дипептидных миметиков BDNF на модели окислительного стресса при внесении их за 24 часа до повреждающего воздействия. Миметики 1-й петли – ГСБ-214, 2-й петли – ГТС-201 и 4-й петли – ГСБ-106 проявляли нейропротекторную активность в концентрациях 10^{-5} - 10^{-8} М. Наибольший эффект ГСБ-106 показал в концентрации 10^{-8} М, ГСБ-214 в 10^{-7} М, а ГТС-201 в

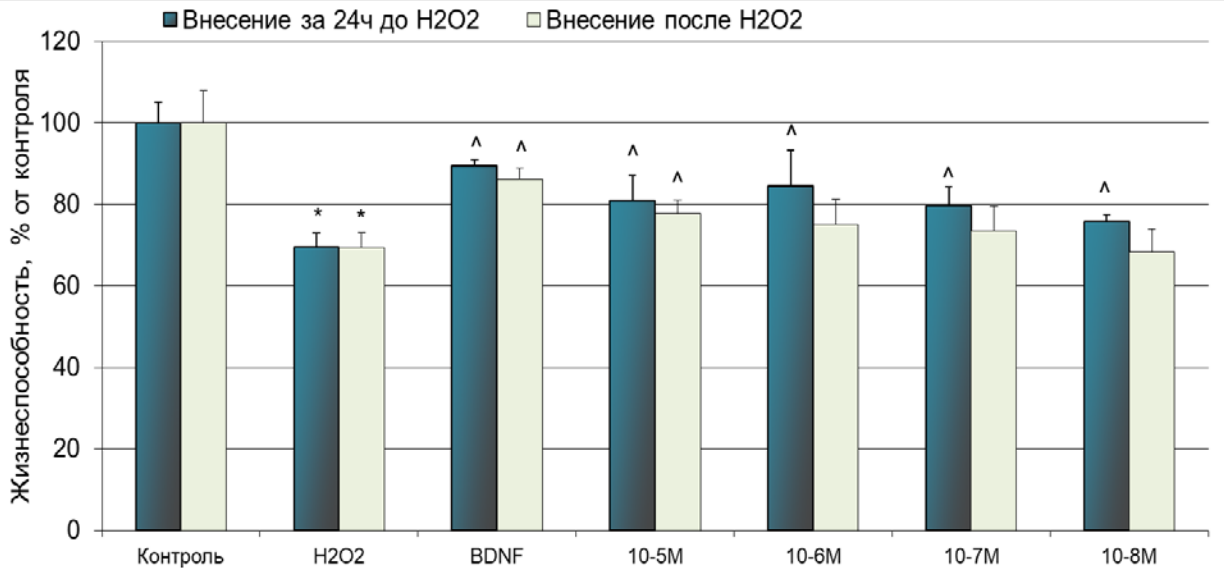
10^{-5} М. Мономерный миметик 4-й петли ГСБ-104 уменьшал жизнеспособность нейронов. Это может быть связано с его антагонизмом в отношении эндогенного BDNF. Мономерный миметик 1-й петли ГСБ-207 был неактивен.

На первом этапе нами была проведена серия экспериментов, в которой пептиды вносили сразу после окислительного стресса.



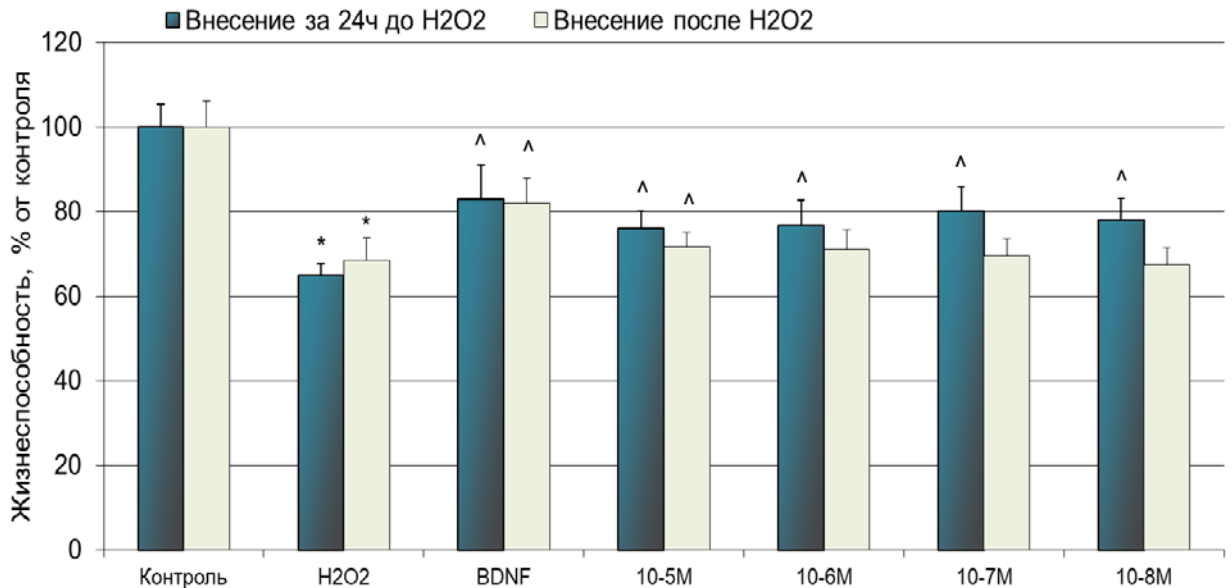
Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Краскелла–Уоллиса с последующем тесту по Данну): * – относительно контроля, ^ – относительно повреждения перекисью водорода, $n=16$.

Рисунок 16 – Влияние различных концентраций ГСБ-106 на жизнеспособность гиппокампальных нейронов линии НТ-22 на модели оксидативного стресса (результаты МТТ-теста)



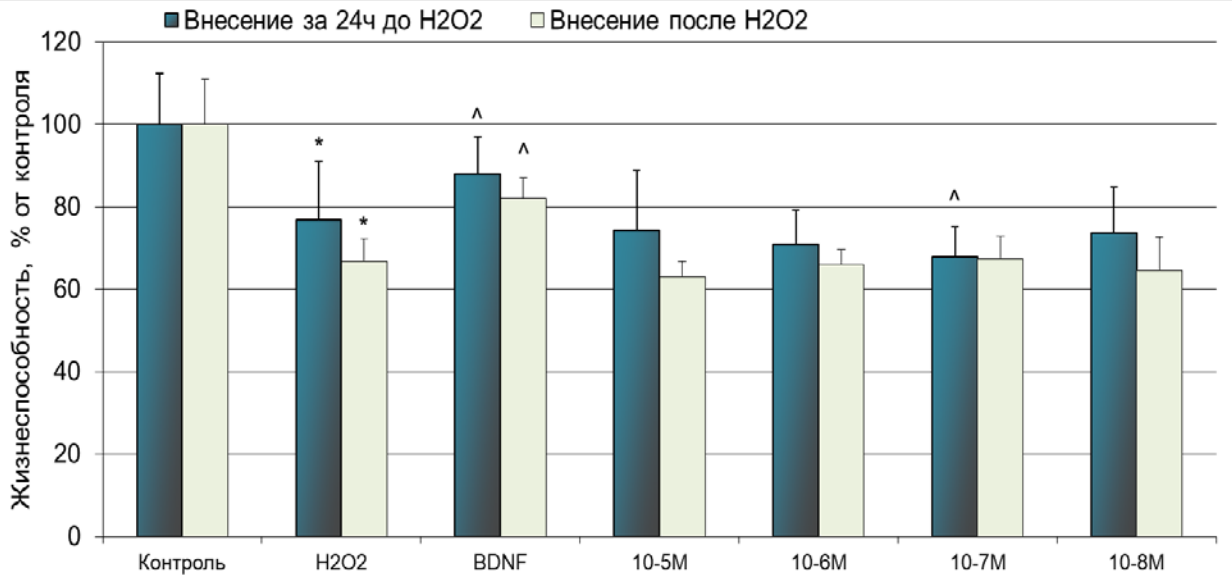
Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Краскелла–Уоллиса с последующим тестом по Данну): * – относительно контроля, ^ – относительно повреждения перекисью водорода, $n=16$.

Рисунок 17 – Влияние различных концентраций ГСБ-214 на жизнеспособность гиппокампальных нейронов линии HT-22 на модели оксидативного стресса (результаты МТТ-теста)



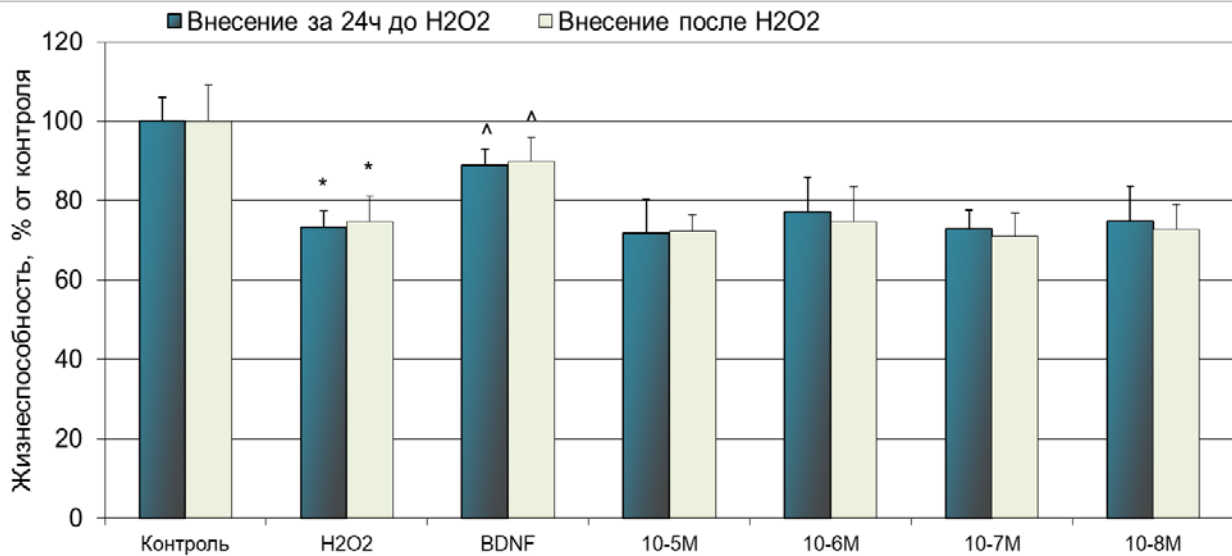
Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Краскелла–Уоллиса с последующим тестом по Данну): * – относительно контроля, ^ – относительно повреждения перекисью водорода, $n=16$.

Рисунок 18 – Влияние различных концентраций ГТС-201 на жизнеспособность гиппокампальных нейронов линии HT-22 на модели оксидативного стресса (результаты МТТ-теста)



Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Краскелла–Уоллиса с последующем тесту по Данну): * – относительно контроля, ^ – относительно повреждения перекисью водорода, n=16.

Рисунок 19 – Влияние различных концентраций ГСБ-104 на жизнеспособность гиппокампальных нейронов линии НТ-22 на модели оксидативного стресса (результаты МТТ-теста)



Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Краскелла–Уоллиса с последующем тесту по Данну): * – относительно контроля, ^ – относительно повреждения перекисью водорода, n=16.

Рисунок 20 – Влияние различных концентраций ГСБ-207 на жизнеспособность гиппокампальных нейронов линии НТ-22 на модели оксидативного стресса (результаты МТТ-теста)

Полученные данные показывают, что BDNF ограничивал повреждающее действие перекиси водорода. Сходными эффектами обладали димерные дипептидные миметики, однако нейропротекторные эффекты проявлялись в более высокой концентрации ГСБ-106 в 10^{-6} М, а ГСБ-214 и ГТС-201 в 10^{-5} М.

При внесении за 24 часа протекторное действие пептидов может быть связано с синтезом защитных систем клетки *de novo*, а при добавлении пептидов после повреждения может обеспечиваться активацией пула уже имеющихся в клетке систем защиты. Таким образом, было выявлено различие в нейропротекторной активности димерных миметиков различных петель BDNF, которое может быть связано с особенностями активации основных пострецепторных сигнальных путей TrkB рецептора – PI3K/Akt- и MAPK/Erk-киназных путей.

Полученные результаты опубликованы в патенте:

*Патент № 2559880 С1 Российская Федерация, МПК С07К 5/062 (2006.01), А61К 38/05 (2006.01), А61Р 25/28 (2006.01). Замещенный бисдипептид с нейропротективным и антидепрессивным эффектом / С.Б. Середенин, Т.А. Гудашева, А.В. Тарасюк, Н.М. Сазонова, Т.А. Антипова, **И.О. Логвинов**, П.Ю. Поварнина, Т.А. Воронина, патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», заявка № 2014124855, дата подачи: 18.06.2014, опубликовано: 20.08.2015 Бюл. №23.*

Полученные результаты опубликованы в статьях:

*1. Гудашева, Т.А. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора / Т.А. Гудашева, А.В. Тарасюк, С.В. Помогайбо, **И.О. Логвинов**, П.Ю. Поварнина, Т.А. Антипова // Биоорганическая химия. – 2012. – Т. 38, №3. – С. 280-290.*

2. **Логвинов, И.О.** Нейропротективные свойства дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 в экспериментах *in vitro* / **И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, Т.А. Гудашева, А.В. Тарасюк, П.И. Антипов, С.Б. Середенин** // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155, №3. – С. 319-322.

3. **Тарасюк, А.В.** Анализ зависимости структура-активность в ряду аналогов ГСБ-106-дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора / **А.В. Тарасюк, Т.А. Гудашева, Н.М. Сазонова, П.И. Антипов, Д.В. Курилов, П.Ю. Поварнина, И.О. Логвинов, Т.А. Антипова** // Биоорганическая химия. – 2014. – Т. 40, №2. – С. 142-156.

Полученные результаты опубликованы в тезисах:

1. **Логвинов, И.О.** Нейропротекторный эффект пептидного миметика BDNF – ГСБ-106 *in vitro* (на культуре клеток) / **И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, А.В. Тарасюк, Т.А. Гудашева** // Материалы 5-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам», 1-4 июня 2010 г., Москва. – М., 2010. - С. 58.

2. **Логвинов, И.О.** Нейропротекторный эффект ГСБ-106 *in vitro* / **И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, А.В. Тарасюк, Т.А. Гудашева** // «Медицинский академический журнал». – 2010. – Том 10, №5. – С. 165.

3. **Logvinov, I.O.** Neuroprotective properties of low molecular weight dipeptide analogue of BDNF – GSB-106 in cell culture / **I.O. Logvinov, T.A. Antipova, A.V. Tarasiuk, T.A. Gudasheva** // «The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology». – 2011. – Vol. 21, Supp. 2. – P. 126.

4. **Tarasiuk, A.V.** A novel active small mimetic of brain-derived neurotrophic factor: bis-(N-monosuccinyl-seryl-lysine) hexamethylenediamide / **A.V. Tarasiuk, I.O. Logvinov, P.Y. Povarnina, T.A. Antipova, T.A. Gudasheva** // «The Journal of

the European College of Neuropsychopharmacology». – 2011. – Vol. 21, Supp. 2. – P. 174.

5. **Логвинов, И.О.** *Нейропротективные свойства низкомолекулярных дипептидных аналогов BDNF – ГСБ-106 и ГСБ-214 на культуре клеток при моделировании окислительного стресса / И.О. Логвинов, А.В. Тарасюк, Т.А. Антипова // Материалы IV Съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии», 18-21 сентября 2012 г., Казань. – Казань, 2012. – С. 118.*

6. **Логвинов, И.О.** *Нейропротекторная активность дипептидных миметиков 1-й и 4-й петель BDNF in vitro / И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, А.В. Тарасюк, Т.А. Гудашева // Материалы 6-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» // «Экспериментальная и клиническая фармакология»: приложение. – М.: изд-во Фолиум, 2015. – С. 41-42.*

4.2 Оценка влияния ГСБ-106, ГСБ-214 и ГТС-201 на пролиферацию нейронов линии НТ-22

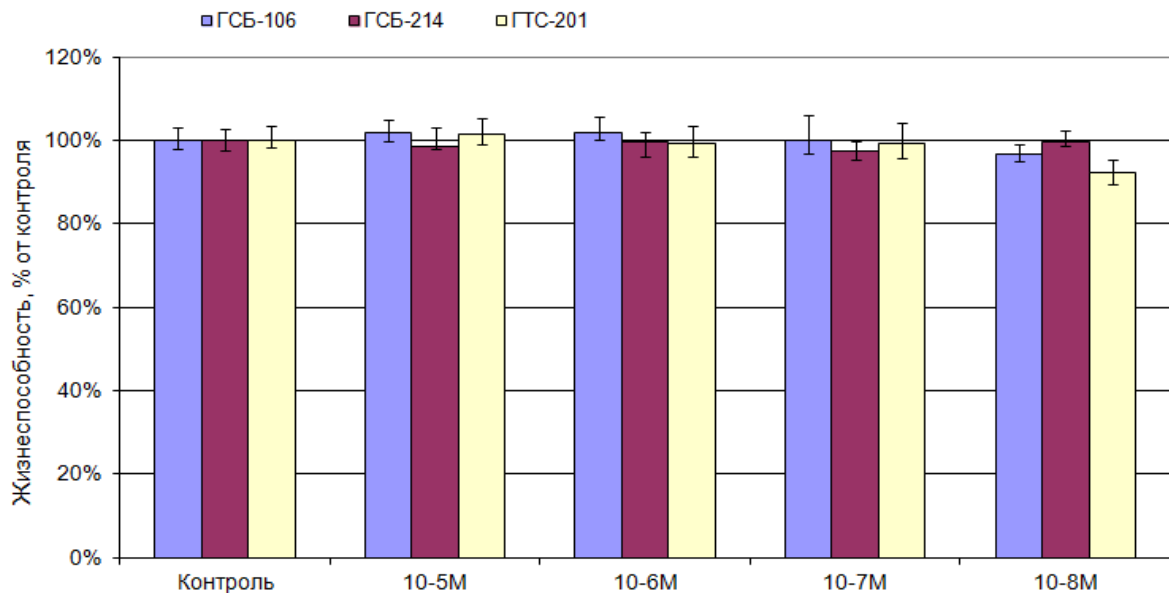
Из литературных данных известно, что BDNF имеет большое влияние на стимуляцию роста и пролиферацию нейронов [28]. Пролиферация клеток – разрастание ткани организма путём размножения клеток делением. В норме процесс пролиферации лежит в основе роста и дифференцировки тканей в процессе индивидуального развития и обеспечивает регенерацию тканей и клеток при травме и воспалении после воздействия на них повреждающего фактора.

При патологической клеточной пролиферации наблюдается развитие и размножения клеток тканей, которые по своей структуре отличаются от здоровых, что может привести к появлению злокачественных опухолей.

Нейротрофины являются стимуляторами пролиферации клеток различных популяций в тканях центральной и периферической нервной системы, а также играют важную роль в пролиферации глиом и вовлечены в патогенез аденом гипофиза [175]. В связи с этим, мы решили оценить влияния на пролиферативную активность клеток линии НТ-22 миметиков BDNF для исключения гиперпролиферации.

Влияние исследуемых миметиков на пролиферацию клеток определяли с использованием МТТ-теста. Гиппокампальные нейроны НТ-22 инкубировали с ГСБ-214, ГТС-201 и ГСБ-106 (10^{-5} – 10^{-8} М) при 37°C в CO_2 инкубаторе в течение 48 и 72 часов.

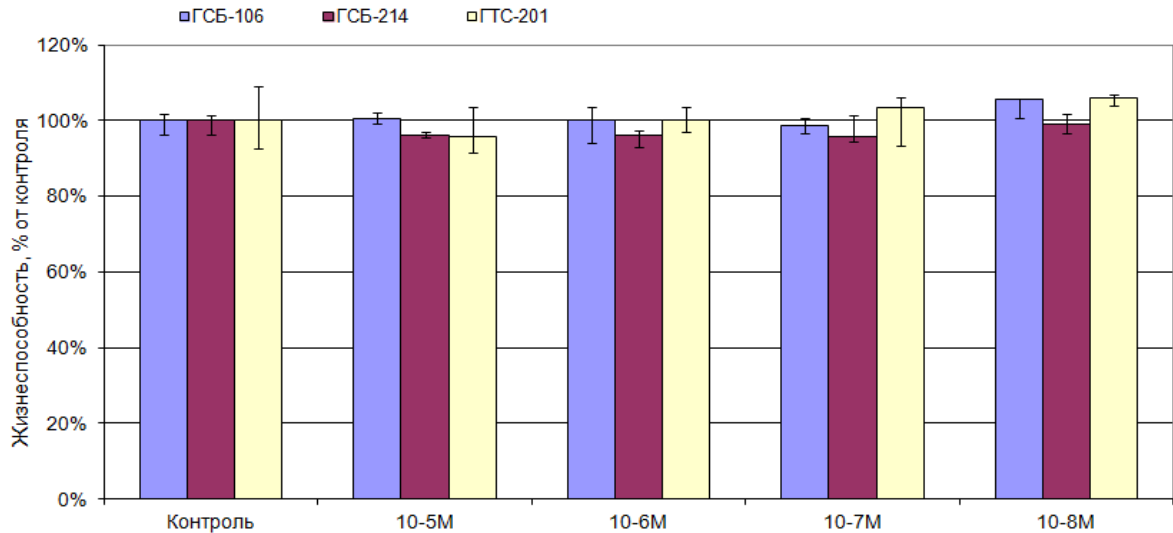
Анализ пролиферативной активности показал, что при инкубации с миметиками 1-й петли – ГСБ-214, 2-й петли – ГТС-201 и 4-й петли – ГСБ-106 в конечных концентрациях 10^{-5} – 10^{-8} М в течение 48 часов, гиппокампальные нейроны НТ-22 пролиферировали подобно интактным клеткам (рисунок 21).



Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Краскелла–Уоллиса с последующем тесту по Данну): * – относительно контроля.

Рисунок 21 – Влияние различных концентраций ГСБ-214, ГТС-201 и ГСБ-106 на пролиферацию гиппокампальных нейронов линии НТ-22 (результаты МТТ-теста). Инкубация в течение 48 часов

Аналогичные результаты были получены через 72 часа культивирования клеток НТ-22 в присутствии миметиков BDNF (рисунок 22). Достоверных отличий от контрольных значений выявлено не было.



Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Краскелла–Уоллиса с последующем тесту по Данну): * – относительно контроля.

Рисунок 22 – Влияние различных концентраций ГСБ-214, ГТС-201 и ГСБ-106 на пролиферацию гиппокампальных нейронов линии НТ-22 (результаты МТТ-теста). Инкубация в течение 72 часов

Таким образом, в экспериментах *in vitro* с помощью МТТ-теста нами было показано, что димерные дипептидные миметики, созданные на основе бета-изгибов 1-й петли (ГСБ-214), 2-й петли (ГТС-201) и 4-й петли (ГСБ-106) BDNF, не оказывают влияние на пролиферативную активность гиппокампальных нейронов НТ-22 в течение 48 и 72 часов. Различий в проявлении пролиферативного эффекта у изученных дипептидов выявлено не было.

Полученные результаты показывают, что низкомолекулярные дипептидные миметики BDNF не вызывают патологической клеточной пролиферации.

Полученные результаты опубликованы в статье:

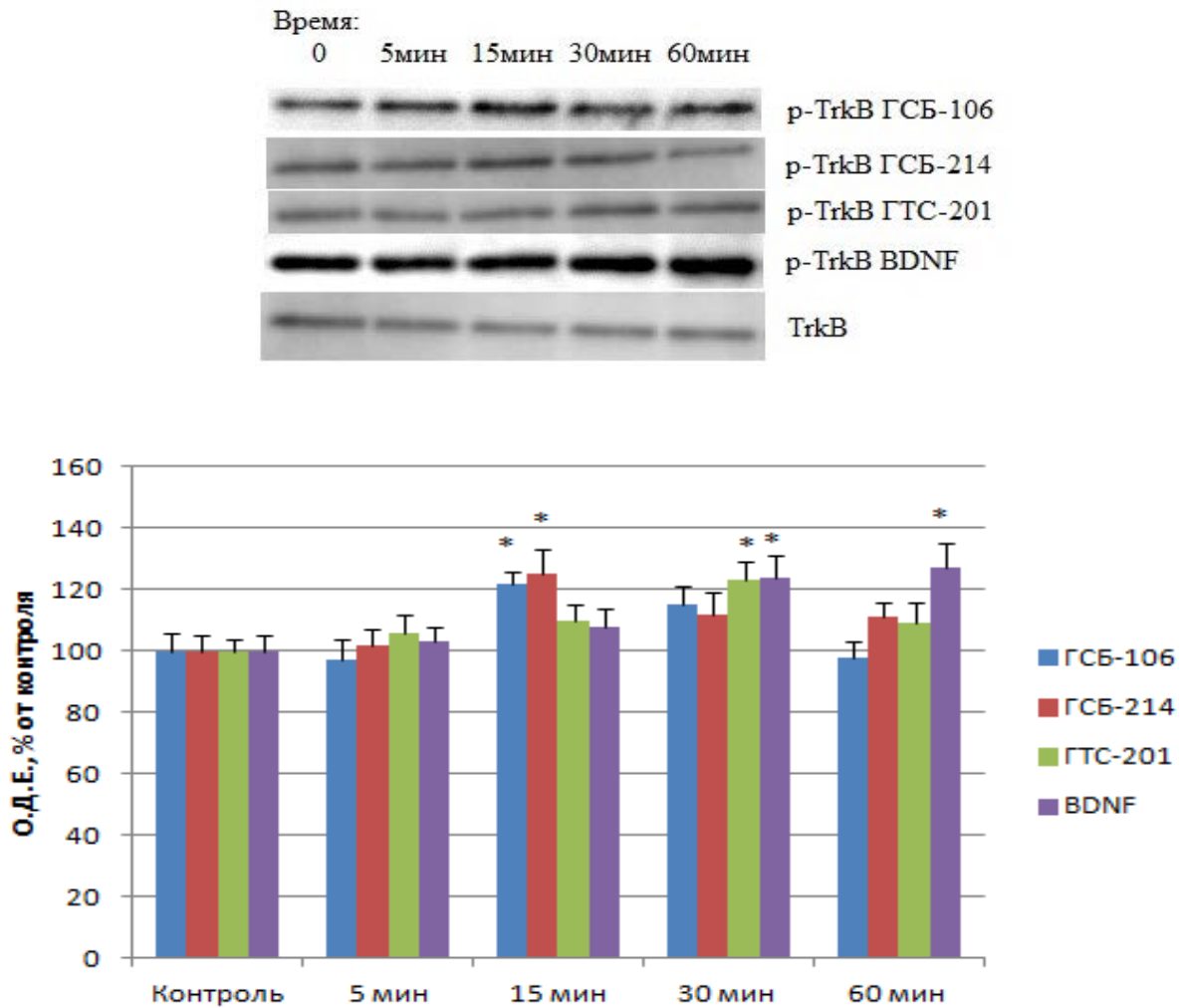
Логвинов, И.О. Оценка пролиферативной активности дипептидных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель мозгового нейротрофического фактора in vitro / И.О. Логвинов, С.В. Николаев, Т.А. Антипова // Фармакокинетика и Фармакодинамика. – 2025. – №3. – С. 9-12.

4.3 Влияние пептидов ГСБ-106, ГСБ-214 и ГТС-201 на процесс фосфорилирования тирозинкиназы В (TrkB) в культуре нейронов линии НТ-22

Известно, что нейропротекторные функции мозгового нейротрофического фактора реализуются через связывание со специфическим нейротрофиновым рецептором TrkB [58]. Связывание нейротрофинов с рецептором приводит к его гомодимеризации и, далее, к аутофосфорилированию и запуску множества путей передачи биологического ответа, включая те, которые приводят к нейрональной выживаемости.

Далее была исследована активация TrkB рецепторов после внесения димерных дипептидных миметиков BDNF – ГСБ-106 (10^{-8} М), ГСБ-214 (10^{-7} М), ГТС-201 (10^{-7} М), которые вносили в концентрациях наиболее эффективных в предыдущих сериях экспериментов. В качестве положительного контроля использовали BDNF ($\sim 10^{-9}$ М).

Методом Вестерн-блот анализа с использованием антител к фосфорилированной форме TrkB было показано, что BDNF, ГСБ-106, ГСБ-214, ГТС-201 активируют TrkB рецептор. Так, при инкубации с клетками НТ-22 ГСБ-106 и ГСБ-214, достоверное увеличение фосфорилирование TrkB рецептора наблюдали через 15 мин. Аналогичное увеличение фосфорилирования TrkB было отмечено и для миметика 2-й петли – ГТС-201, но через 30 мин.



Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни): * – относительно контроля.

Рисунок 23 – Влияние ГСБ-106, ГСБ-214 и ГТС-201 на фосфорилирование TrkB рецептора в культуре гиппокампальных нейронов HT-22. Оригинальные Вестерн-блоты и результаты их денситометрии

Таким образом, нами было показано, что ГСБ-106, ГСБ-214 и ГТС-201 активируют специфический для BDNF рецептор – TrkB. Далее было изучено влияние димерных дипептидных миметиков ГСБ-106, ГСБ-214 и ГТС-201 на активацию основных пострецепторных сигнальных путей TrkB рецептора: PI3K/Akt и MAPK/Erk.

Полученные результаты опубликованы в статьях:

1. Гудашева, Т.А. Дипептидный миметик 4-й петли мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 активирует TrkB, Erk, Akt и

способствует выживаемости нейронов *in vitro* / Т.А. Гудашева, **И.О. Логвинов**, Т.А. Антипова, С.Б. Середенин // Доклады Академии наук. – 2013. – Т. 451, №5. – С. 1-4.

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

Полученные результаты опубликованы в тезисах:

1. *Тарасюк, А.В. Синтезирован димерный дипептидный миметик 1-й петли нейротрофина BDNF, обладающий нейропротективной и лишенный антидепрессивной активности / А.В. Тарасюк, П.Ю. Поварнина, **И.О. Логвинов** // Материалы IV Съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии», 18-21 сентября 2012 г., Казань. – Казань, 2012. – С. 178.*

2. *Logvinov, I.O. GSB-106, low molecular weight dipeptide analogue of BDNF, protected cells via the TrkB, Akt, Erk 1/2 activation / I.O. Logvinov, T.A. Antipova, A.V. Tarasiuk, T.A. Gudasheva, S.B. Seredenin // «European Neuropsychopharmacology». – 2014. – Vol. 24, Suppl. 2. – P. 221-222.*

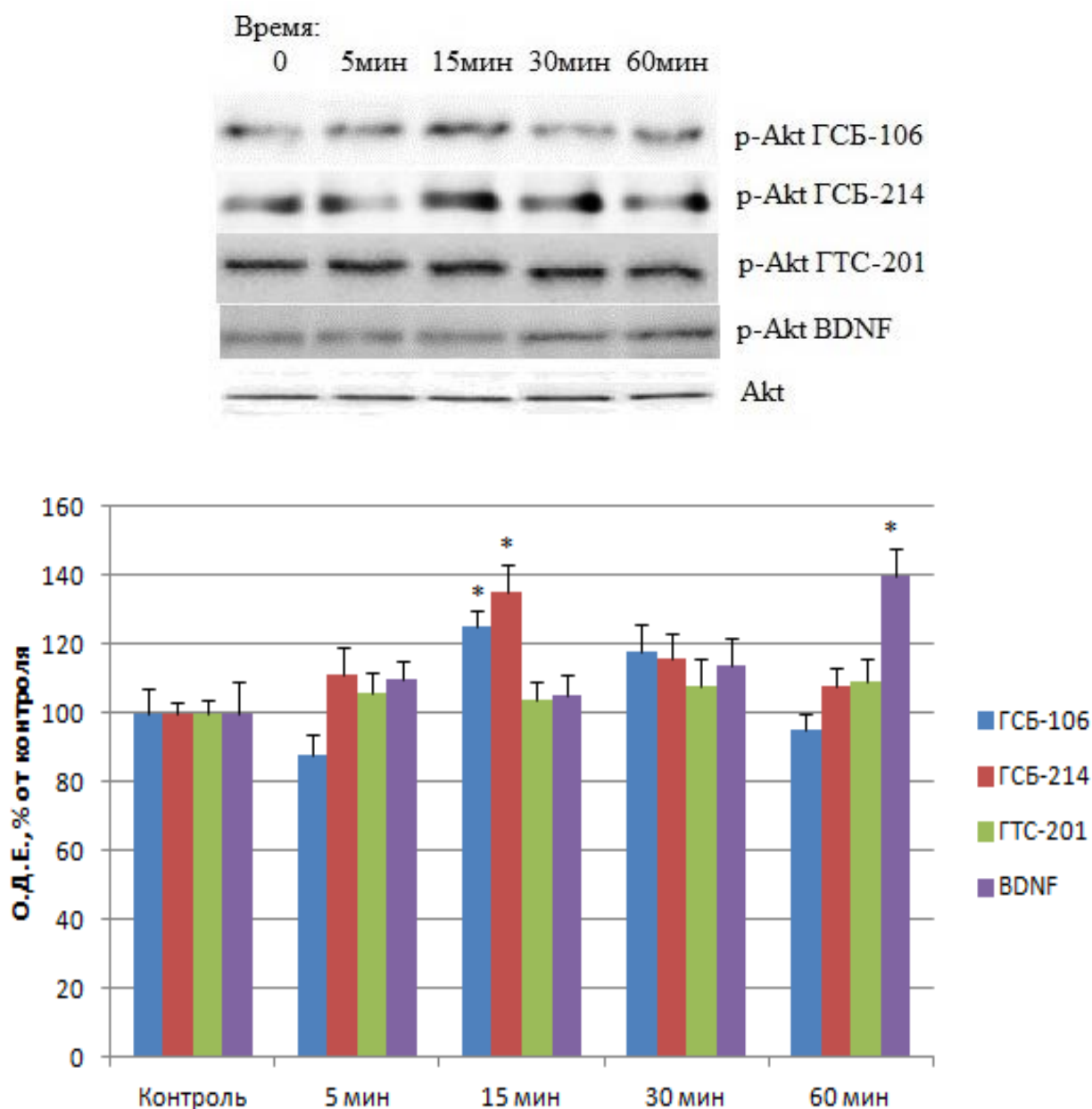
3. *Logvinov, I.O. Dimeric dipeptide mimetics of the BDNF loop 4 and loop 1 activate TrkB with different patterns of intracellular signal transduction / I.O. Logvinov, T.A. Antipova, A.V. Tarasiuk, T.A. Gudasheva, S.B. Seredenin // «European Neuropsychopharmacology. – 2015. – Vol. 25, Suppl. 2. – P. 260-261.*

4. *Logvinov, I.O. Low-molecular mimetic of BDNF loop 2 protected neurons against oxidative stress via the TrkB and MAPK/Erk activation / I.O. Logvinov, T.A. Antipova, A.V. Tarasiuk, S.V. Kruglov, T.A. Gudasheva, S.B. Seredenin// «European Neuropsychopharmacology. – 2019. – Vol. 29, Suppl. 1. – P. 286.*

4.4 Влияние димерных дипептидных миметиков ГСБ-106, ГСБ-214 и ГТС-201 на активацию PI3K/Akt-, MAPK/Erk-киназных путей и PLC γ в культуре нейронов линии НТ-22

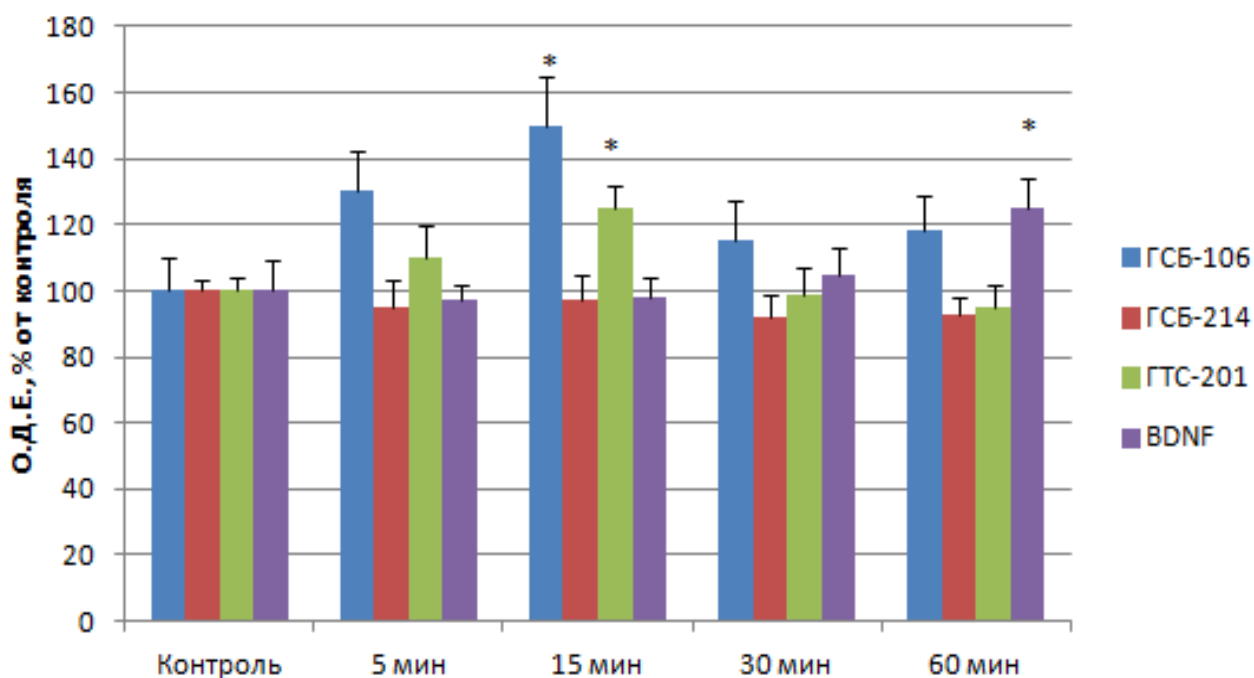
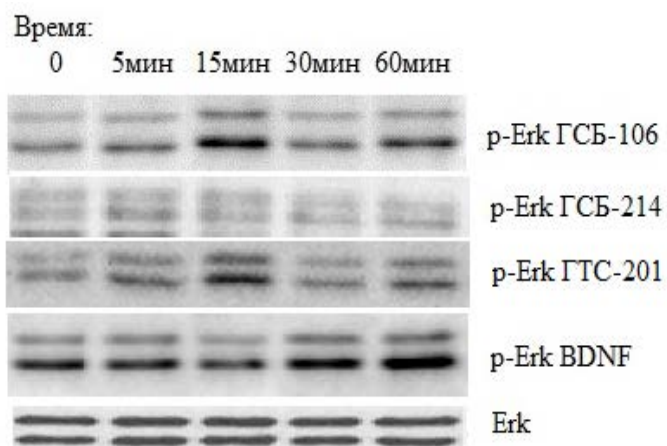
Известно, что в реализации протекторных эффектов BDNF играют роль три основных сигнальных пути PI3K/Akt-, MAPK/Erk-киназные и PLC γ .

Данные, представленные на рисунках, показывают, что все исследованные миметики нейротрофина BDNF активируют PLC γ . В то же время картина активации PI3K/Akt и MAPK/Erk каскадов миметиками разных петель различается: миметик 4-й петли ГСБ-106 через 15 мин активировал оба сигнальных пути; в отличие от него миметик 1-й петли ГСБ-214, активировал только PI3K/Akt-киназый и не активировал MAPK/Erk-киназый путь, а миметик 2-й петли наоборот – активировал MAPK/Erk-киназый путь, но не влиял на фосфорилирование PI3K/Akt-киназного пути ни в одном из изученных временных диапазонах.



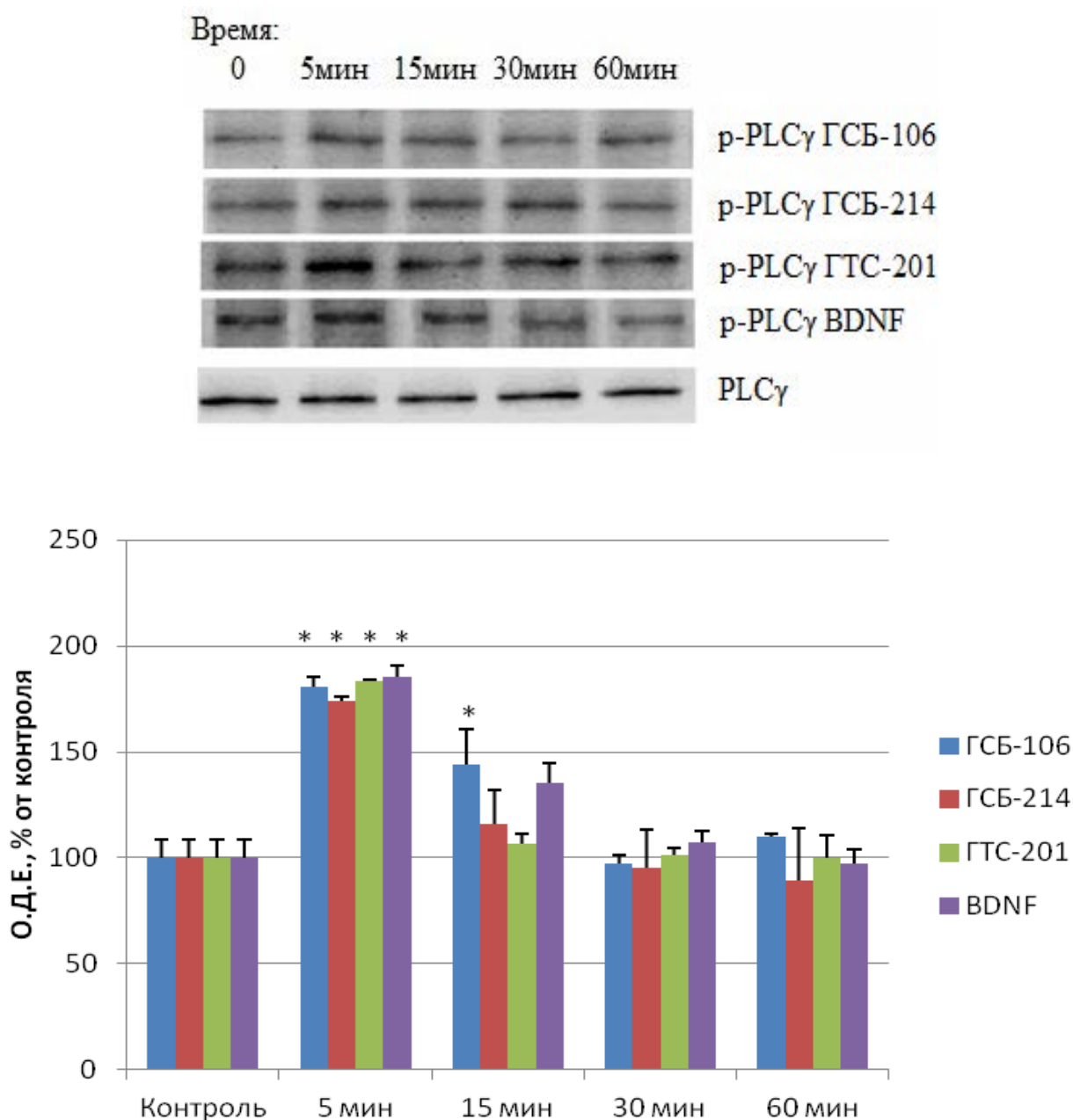
Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни): * – относительно контроля.

Рисунок 24 – Уровень фосфорилированных Akt-киназ после внесения ГСБ-106 ($10^{-8}M$), ГСБ-214 ($10^{-7}M$), ГТС-201 ($10^{-7}M$) и BDNF в культуру клеток НТ-22. Оригинальные Вестерн-блоты и результаты их денситометрии



Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни): * – относительно контроля.

Рисунок 25 – Уровень фосфорилированных Erk 1/2-киназ после внесения ГСБ-106 ($10^{-8}M$), ГСБ-214 ($10^{-7}M$), ГТС-201 ($10^{-7}M$) и BDNF в культуру клеток НТ-22. Оригинальные Вестерн-блоты и результаты их денситометрии



Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни): * – относительно контроля.

Рисунок 26– Уровень фосфорилированной PLC γ после внесения ГСБ-106 ($10^{-8}M$), ГСБ-214 ($10^{-7}M$), ГТС-201 ($10^{-7}M$) и BDNF в культуру клеток НТ-22. Оригинальные Вестерн-блоты и результаты их денситометрии

Таким образом, установлено, что при наличии у соединений, полученных на основе различных петлеобразных участков нейротрофина, способности фосфорилировать TrkB рецептор имеются различия в активации путей трансдукции сигнала. Этот факт может объяснить выявленные нами

особенности нейропротекторного действия миметиков 1-ой, 2-ой и 4-ой петель BDNF на модели окислительного стресса.

Межлумян А.Г. и соавт. показали, что антидепрессантоподобный эффект ГСБ-106 полностью предотвращался ингибированием рецепторных тирозинкиназ, включая TrkB или сигнальных каскадов PI3K/Akt, MAPK/Erk, PLC γ . В экспериментах *in vivo* был проведен ингибиторный анализ антидепрессантоподобного эффекта ГСБ-106 в зависимости от активации TrkB и его сигнальных путей с использованием теста вынужденного плавания на мышах BALB/c, в которых ГСБ-106 вводили на фоне ингибирования соответствующих киназ: K252a для Trk, LY294002 для PI3K, U73122 для PLC γ , PD98059 для митоген-активируемых протеинкиназ киназ MEK1/2. Тест принудительного плавания является одним из наиболее часто используемых методов скрининга для выявления соединений с антидепрессантоподобной активностью. [126].

Таким образом, результаты фармакологического ингибиторного анализа *in vivo* доказывают, что антидепрессантоподобное действие ГСБ-106 зависит как от активации TrkB рецептора, так и от активации пострецепторных сигнальных путей PI3K/Akt, MAPK/Erk и PLC γ . Эти данные свидетельствуют о полной вовлеченности TrkB сигналинга в эффекты ГСБ-106.

Поскольку миметик 4-й петли ГСБ-106 был более активен по сравнению с другими исследованными миметиками на модели окислительного стресса, а также активировал три пострецепторных сигнальных пути TrkB рецептора, в дальнейшем более подробно было исследовано его цитопротекторное действие на других моделях повреждения клеток.

Полученные результаты опубликованы в статьях:

5. Гудашева, Т.А. Анализ зависимости антидепрессивного действия лигандов рецепторов TrkB от активации MAP-киназного пути /

Т.А. Гудашева, **И.О. Логвинов**, П.Ю. Поварнина, Т.А. Антипова, С.Б. Середенин // Доклады Академии наук. – 2015. – Т. 460, №3. – С. 346-348.

6. Гудашева, Т.А. Дипептидные миметики отдельных петель NGF и BDNF активируют PLC- γ 1 / Т.А. Гудашева, **И.О. Логвинов**, С.В. Николаев, Т.А. Антипова, П.Ю. Поварнина, С.Б. Середенин // Доклады Академии наук. Науки о жизни. – 2020. – Т. 494, №1. – С. 486-490.

Полученные результаты опубликованы в тезисах:

1. Тарасюк, А.В. Синтезирован димерный дипептидный миметик 1-й петли нейротрофина BDNF, обладающий нейропротективной и лишенный антидепрессивной активности / А.В. Тарасюк, П.Ю. Поварнина, **И.О. Логвинов** // Материалы IV Съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии», 18-21 сентября 2012 г., Казань. – Казань, 2012. – С. 178.

2. **Logvinov, I.O.** GSB-106, low molecular weight dipeptide analogue of BDNF, protected cells via the TrkB, Akt, Erk 1/2 activation / **I.O. Logvinov**, Т.А. Antipova, А.В. Tarasiuk, Т.А. Gudasheva, S.B. Seredenin // «European Neuropsychopharmacology». – 2014. – Vol. 24, Suppl. 2. – P. 221-222.

3. **Logvinov, I.O.** Dimeric dipeptide mimetics of the BDNF loop 4 and loop 1 activate TrkB with different patterns of intracellular signal transduction / **I.O. Logvinov**, Т.А. Antipova, А.В. Tarasiuk, Т.А. Gudasheva, S.B. Seredenin // «European Neuropsychopharmacology». – 2015. – Vol. 25, Suppl. 2. – P. 260-261.

4. **Логвинов, И.О.** Дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора ГТС-201 обладает нейропротекторной активностью и селективно активирует MAPK/ERK сигнальный путь / **И.О. Логвинов**, А.В. Тарасюк, С.В. Круглов, П.И. Антипов, Т.А. Антипова, Т.А. Гудашева // Материалы V Съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии», 14-18 мая 2018 г., Ярославль. – Ярославль, 2018. – С. 145.

5. *Logvinov, I.O. Low-molecular mimetic of BDNF loop 2 protected neurons against oxidative stress via the TrkB and MAPK/Erk activation / I.O. Logvinov, T.A. Antipova, A.V. Tarasiuk, S.V. Kruglov, T.A. Gudasheva, S.B. Seredenin// «European Neuropsychopharmacology. – 2019. – Vol. 29, Suppl. 1. – P. 286.*

4.5 Оценка нейропротекторных свойств ГСБ-106 на модели глутаматной токсичности в культуре гиппокампальных нейронов линии НТ-22.

Глутамат является одним из ключевых возбуждающих нейротрансмиттеров в центральной нервной системе. Активация глутаматергических рецепторов происходит при многих процессах в головном мозге, включая двигательные, перцептивные и когнитивные функции. Взаимодействие глутамата со специфическими постсинаптическими рецепторами открывает расположенные на постсинаптической мембране кальциевые каналы, что сопровождается поступлением ионов кальция и натрия в клетки, запуская целый каскад внутриклеточных процессов [37, 118].

Изменения со стороны глутаматергической системы отмечается как при нормальном старении, так и при целом ряде этиологически различных неврологических заболеваний, включая деменции первично-дегенеративного и сосудистого генеза [37]. С возрастом отмечается увеличение содержания глутамата в цереброспинальной жидкости [35]. При патологических состояниях избыточная активация глутаматных рецепторов сопровождается массивным поступлением в нейроны ионов кальция и натрия, приводит к деполяризации мембраны и активации вольтаж-зависимых кальциевых каналов, что в свою очередь сопровождается ещё большим увеличением поступления ионов кальция в клетки. Индуцированное глутаматом повышение содержания кальция в нейронах приводит к повышению активности ряда ферментов, включая протеинкиназу С, кальций/кальмодулин-

зависимую протеинкиназу II, фосфолипазы, протеазы, NO-синтетазу, эндонуклеазы и орнитиндекарбоксилазу. Эти и другие ферменты в данной ситуации приводят к нарушению структуры белков, образованию свободных радикалов и перекисному окислению липидов. При этом важную роль играет митохондриальная дисфункция, поскольку повышение уровня кальция в митохондриях коррелирует с активностью образования свободных радикалов.

Широко известна холинергическая гипотеза патогенеза болезни Альцгеймера (БА), в основе которой лежит представление о том, что симптомы когнитивного дефицита и последующей деменции обусловлены первичной дегенерацией холинергических нейронов в ядрах основания мозга, сопровождающейся нарушением холинергической нейротрансмиссии в церебральной коре.

В последнее время были получены убедительные доказательства вовлечения в нейродегенеративный патологический процесс болезни Альцгеймера, наряду с холинергической, также и глутаматергической нейротрансмиттерной системы.

Была разработана концепция глутаматопосредованной эксайтотоксичности и получены экспериментальные и нейropатологические данные, подтверждающие участие этого механизма в процессе нейродегенерации альцгеймерского типа. Исследованию механизмов эксайтотоксичности и её роли в развитии нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона и хорея Хантингтона, посвящено множество исследований [40].

Процесс «острой» эксайтотоксической нейродегенерации, имеющий место при церебральной ишемии, инсульте, острой черепно-мозговой травме, развивается по следующему механизму. Гипервозбуждение глутаматных рецепторов в ЦНС вызывается усилением продукции и токсичности возбуждающих аминокислот – глутамата и аспартата, - возможно под

влиянием повреждающих агентов (ишемия, травма и др.). Этот процесс сопровождается первичной деполяризацией нейрональной мембраны, что приводит к усиленному входу в клетки ионов натрия, хлора и молекул воды и развитию вследствие этого осмотического набухания клеток, что в свою очередь сопровождается снятием магниевых блока у глутаматных рецепторов N-метил-D-аспаратного типа (NMDA), препятствующего проникновению ионов кальция в клетку. Вслед за этим начинается усиленное проникновение кальция в клетку, его концентрация при этом увеличивается на несколько порядков, что в свою очередь приводит к активации ряда внутриклеточных ферментных систем (протеаз, липаз, нуклеаз), запускающих каскад цитодегенеративных процессов и лизис клетки. Гибель клетки сопровождается массивным выбросом эндогенного глутамата, в результате чего резко увеличивается концентрация экстраклеточного глутамата, который дополнительно гиперактивирует глутаматные рецепторы, что приводит к новым сериям внутриклеточных нейродегенеративных реакций.

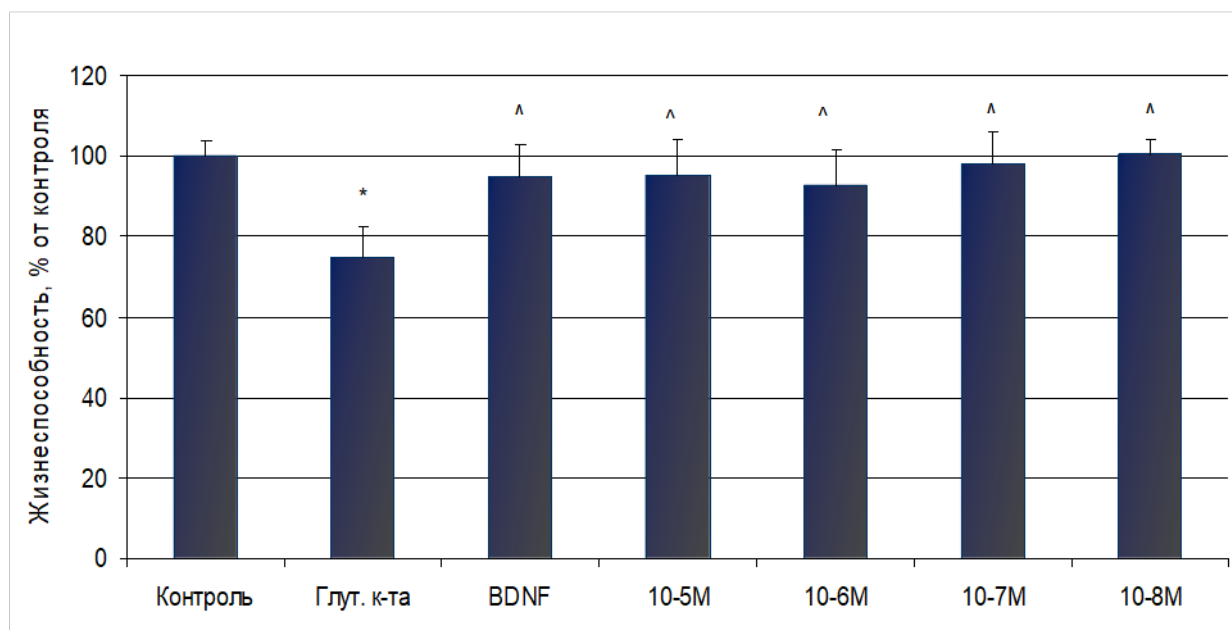
Ранее было показано, что BDNF защищает гиппокампальные нейроны от глутаматной токсичности *in vivo* и *in vitro* [9, 22]. Поэтому следующим этапом исследований стало изучение нейропротекторного эффекта ГСБ-106 на модели глутаматной токсичности.

Таблица 2 – Влияние различных концентраций ГСБ-106 на жизнеспособность гиппокампальных нейронов линии НТ-22 на модели глутаматной токсичности (результаты МТТ-теста). Внесение препарата за 24 часа до глутаминовой кислоты.

Экспериментальные группы, n=16	Значения оптической плотности
Контроль	0,175±0,009
Глутаминовая кислота 5 мМ	0,152±0,016 *

BDNF 50 нг/мл	0,169±0,014 ^
ГСБ-106 10 ⁻⁵ М	0,164±0,018
ГСБ-106 10 ⁻⁶ М	0,159±0,017
ГСБ-106 10 ⁻⁷ М	0,174±0,014 ^
ГСБ-106 10 ⁻⁸ М	0,179±0,006 ^

Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Краскелла–Уоллиса с последующем тесту по Данну): * – относительно контроля (100%); ^ – относительно повреждения глутаминовой кислотой.



Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Краскелла–Уоллиса с последующем тесту по Данну): * – относительно контроля (100%); ^ – относительно повреждения глутаминовой кислотой.

Рисунок 27 – Влияние различных концентраций ГСБ-106 на жизнеспособность гиппокампальных нейронов линии НТ-22 на модели глутаматной токсичности (результаты МТТ-теста). Внесение препарата за 24 часа до глутаминовой кислоты

Данные, приведенные в таблице 2 и на рисунке 27 показывают, что ГСБ-106 обладает достоверной нейропротекторной активностью, так же как и BDNF. Эффективным оказалось внесение дипептида в конечных концентрациях 10⁻⁷М и 10⁻⁸М.

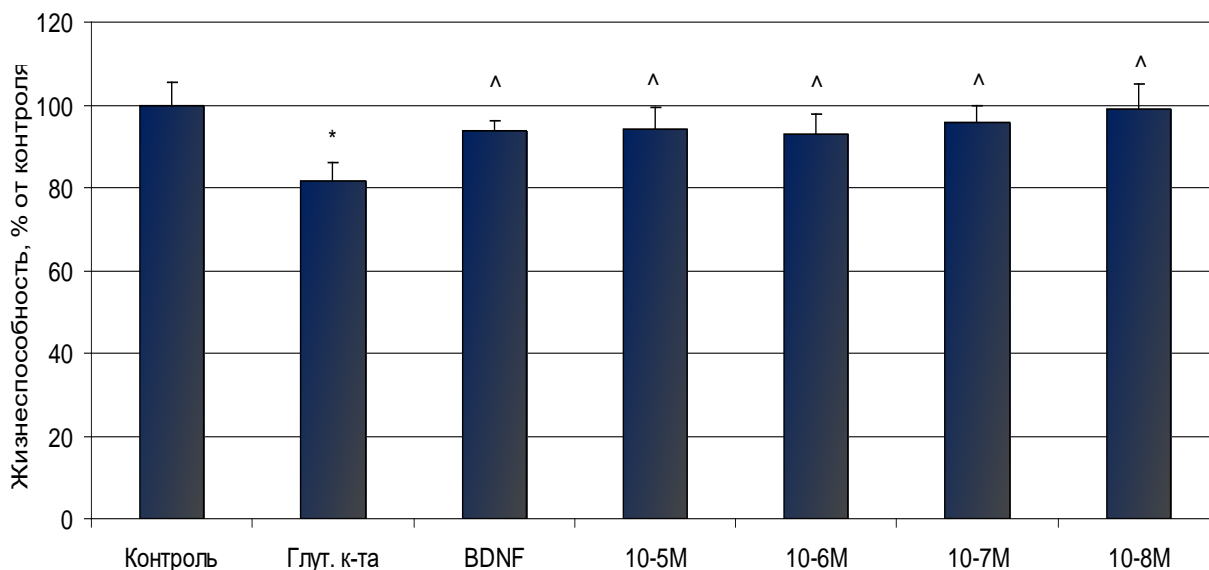
Далее ГСБ-106 в исследуемых конечных концентрациях вносили после отмывки глутамата.

Данные, представленные в таблице 3 и на рисунке 28 показывают, что ГСБ-106 во всех исследуемых конечных концентрациях достоверно защищал гиппокампальные нейроны линии НТ-22 от глутаматной токсичности.

Таблица 3 – Влияние различных концентраций ГСБ-106 на жизнеспособность гиппокампальных нейронов линии НТ-22 на модели глутаматной токсичности (результаты МТТ-теста). Внесение препарата после отмывки глутаминовой кислоты.

Экспериментальные группы, n=16	Значения оптической плотности
Контроль	0,184±0,010
Глутаминовая кислота 5 мМ	0,151±0,008 *
BDNF 50 нг/мл	0,166±0,010 ^
ГСБ-106 10 ⁻⁵ М	0,170±0,012 ^
ГСБ-106 10 ⁻⁶ М	0,168±0,011 ^
ГСБ-106 10 ⁻⁷ М	0,175±0,010 ^
ГСБ-106 10 ⁻⁸ М	0,180±0,015 ^

Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Краскелла–Уоллиса с последующем тесту по Данну): * – относительно контроля (100%); ^ – относительно повреждения глутаминовой кислотой.



Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Краскелла–Уоллиса с последующем тесту по Данну): * – относительно контроля (100%); ^ – относительно повреждения глутаминовой кислотой.

Рисунок 28 – Влияние различных концентраций ГСБ-106 на жизнеспособность гиппокампальных нейронов линии НТ-22 на модели глутаматной токсичности (результаты МТТ-теста). Внесение препарата после отмывки глутаминовой кислоты.

В работе Almeida et al. (2005) было показано, что нейропротекторный эффект BDNF на модели глутаматной токсичности на культуре гиппокампальных нейронов обусловлен активацией фосфотидилэнозитол-3-киназного и MAP-киназного сигнальных путей. Нейропротекторный эффект ГСБ-106 может быть обусловлен сходным механизмом действия. Активация фосфотидилинозитол-3-киназного и MAP-киназного каскада приводит к увеличению экспрессии цитопротекторных белков.

Полученные результаты опубликованы в статье:

Логвинов, И.О. Нейропротективные свойства дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 в экспериментах *in vitro* / **И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, Т.А. Гудашева, А.В. Тарасюк, П.И. Антипов, С.Б. Середенин** // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155, №3. – С. 319-322.

Полученные результаты опубликованы в тезисах:

1. **Логвинов, И.О.** *Нейропротекторный эффект пептидного миметика BDNF – ГСБ-106 in vitro (на культуре клеток) / И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, А.В. Тарасюк, Т.А. Гудашева // Материалы 5-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам», 1-4 июня 2010 г., Москва. – М., 2010. - С. 58.*

2. **Логвинов, И.О.** *Нейропротекторный эффект ГСБ-106 in vitro / И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, А.В. Тарасюк, Т.А. Гудашева // «Медицинский академический журнал». – 2010. – Том 10, №5. – С. 165.*

3. **Logvinov, I.O.** *Neuroprotective properties of low molecular weight dipeptide analogue of BDNF – GSB-106 in cell culture / I.O. Logvinov, T.A. Antipova, A.V. Tarasiuk, T.A. Gudasheva // «The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology». – 2011. – Vol. 21, Supp. 2. – P. 126.*

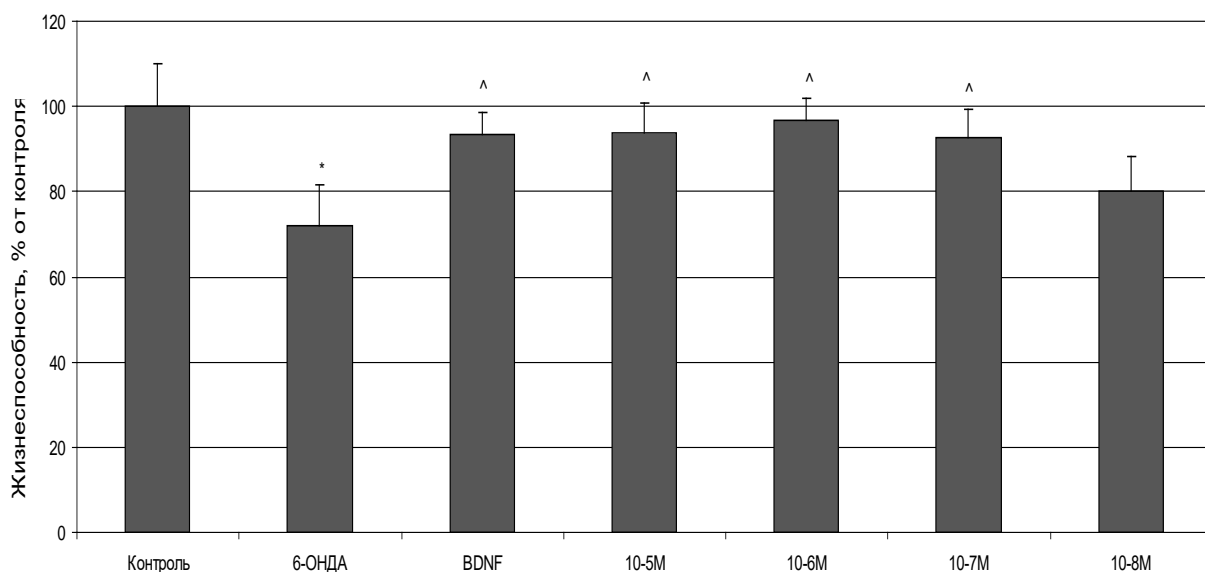
4. **Tarasiuk, A.V.** *A novel active small mimetic of brain-derived neurotrophic factor: bis-(N-monosuccinyl-seryl-lysine) hexamethylenediamide / A.V. Tarasiuk, I.O. Logvinov, P.Y. Povarnina, T.A. Antipova, T.A. Gudasheva // «The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology». – 2011. – Vol. 21, Supp. 2. – P. 174.*

4.6 Оценка нейропротекторного эффект ГСБ-106 на клеточной модели болезни Паркинсона в культуре клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y

Для моделирования болезни Паркинсона использовали 6-гидроксидофамин в культуре клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y. По литературным данным, механизмы нейротоксического действия 6-ОНДА, включают образование активных форм кислорода при окислении нейротоксина с последующими процессами повреждения мембран

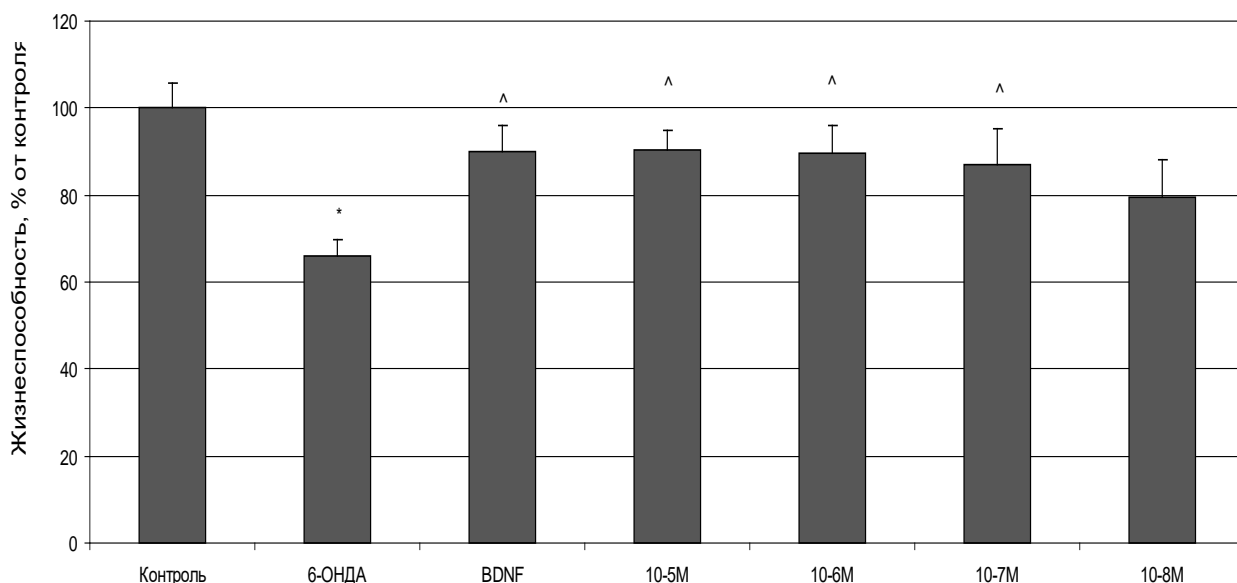
митохондрий, белков, развитием стресса эндоплазматического ретикулума и гибели нейронов [143].

На клетках нейробластомы человека линии SH-SY5Y при повреждении их нейротоксином 6-ОНДА, нами было показано, что ГСБ-106 проявлял защитный эффект в конечных концентрациях 10^{-5} - 10^{-7} М, при внесении за 24 часа до 6-ОНДА и после повреждения клеток.



Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Краскелла–Уоллиса с последующем тесту по Данну): * – относительно контроля (100%); ^ – относительно повреждения 6-ОНДА.

Рисунок 29 – Нейропротекторный эффект ГСБ-106 на модели повреждения клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y нейротоксином 6-ОНДА (результаты МТТ-теста). Внесение ГСБ-106 за 24 часа до повреждения



Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Краскелла–Уоллиса с последующим тестом по Данну): * – относительно контроля (100%); ^ – относительно повреждения 6-ОНДА.

Рисунок 30 – Нейропротекторный эффект ГСБ-106 на модели повреждения клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y нейротоксином 6-ОНДА (результаты МТТ-теста). Внесение ГСБ-106 сразу после повреждения

Таким образом, исследование дипептидного миметика BDNF ГСБ-106 на клеточных моделях окислительного стресса, глутаматной токсичности и 6-гидроксидоаминового повреждения клеток показало наличие у него нейропротекторной активности, проявляемой в малых концентрациях. ГСБ-106 проявляет подобные нейротрофинам эффекты на клетках не только грызунов, но и человека. Тот факт, что ГСБ-106 был эффективен на клеточной модели болезни Паркинсона, позволяет предполагать наличие у него активности при лечении этого заболевания.

Полученные результаты опубликованы в статье:

Логвинов, И.О. *Нейропротективные свойства дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 в экспериментах in vitro / И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, Т.А. Гудашева, А.В. Тарасюк, П.И. Антипов,*

С.Б. Середенин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155, №3. – С. 319-322.

Полученные результаты опубликованы в тезисах:

1. **Логвинов, И.О.** Нейропротекторный эффект ГСБ-106 *in vitro* / **И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, А.В. Тарасюк, Т.А. Гудашева** // «Медицинский академический журнал». – 2010. – Том 10, №5. – С. 165.

2. **Logvinov, I.O.** Neuroprotective properties of low molecular weight dipeptide analogue of BDNF – GSB-106 in cell culture / **I.O. Logvinov, T.A. Antipova, A.V. Tarasiuk, T.A. Gudasheva** // «The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology». – 2011. – Vol. 21, Supp. 2. – P. 126.

3. **Tarasiuk, A.V.** A novel active small mimetic of brain-derived neurotrophic factor: bis-(N-monosuccinyl-seryl-lysine) hexamethylenediamide / **A.V. Tarasiuk, I.O. Logvinov, P.Y. Povarnina, T.A. Antipova, T.A. Gudasheva** // «The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology». – 2011. – Vol. 21, Supp. 2. – P. 174.

4.7 Оценка влияния ГСБ-106 на синтез нейропротекторного белка гемоксигеназы-1 в культуре нейронов линии НТ-22 на модели окислительного стресса.

Гемоксигеназа-1 (HSP32) является стресс-индуцибельным ферментом, участвующем в деградации гемма и осуществляющим защиту клетки от окислительного стресса. Однако, гиперпродукция гемоксигеназы-1 может приводить к развитию внутриклеточного окислительного стресса за счет накопления свободного Fe^{2+} и СО, вызывать повреждение клетки и/или её гибель. Ограничение гиперпродукции гемоксигеназы-1 является важным звеном нейропротекции.

На следующем этапе исследований было изучено влияние BDNF и его димерного аналога ГСБ-106 на вызванный окислительным стрессом синтез гемоксигеназы-1 на культуре гиппокампальных нейронов линии НТ-22.

Данные представленные на рисунках 31 и 32 показывают, что окислительный стресс приводит к достоверному увеличению синтеза гемоксигеназы-1 по сравнению с контролем. При внесении BDNF и ГСБ-106 (10^{-8} М) наблюдается достоверное снижение синтеза гемоксигеназы-1 по сравнению с окислительным стрессом.

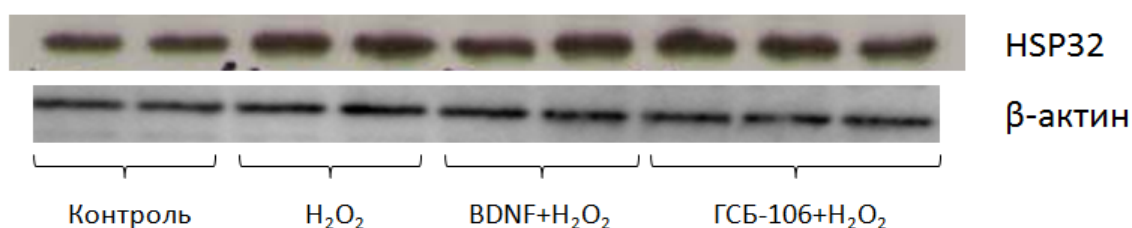
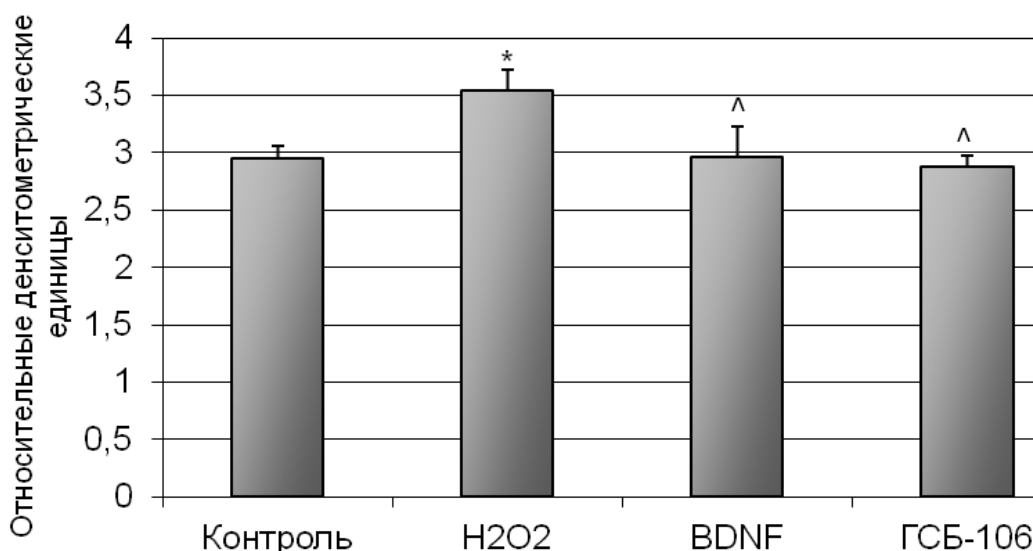


Рисунок 31 – Синтез HO-1 (HSP32) в культуре нейронов линии НТ-22 при внесении BDNF и ГСБ-106 сразу после отмывки перекиси водорода. (Оригинальный Вестерн-блот)



Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни): * – относительно контроля; ^ – относительно повреждения перекисью водорода.

Рисунок 32 – Синтез HO-1 (HSP32) в культуре нейронов линии НТ-22 при внесении BDNF и ГСБ-106 сразу после отмывки перекиси водорода

Таким образом, одним из возможных молекулярных механизмов нейропротекторного действия BDNF и ГСБ-106 является ограничение синтеза гемоксигеназы-1 (HSP32), вызванное окислительным стрессом.

Полученные результаты опубликованы в тезисах:

1. **Логвинов, И.О.** *Нейропротекторный эффект пептидного миметика BDNF – ГСБ-106 in vitro (на культуре клеток) / И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, А.В. Тарасюк, Т.А. Гудашева // Материалы 5-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам», 1-4 июня 2010 г., Москва. – М., 2010. - С. 58.*

2. **Logvinov, I.O.** *Neuroprotective effect of dipeptide analogue of BDNF – GSB106 in vitro and its influence on the synthesis of heme oxygenase-1 / I.O. Logvinov, T.A. Antipova, A.V. Tarasiuk, T.A. Gudasheva, S.B. Seredenin // Abstracts of the XIX World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, 11-14 december 2011, Shanghai, China. – P. 209.*

4.8 Влияние ГСБ-106 на содержание фактора роста нервов NGF в культуре клеток линии НТ-22.

В клетке существует определенный баланс между содержанием нейротрофинов. Изменение уровня одного влечет за собой изменения в содержании других [122, 157]. Очень высокие уровни нейротрофинов могут быть потенциальными повреждающими факторами для нейронов [86]. Мы предположили, что ГСБ-106, подобно BDNF может оказывать влияние на содержание NGF. Для эксперимента использовали ГСБ-106 в конечной концентрации 10^{-8} М как наиболее эффективной в предыдущих сериях исследований.

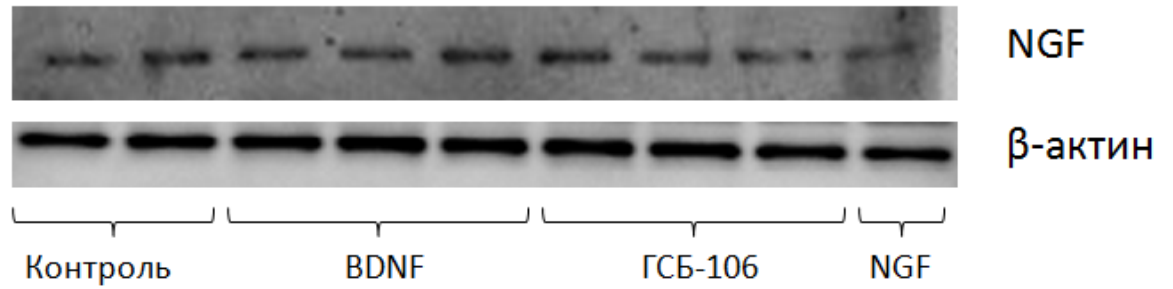
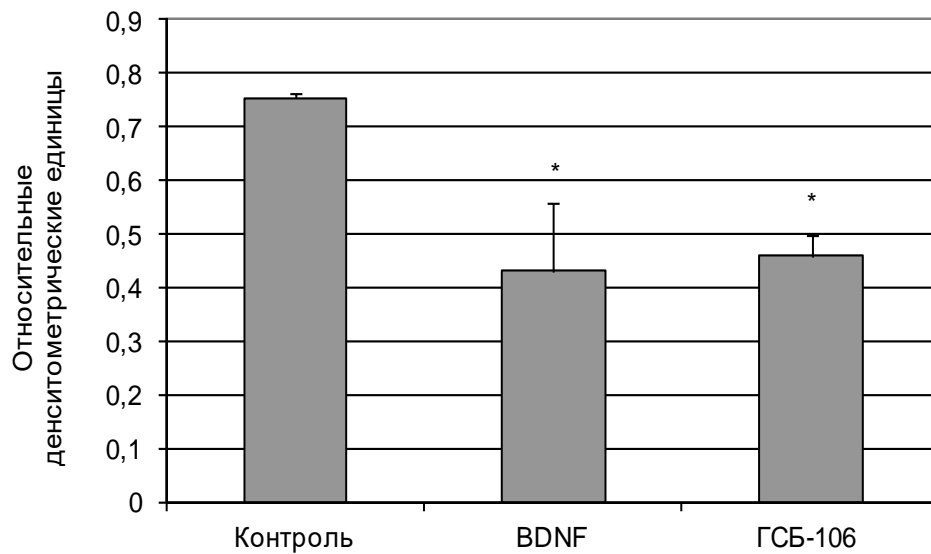


Рисунок 33 – Содержание NGF после внесения BDNF и ГСБ-106 в культуре клеток линии HT-22. (Оригинальный Вестерн-блот)



Примечание – статистически значимые отличия ($p \leq 0,05$, критерий Манна-Уитни): * – относительно контроля.

Рисунок 34 – Содержание NGF после внесения BDNF и ГСБ-106 в культуре клеток линии HT-22. Результаты денситометрии оригинальных Вестерн-блотов

На рисунках 33 и 34 видно, что BDNF и ГСБ-106 достоверно снижают содержание NGF в культуре нейронов линии HT-22 по сравнению с контролем. BDNF на 43%, ГСБ-106 на 39% соответственно.

Снижение содержания NGF может быть обусловлено модулирующим действием BDNF на рецептор p75, который находится во взаимодействии с Trk A рецептором NGF [90]. Дипептидный аналог BDNF – ГСБ-106 обладает

однонаправленным с ним действием на содержание NGF. Механизм этого действия может быть сходен с регуляторным механизмом BDNF.

Полученные результаты опубликованы в тезисах:

Логвинов, И.О. Нейропротекторный эффект пептидного миметика BDNF – ГСБ-106 in vitro (на культуре клеток) / И.О. Логвинов, Т.А. Антипова, А.В. Тарасюк, Т.А. Гудашева // Материалы 5-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам», 1-4 июня 2010 г., Москва. – М., 2010. - С. 58.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

5.1 Заключение

В экспериментах *in vitro* на модели окислительного стресса исследована фармакологическая активность димерных и мономерных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF. Установлено наличие нейропротекторного эффекта только у димерных миметиков 1-й (ГСБ-214), 2-й (ГТС-201) и 4-й (ГСБ-106) петель BDNF, мономерные же миметики не оказывали защитного действия. Далее для соединений с нейропротекторным действием (ГСБ-106, ГСБ-214 и ГТС-201) было изучено их влияние на фосфорилирование специфического для BDNF рецептора TrkB и активацию его пострецепторных сигнальных путей – PI3K/Akt, MAPK/Erk и PLC γ . Показано, что ГСБ-106, ГСБ-214 и ГТС-201 являются, подобно BDNF, агонистами тирозинкиназного рецептора TrkB. Однако, были выявлены различия в активации путей трансдукции сигнала. Установлено, что миметик 4-й петли ГСБ-106 активировал все три сигнальных пострецепторных пути: PI3K/Akt-, MAPK/Erk-киназый и PLC γ . В отличие от него миметик 1-й петли ГСБ-214 активировал только PI3K/Akt-киназый и PLC γ и не активировал MAPK/Erk-киназый, а миметик 2-й петли – активировал MAPK/Erk-киназый путь и PLC γ , но не влиял на фосфорилирование PI3K/Akt-киназного пути.

Поскольку ГСБ-106 был более фармакологически активен по сравнению с другими миметиками на модели окислительного стресса, а также активировал все три пострецепторные сигнальные пути TrkB рецептора, была исследована и установлена его нейропротекторная активность в условиях глутаматной и 6-гидроксидофаминовой токсичности.

Для выяснения возможных молекулярных механизмов цитопротекторного действия ГСБ-106 исследовано его влияние на индуцированный окислительным стрессом синтез протекторного белка

теплового шока гемоксигеназы-1 (HSP32) и содержание другого нейротрофина – фактора роста нервов NGF в культуре нейронов линии НТ-22.

Показано, что одним из возможных молекулярных механизмов нейропротекторного действия BDNF и ГСБ-106 является ограничение гиперактивации системы гемоксигеназы-1 (HSP32) в условиях окислительного стресса. Продемонстрировано регуляторное влияние BDNF и ГСБ-106 на содержание фактора роста нервов NGF в культуре гиппокампальных нейронов линии НТ-22.

В результате проведенных экспериментов для дальнейших доклинических исследований был отобран перспективный нейропротектор – димерный дипептидный миметик 4-й петли мозгового нейтрофического фактора ГСБ-106. К настоящему времени ГСБ-106 прошёл полный цикл доклинических исследований.

5.2 Практические рекомендации

Рекомендуется дальнейшая разработка дипептидного миметика 4-й петли мозгового нейротрофического фактора BDNF – ГСБ-106 в качестве нейропротекторного лекарственного препарата с нейротрофиноподобным механизмом действия.

ВЫВОДЫ

1. На модели окислительного стресса димерные дипептидные миметики 1-й (ГСБ-214), 2-й (ГТС-201) и 4-й (ГСБ-106) петель BDNF обладали цитопротекторным действием при внесении в культуре гиппокампальных клеток линии НТ-22 сразу после повреждения. Мономерные миметики 1-й (ГСБ-207) и 4-й (ГСБ-104) петель BDNF не проявляли нейропротекторную активность.

2. Выявлено, что димерные дипептидные миметики 1-й (ГСБ-214), 2-й (ГТС-201) и 4-й (ГСБ-106) петель BDNF не вызывали гиперпролиферацию гиппокампальных клеток линии НТ-22.

3. Показано, что при наличии у соединений, полученных на основе различных петлеобразных участков нейротрофина, способности фосфорилировать рецептор TrkB имеются существенные различия в активации путей трансдукции сигнала: миметик 4-й петли ГСБ-106 активировал PI3K/Akt и MAPK/Erk, миметик 1-й петли ГСБ-214 – PI3K/Akt, а миметик 2-й петли – MAPK/Erk. Установлено, что все три димерных дипептидных миметика BDNF активировали PLC γ .

4. Продемонстрировано нейропротекторное действие соединения-лидера – ГСБ-106 в условиях глутаматной токсичности на культуре гиппокампальных клеток линии НТ-22 и 6-гидроксидофаминовой нейротоксичности в клетках нейробластомы человека линии SH-SY5Y.

5. Показано, что ГСБ-106, подобно BDNF, в культуре клеток линии НТ-22 ограничивал, вызванную окислительным стрессом, гиперактивацию системы белка теплового шока гемоксигеназы-1.

6. Выявлено однонаправленное регуляторное влияние BDNF и ГСБ-106 на содержание фактора роста нервов NGF в культуре гиппокампальных клеток линии НТ-22.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ГАМК – γ -аминомасляная кислота

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium (среда для роста клеток)

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЦНС – центральная нервная система

АКТ – серин-треониновая протеинкиназа

BSA – бычий сывороточный альбумин

BDNF – мозговой нейротрофический фактор

CREB – cyclic AMP response element binding protein (транскрипционный фактор)

DMSO – диметилсульфоксид

DTT – дитиотреитол

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

ERK – экстраклеточная сигнал-регулируемая киназа

FBS – фетальная бычья сыворотка

МАРК – митоген-активируемая протеинкиназа

МТТ – бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5 дифенилтетразолия

Mtp70 – митохондриальный компонент семейства HSP

NGF – фактор роста нервов

NMDA – ионотропный рецептор глутамата, связывающий N-метил-D-аспартат

NF- κ B – ядерный фактор транскрипции

NT-3 – нейротрофин-3

NT-4 – нейротрофин-4

p75 – член семейства рецепторов TNF

Ras/ERK – митоген-активированный протеинкиназный каскад

PDB – банк данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот

PI-3K – фосфотидилинозитол-3-киназа

PLC γ – фосфолипаза C гамма

SH2- β – адапторные белки

Shc – src homology collagen-like protein (адаптерные белки)

TNF – рецептор tumor necrosis factor

TrkA – тирозинкиназные рецепторы типа A

TrkB – тирозинкиназные рецепторы типа B

TrkC – тирозинкиназные рецепторы типа C

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гудашева, Т.А. Синтез, конформационный анализ и анксиолитическая активность ретропептидных аналогов холецистокинина-4 / Т.А. Гудашева, В.П. Лезина, Е.П. Кирьянова (Филиппова), В.С. Троицкая, Л.Г. Колик, С.Б. Середенин // Химико-Фармацевтический Журнал. – 2006. – Т. 40 – № 7 – С. 21–26.
2. Гудашева, Т.А. Новые Низкомолекулярные Миметики Фактора Роста Нервов / Т.А. Гудашева, Т.А. Антипова (Зенина), С.Б. Середенин // Доклады Академии Наук. – 2010. – Т. 434 – № 4 – С. 549–552.
3. Патент № 2410392 С2 Российская Федерация, МПК С07К 5/062 (2006.01), С07К 5/068 (2006.01), С07К 5/072 (2006.01), А61К 38/05 (2006.01), А61Р 25/28 (2006.01). Дипептидные миметики нейротрофинов NGF и BDNF / С. Б. Середенин, Т. А. Гудашева, патентообладатель Учреждение Российской Академии медицинских наук Научноисследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова РАМН, заявка № 2009105176/04, дата подачи: 16.02.2009, опубликовано: 27.01.2011 Бюл. № 3.
4. A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III) // Neurology. – 1999. – Vol. 52 – № 7 – P. 1427–1433.
5. Agid, O. Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia / O. Agid, B. Shapira, J. Zislin, M. Ritsner, B. Hanin, H. Murad, T. Troudart, M. Bloch, U. Heresco-Levy, B. Lerer // Molecular Psychiatry. – 1999. – Vol. 4 – № 2 – P. 163–172.

6. Ahmed, F. Dimerization of the Trk receptors in the plasma membrane: effects of their cognate ligands / F. Ahmed, K. Hristova // *The Biochemical Journal*. – 2018. – Vol. 475 – № 22 – P. 3669–3685.
7. Albin, M. Astrocytes and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) / M. Albin, A. Krawczun-Rygmaczewska, F. Cesca // *Neuroscience Research*. – 2023. – Vol. 197 – P. 42–51.
8. Ali Shariati, M. A Small Molecule TrkB Neurotrophin Receptor Partial Agonist as Possible Treatment for Experimental Nonarteritic Anterior Ischemic Optic Neuropathy / M. Ali Shariati, V. Kumar, T. Yang, C. Chakraborty, B.A. Barres, F.M. Longo, Y.J. Liao // *Current Eye Research*. – 2018. – Vol. 43 – № 12 – P. 1489–1499.
9. Almeida, R.D. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways / R.D. Almeida, B.J. Manadas, C.V. Melo, J.R. Gomes, C.S. Mendes, M.M. Grãos, R.F. Carvalho, A.P. Carvalho, C.B. Duarte // *Cell Death and Differentiation*. – 2005. – Vol. 12 – № 10 – P. 1329–1343.
10. Al-Shawi, R. ProNGF, sortilin, and age-related neurodegeneration / R. Al-Shawi, A. Hafner, S. Chun, S. Raza, K. Crutcher, C. Thrasivoulou, P. Simons, T. Cowen // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2007. – Vol. 1119 – P. 208–215.
11. Ambrose, A.J. Function, Therapeutic Potential, and Inhibition of Hsp70 Chaperones / A.J. Ambrose, E. Chapman // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 64 – № 11 – P. 7060–7082.
12. Angeletti, R.H. Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence / R.H. Angeletti, R.A. Bradshaw // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1971. – Vol. 68 – № 10 – P. 2417–2420.

13. Angelucci, F. BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models / F. Angelucci, S. Brenè, A.A. Mathé // *Molecular Psychiatry*. – 2005. – Vol. 10 – № 4 – P. 345–352.
14. Arevalo, J.C. A novel mutation within the extracellular domain of TrkA causes constitutive receptor activation / J.C. Arevalo, B. Conde, B.I. Hempstead, M.V. Chao, D. Martín-Zanca, P. Pérez // *Oncogene*. – 2001. – Vol. 20 – № 10 – P. 1229–1234.
15. Autry, A.E. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders / A.E. Autry, L.M. Monteggia // *Pharmacological Reviews*. – 2012. – Vol. 64 – № 2 – P. 238–258.
16. Banfield, M.J. Specificity in Trk receptor:neurotrophin interactions: the crystal structure of TrkB-d5 in complex with neurotrophin-4/5 / M.J. Banfield, R.L. Naylor, A.G. Robertson, S.J. Allen, D. Dawbarn, R.L. Brady // *Structure* (London, England: 1993). – 2001. – Vol. 9 – № 12 – P. 1191–1199.
17. Barbacid, M. The Trk family of neurotrophin receptors / M. Barbacid // *Journal of Neurobiology*. – 1994. – Vol. 25 – № 11 – P. 1386–1403.
18. Barde, Y.A. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain / Y.A. Barde, D. Edgar, H. Thoenen // *The EMBO journal*. – 1982. – Vol. 1 – № 5 – P. 549–553.
19. Barrett, G.L. The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis / G.L. Barrett // *Progress in Neurobiology*. – 2000. – Vol. 61 – № 2 – P. 205–229.
20. Bath, K.G. Variant BDNF (Val66Met) impact on brain structure and function / K.G. Bath, F.S. Lee // *Cognitive, Affective & Behavioral Neuroscience*. – 2006. – Vol. 6 – № 1 – P. 79–85.

21. Bechtold, D.A. Localization of the heat-shock protein Hsp70 to the synapse following hyperthermic stress in the brain / D.A. Bechtold, S.J. Rush, I.R. Brown // *Journal of Neurochemistry*. – 2000. – Vol. 74 – № 2 – P. 641–646.
22. Beck, T. Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus / T. Beck, D. Lindholm, E. Castrén, A. Wree // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 1994. – Vol. 14 – № 4 – P. 689–692.
23. Beere, H.M. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis / H.M. Beere, D.R. Green // *Trends in Cell Biology*. – 2001. – Vol. 11 – № 1 – P. 6–10.
24. Berr, C. Enzymatic antioxidant balance and cognitive decline in aging--the EVA study / C. Berr, M.-J. Richard, V. Gourlet, C. Garrel, A. Favier // *European Journal of Epidemiology*. – 2004. – Vol. 19 – № 2 – P. 133–138.
25. Bibel, M. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR / M. Bibel, E. Hoppe, Y.A. Barde // *The EMBO journal*. – 1999. – Vol. 18 – № 3 – P. 616–622.
26. Bresnahan, P.A. Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo / P.A. Bresnahan, R. Leduc, L. Thomas, J. Thorner, H.L. Gibson, A.J. Brake, P.J. Barr, G. Thomas // *The Journal of Cell Biology*. – 1990. – Vol. 111 – № 6 Pt 2 – P. 2851–2859.
27. Cardenas-Aguayo, M. del C. Neurogenic and neurotrophic effects of BDNF peptides in mouse hippocampal primary neuronal cell cultures / M. del C. Cardenas-Aguayo, S.F. Kazim, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal // *PloS One*. – 2013. – Vol. 8 – № 1 – P. e53596.

28. Chao, M.V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways / M.V. Chao // *Nature Reviews. Neuroscience.* – 2003. – Vol. 4 – № 4 – P. 299–309.
29. Chao, M.V. Neurotrophin signalling in health and disease / M.V. Chao, R. Rajagopal, F.S. Lee // *Clinical Science (London, England: 1979).* – 2006. – Vol. 110 – № 2 – P. 167–173.
30. Chen, C. 7,8-dihydroxyflavone ameliorates scopolamine-induced Alzheimer-like pathologic dysfunction / C. Chen, X.-H. Li, S. Zhang, Y. Tu, Y.-M. Wang, H.-T. Sun // *Rejuvenation Research.* – 2014. – Vol. 17 – № 3 – P. 249–254.
31. Chen, J.-G. Effects of deoxygedunin on Alzheimer-like pathologic dysfunction induced by D-galactose combined with AlCl₃ / J.-G. Chen, Q.-C. Jiang, B. Wen, R.-Y. Wang, Y.-G. Wu, X. Li // *Chinese Journal of Applied Physiology.* – 2018. – Vol. 34 – № 6 – P. 496–500.
32. Ciccarone, V. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages / V. Ciccarone, B.A. Spengler, M.B. Meyers, J.L. Biedler, R.A. Ross // *Cancer Research.* – 1989. – Vol. 49 – № 1 – P. 219–225.
33. Colangelo, A.M. A new nerve growth factor-mimetic peptide active on neuropathic pain in rats / A.M. Colangelo, M.R. Bianco, L. Vitagliano, C. Cavaliere, G. Cirillo, L. De Gioia, D. Diana, D. Colombo, C. Redaelli, L. Zaccaro, G. Morelli, M. Papa, P. Sarmientos, L. Alberghina, E. Martegani // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience.* – 2008. – Vol. 28 – № 11 – P. 2698–2709.
34. Collazo, D. Cellular targets and trophic functions of neurotrophin-3 in the developing rat hippocampus / D. Collazo, H. Takahashi, R.D. McKay // *Neuron.* – 1992. – Vol. 9 – № 4 – P. 643–656.

35. Crawford, P.M. CSF gradients for amino acid neurotransmitters / P.M. Crawford, K.G. Lloyd, D.W. Chadwick // *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. – 1988. – Vol. 51 – № 9 – P. 1193–1200.
36. Curtis, R. Differential role of the low affinity neurotrophin receptor (p75) in retrograde axonal transport of the neurotrophins / R. Curtis, K.M. Adryan, J.L. Stark, J.S. Park, D.L. Compton, G. Weskamp, L.J. Huber, M.V. Chao, R. Jaenisch, K.F. Lee // *Neuron*. – 1995. – Vol. 14 – № 6 – P. 1201–1211.
37. Danysz, W. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action / W. Danysz, C.G. Parsons, H.J. Mobius, A. Stoffler, G. Quack // *Neurotoxicity Research*. – 2000. – Vol. 2 – № 2–3 – P. 85–97.
38. Davies, A.M. Neurotrophin-4/5 is a mammalian-specific survival factor for distinct populations of sensory neurons / A.M. Davies, A. Horton, L.E. Burton, C. Schmelzer, R. Vandlen, A. Rosenthal // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. – 1993. – Vol. 13 – № 11 – P. 4961–4967.
39. Davis, S.J. The *Arabidopsis thaliana* HY1 locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases / S.J. Davis, J. Kurepa, R.D. Vierstra // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1999. – Vol. 96 – № 11 – P. 6541–6546.
40. Dechant, G. Neurotrophins / G. Dechant, H. Neumann // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2002. – Vol. 513 – P. 303–334.
41. Du, Y.C. Function and molecular basis of action of vasopressin 4-8 and its analogues in rat brain / Y.C. Du, Q.W. Yan, L.Y. Qiao // *Progress in Brain Research*. – 1998. – Vol. 119 – P. 163–175.

42. Duan, W. Dietary restriction normalizes glucose metabolism and BDNF levels, slows disease progression, and increases survival in huntingtin mutant mice / W. Duan, Z. Guo, H. Jiang, M. Ware, X.-J. Li, M.P. Mattson // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – Vol. 100 – № 5 – P. 2911–2916.
43. Egan, M.F. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function / M.F. Egan, M. Kojima, J.H. Callicott, T.E. Goldberg, B.S. Kolachana, A. Bertolino, E. Zaitsev, B. Gold, D. Goldman, M. Dean, B. Lu, D.R. Weinberger // *Cell*. – 2003. – Vol. 112 – № 2 – P. 257–269.
44. Ellwood, M.S. Differential regulation of the 70K heat shock gene and related genes in *Saccharomyces cerevisiae* / M.S. Ellwood, E.A. Craig // *Molecular and Cellular Biology*. – 1984. – Vol. 4 – № 8 – P. 1454–1459.
45. Ernfors, P. Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain / P. Ernfors, C.F. Ibáñez, T. Ebendal, L. Olson, H. Persson // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1990. – Vol. 87 – № 14 – P. 5454–5458.
46. Escandón, E. Regulation of neurotrophin receptor expression during embryonic and postnatal development / E. Escandón, D. Soppet, A. Rosenthal, J.L. Mendoza-Ramírez, E. Szönyi, L.E. Burton, C.E. Henderson, L.F. Parada, K. Nikolics // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. – 1994. – Vol. 14 – № 4 – P. 2054–2068.
47. Ewing, J.F. In situ hybridization and immunohistochemical localization of heme oxygenase-2 mRNA and protein in normal rat brain: Differential distribution of isozyme 1 and 2 / J.F. Ewing, M.D. Maines // *Molecular and Cellular Neurosciences*. – 1992. – Vol. 3 – № 6 – P. 559–570.

48. Ferrer, I. Brain-derived neurotrophic factor reduces cortical cell death by ischemia after middle cerebral artery occlusion in the rat / I. Ferrer, J. Krupinski, E. Goutan, E. Martí, S. Ambrosio, E. Arenas // *Acta Neuropathologica*. – 2001. – Vol. 101 – № 3 – P. 229–238.
49. Finkbeiner, S. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses / S. Finkbeiner, S.F. Tavazoie, A. Maloratsky, K.M. Jacobs, K.M. Harris, M.E. Greenberg // *Neuron*. – 1997. – Vol. 19 – № 5 – P. 1031–1047.
50. Fletcher, J.M. Novel monocyclic and bicyclic loop mimetics of brain-derived neurotrophic factor / J.M. Fletcher, R.A. Hughes // *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*. – 2006. – Vol. 12 – № 8 – P. 515–524.
51. Fletcher, J.M. Modified low molecular weight cyclic peptides as mimetics of BDNF with improved potency, proteolytic stability and transmembrane passage in vitro / J.M. Fletcher, R.A. Hughes // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2009. – Vol. 17 – № 7 – P. 2695–2702.
52. Fobian, K. Peptides derived from the solvent-exposed loops 3 and 4 of BDNF bind TrkB and p75(NTR) receptors and stimulate neurite outgrowth and survival / K. Fobian, S. Owczarek, C. Budtz, E. Bock, V. Berezin, M.V. Pedersen // *Journal of Neuroscience Research*. – 2010. – Vol. 88 – № 6 – P. 1170–1181.
53. Foy, C.J. Plasma chain-breaking antioxidants in Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease / C.J. Foy, A.P. Passmore, M.D. Vahidassr, I.S. Young, J.T. Lawson // *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*. – 1999. – Vol. 92 – № 1 – P. 39–45.
54. Funakoshi, H. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve / H. Funakoshi, J. Frisé, G.

- Barbany, T. Timmusk, O. Zachrisson, V.M. Verge, H. Persson // *The Journal of Cell Biology*. – 1993. – Vol. 123 – № 2 – P. 455–465.
55. García-Díaz Barriga, G. 7,8-dihydroxyflavone ameliorates cognitive and motor deficits in a Huntington's disease mouse model through specific activation of the PLC γ 1 pathway / G. García-Díaz Barriga, A. Giralt, M. Anglada-Huguet, N. Gaja-Capdevila, J.G. Orlandi, J. Soriano, J.-M. Canals, J. Alberch // *Human Molecular Genetics*. – 2017. – Vol. 26 – № 16 – P. 3144–3160.
56. Gibbs, R.B. Levels of trkA and BDNF mRNA, but not NGF mRNA, fluctuate across the estrous cycle and increase in response to acute hormone replacement / R.B. Gibbs // *Brain Research*. – 1998. – Vol. 787 – № 2 – P. 259–268.
57. Gnahn, H. NGF-mediated increase of choline acetyltransferase (ChAT) in the neonatal rat forebrain: evidence for a physiological role of NGF in the brain? / H. Gnahn, F. Hefti, R. Heumann, M.E. Schwab, H. Thoenen // *Brain Research*. – 1983. – Vol. 285 – № 1 – P. 45–52.
58. Gómez-Palacio-Schjetnan, A. Neurotrophins and synaptic plasticity / A. Gómez-Palacio-Schjetnan, M.L. Escobar // *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. – 2013. – Vol. 15 – P. 117–136.
59. Gordon, T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration / T. Gordon // *Neurosurgical Focus*. – 2009. – Vol. 26 – № 2 – P. E3.
60. Gorin, P.D. Effects of long-term nerve growth factor deprivation on the nervous system of the adult rat: an experimental autoimmune approach / P.D. Gorin, E.M. Johnson // *Brain Research*. – 1980. – Vol. 198 – № 1 – P. 27–42.
61. Götz, R. The conservation of neurotrophic factors during vertebrate evolution / R. Götz, M. Scharl // *Comparative Biochemistry and Physiology*.

- Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. – 1994. – Vol. 108 – № 1 – P. 1–10.
62. Gu, F. Partial TrkB receptor activation suppresses cortical epileptogenesis through actions on parvalbumin interneurons / F. Gu, I. Parada, T. Yang, F.M. Longo, D.A. Prince // *Neurobiology of Disease*. – 2018. – Vol. 113 – P. 45–58.
63. Gudasheva, T.A. Dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor Loop 4 and Loop 1 activate TRKA with different patterns of intracellular signal transduction / T.A. Gudasheva, P.Y. Povarnina, T.A. Antipova, Y.N. Firsova, M.A. Konstantinopolsky, S.B. Seredenin // *Journal of Biomedical Science*. – 2015. – Vol. 22 – № 5 – P. 106.
64. Hallböök, F. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in xenopus ovary / F. Hallböök, C.F. Ibáñez, H. Persson // *Neuron*. – 1991. – Vol. 6 – № 5 – P. 845–858.
65. Han, J. Delayed administration of a small molecule tropomyosin-related kinase B ligand promotes recovery after hypoxic-ischemic stroke / J. Han, J. Pollak, T. Yang, M.R. Siddiqui, K.P. Doyle, K. Taravosh-Lahn, E. Cekanaviciute, A. Han, J.Z. Goodman, B. Jones, D. Jing, S.M. Massa, F.M. Longo, M.S. Buckwalter // *Stroke*. – 2012. – Vol. 43 – № 7 – P. 1918–1924.
66. Henderson, C.E. Role of neurotrophic factors in neuronal development / C.E. Henderson // *Current Opinion in Neurobiology*. – 1996. – Vol. 6 – № 1 – P. 64–70.
67. Hock, C. Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas / C. Hock, K. Heese, C. Hulette, C. Rosenberg, U. Otten // *Archives of Neurology*. – 2000. – Vol. 57 – № 6 – P. 846–851.

68. Hohn, A. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family / A. Hohn, J. Leibrock, K. Bailey, Y.A. Barde // *Nature*. – 1990. – Vol. 344 – № 6264 – P. 339–341.
69. Hota, S.K. Differential temporal response of hippocampus, cortex and cerebellum to hypobaric hypoxia: a biochemical approach / S.K. Hota, K. Barhwal, S.B. Singh, G. Ilavazhagan // *Neurochemistry International*. – 2007. – Vol. 51 – № 6–7 – P. 384–390.
70. Hughes, R.A. Small cyclic mimics of brain-derived neurotrophic factor (bDNF) [Электронный ресурс] / R.A. Hughes, P. O’leary, R. Zwar, A. Hunt-Sturman. – 2000.
71. Ibáñez, C.F. Chimeric molecules with multiple neurotrophic activities reveal structural elements determining the specificities of NGF and BDNF / C.F. Ibáñez, T. Ebendal, H. Persson // *The EMBO journal*. – 1991. – Vol. 10 – № 8 – P. 2105–2110.
72. Ibáñez, C.F. An extended surface of binding to Trk tyrosine kinase receptors in NGF and BDNF allows the engineering of a multifunctional pan-neurotrophin / C.F. Ibáñez, L.L. Ilag, J. Murray-Rust, H. Persson // *The EMBO journal*. – 1993. – Vol. 12 – № 6 – P. 2281–2293.
73. Ibáñez, C.F. Neurotrophic factors: From structure-function studies to designing effective therapeutics / C.F. Ibáñez // *Trends in Biotechnology*. – 1995. – Vol. 13 – № 6 – P. 217–227.
74. Iwasaki, Y. Association of the Src family tyrosine kinase Fyn with TrkB / Y. Iwasaki, B. Gay, K. Wada, S. Koizumi // *Journal of Neurochemistry*. – 1998. – Vol. 71 – № 1 – P. 106–111.
75. Jackson, G.R. Nerve growth factor effects on pyridine nucleotides after oxidant injury of rat pheochromocytoma cells / G.R. Jackson, K. Werrbach-Perez, E.L.

- Ezell, J.F. Post, J.R. Perez-Polo // *Brain Research*. – 1992. – Vol. 592 – № 1–2 – P. 239–248.
76. Jang, S.-W. A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone / S.-W. Jang, X. Liu, M. Yepes, K.R. Shepherd, G.W. Miller, Y. Liu, W.D. Wilson, G. Xiao, B. Blanchi, Y.E. Sun, K. Ye // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Vol. 107 – № 6 – P. 2687–2692.
77. Jang, S.-W. Deoxygedunin, a natural product with potent neurotrophic activity in mice / S.-W. Jang, X. Liu, C.B. Chan, S.A. France, I. Sayeed, W. Tang, X. Lin, G. Xiao, R. Andero, Q. Chang, K.J. Ressler, K. Ye // *PloS One*. – 2010. – Vol. 5 – № 7 – P. e11528.
78. Jiang, M. Small-molecule TrkB receptor agonists improve motor function and extend survival in a mouse model of Huntington's disease / M. Jiang, Q. Peng, X. Liu, J. Jin, Z. Hou, J. Zhang, S. Mori, C.A. Ross, K. Ye, W. Duan // *Human Molecular Genetics*. – 2013. – Vol. 22 – № 12 – P. 2462–2470.
79. Johnson, E.M. Molecular mechanisms of developmental neuronal death / E.M. Johnson, T.L. Deckwerth // *Annual Review of Neuroscience*. – 1993. – Vol. 16 – P. 31–46.
80. Johnson, R.A. 7,8-dihydroxyflavone exhibits therapeutic efficacy in a mouse model of Rett syndrome / R.A. Johnson, M. Lam, A.M. Punzo, H. Li, B.R. Lin, K. Ye, G.S. Mitchell, Q. Chang // *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*. – 2012. – Vol. 112 – № 5 – P. 704–710.
81. Jovanovic, J.N. Brain-derived neurotrophic factor modulates fast synaptic inhibition by regulating GABA(A) receptor phosphorylation, activity, and cell-surface stability / J.N. Jovanovic, P. Thomas, J.T. Kittler, T.G. Smart, S.J. Moss // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. – 2004. – Vol. 24 – № 2 – P. 522–530.

82. Kajiya, M. BDNF mimetic compound LM22A-4 regulates cementoblast differentiation via the TrkB-ERK/Akt signaling cascade / M. Kajiya, K. Takeshita, M. Kittaka, S. Matsuda, K. Ouhara, K. Takeda, T. Takata, M. Kitagawa, T. Fujita, H. Shiba, H. Kurihara // *International Immunopharmacology*. – 2014. – Vol. 19 – № 2 – P. 245–252.
83. Kanazawa, I. How do neurons die in neurodegenerative diseases? / I. Kanazawa // *Trends in Molecular Medicine*. – 2001. – Vol. 7 – № 8 – P. 339–344.
84. Kaplan, D.R. Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor / D.R. Kaplan, R.M. Stephens // *Journal of Neurobiology*. – 1994. – Vol. 25 – № 11 – P. 1404–1417.
85. Kaplan, D.R. Neurotrophin signal transduction in the nervous system / D.R. Kaplan, F.D. Miller // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2000. – Vol. 10 – № 3 – P. 381–391.
86. Karchewski, L.A. Dynamic patterns of BDNF expression in injured sensory neurons: differential modulation by NGF and NT-3 / L.A. Karchewski, K.A. Gratto, C. Wetmore, V.M.K. Verge // *The European Journal of Neuroscience*. – 2002. – Vol. 16 – № 8 – P. 1449–1462.
87. Katoh-Semba, R. NT-4 protein is localized in neuronal cells in the brain stem as well as the dorsal root ganglion of embryonic and adult rats / R. Katoh-Semba, S. Ichisaka, Y. Hata, T. Tsumoto, K. Eguchi, N. Miyazaki, M. Matsuda, I.K. Takeuchi, K. Kato // *Journal of Neurochemistry*. – 2003. – Vol. 86 – № 3 – P. 660–668.
88. Kelley, W.L. The J-domain family and the recruitment of chaperone power / W.L. Kelley // *Trends in Biochemical Sciences*. – 1998. – Vol. 23 – № 6 – P. 222–227.

89. Kenny, P.J. Acute nicotine decreases, and chronic nicotine increases the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus / P.J. Kenny, S.E. File, M. Rattray // *Brain Research. Molecular Brain Research*. – 2000. – Vol. 85 – № 1–2 – P. 234–238.
90. Kraemer, B.R. The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor / B.R. Kraemer, S.O. Yoon, B.D. Carter // *Handbook of Experimental Pharmacology*. – 2014. – Vol. 220 – P. 121–164.
91. Kron, M. A BDNF loop-domain mimetic acutely reverses spontaneous apneas and respiratory abnormalities during behavioral arousal in a mouse model of Rett syndrome / M. Kron, M. Lang, I.T. Adams, M. Sceniak, F. Longo, D.M. Katz // *Disease Models & Mechanisms*. – 2014. – Vol. 7 – № 9 – P. 1047–1055.
92. Kullander, K. Two restricted sites on the surface of the nerve growth factor molecule independently determine specific TrkA receptor binding and activation / K. Kullander, D. Kaplan, T. Ebendal // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272 – № 14 – P. 9300–9307.
93. Lai, K.-O. Cloning and Expression of a Novel Neurotrophin, NT-7, from Carp / K.-O. Lai, W.-Y. Fu, F.C.F. Ip, N.Y. Ip // *Molecular and Cellular Neuroscience*. – 1998. – Vol. 11 – № 1–2 – P. 64–76.
94. Laske, C. Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease / C. Laske, E. Stransky, T. Leyhe, G.W. Eschweiler, A. Wittorf, E. Richartz, M. Bartels, G. Buchkremer, K. Schott // *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*. – 2006. – Vol. 113 – № 9 – P. 1217–1224.
95. Lavrovsky, Y. Novel regulatory sites of the human heme oxygenase-1 promoter region / Y. Lavrovsky, M.L. Schwartzman, N.G. Abraham //

- Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1993. – Vol. 196 – № 1 – P. 336–341.
96. Law, A. Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type / A. Law, S. Gauthier, R. Quirion // Brain Research. Brain Research Reviews. – 2001. – Vol. 35 – № 1 – P. 73–96.
97. Lee, F.S. The uniqueness of being a neurotrophin receptor / F.S. Lee, A.H. Kim, G. Khursigara, M.V. Chao // Current Opinion in Neurobiology. – 2001. – Vol. 11 – № 3 – P. 281–286.
98. Lee, L. Emergence of broad cytosolic Ca²⁺ oscillations in the absence of CRAC channels: A model for CRAC-mediated negative feedback on PLC and Ca²⁺ oscillations through PKC / L. Lee, R. Yoast, S. Emrich, M. Trebak, V. Kirk, J. Sneyd // Journal of Theoretical Biology. – 2024. – Vol. 581 – P. 111740.
99. Leibrock, J. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor / J. Leibrock, F. Lottspeich, A. Hohn, M. Hofer, B. Hengerer, P. Masiakowski, H. Thoenen, Y.-A. Barde // Nature. – Nature Publishing Group, 1989. – Vol. 341 – № 6238 – P. 149–152.
100. Lemmon, M.A. Cell signaling by receptor tyrosine kinases / M.A. Lemmon, J. Schlessinger // Cell. – 2010. – Vol. 141 – № 7 – P. 1117–1134.
101. Lessmann, V. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects / V. Lessmann, K. Gottmann, M. Malcangio // Progress in Neurobiology. – 2003. – Vol. 69 – № 5 – P. 341–374.
102. Levi-Montalcini, R. The Nerve Growth Factor 35 Years Later / R. Levi-Montalcini // Science. – American Association for the Advancement of Science, 1987. – Vol. 237 – № 4819 – P. 1154–1162.

103. Levy, Y.S. Therapeutic potential of neurotrophic factors in neurodegenerative diseases / Y.S. Levy, Y. Gilgun-Sherki, E. Melamed, D. Offen // *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*. – 2005. – Vol. 19 – № 2 – P. 97–127.
104. Li, W. A small-molecule TrkB ligand restores hippocampal synaptic plasticity and object location memory in Rett syndrome mice / W. Li, A. Bellot-Saez, M.L. Phillips, T. Yang, F.M. Longo, L. Pozzo-Miller // *Disease Models & Mechanisms*. – 2017. – Vol. 10 – № 7 – P. 837–845.
105. Lindvall, O. Neurotrophins and brain insults / O. Lindvall, Z. Kokaia, J. Bengzon, E. Elmér, M. Kokaia // *Trends in Neurosciences*. – 1994. – Vol. 17 – № 11 – P. 490–496.
106. Liu, J. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties / J. Liu, L. Li, W.Z. Suo // *Life Sciences*. – 2009. – Vol. 84 – № 9–10 – P. 267–271.
107. Liu, X. A synthetic 7,8-dihydroxyflavone derivative promotes neurogenesis and exhibits potent antidepressant effect / X. Liu, C.-B. Chan, S.-W. Jang, S. Pradoldej, J. Huang, K. He, L.H. Phun, S. France, G. Xiao, Y. Jia, H.R. Luo, K. Ye // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2010. – Vol. 53 – № 23 – P. 8274–8286.
108. Liu, H. MicroRNA-204-5p mediates sevoflurane-induced cytotoxicity in HT22 cells by targeting brain-derived neurotrophic factor / H. Liu, J. Wang, R. Yan, S. Jin, Z. Wan, J. Cheng, N. Li, L. Chen, C. Le // *Histology and Histopathology*. – 2020. – Vol. 35 – № 11 – P. 1353–1361.
109. Longo, F.M. The in vitro biological effect of nerve growth factor is inhibited by synthetic peptides / F.M. Longo, T.K. Vu, W.C. Mobley // *Cell Regulation*. – 1990. – Vol. 1 – № 2 – P. 189–195.

110. Longo, F.M. Synthetic peptides derivatives with nerve growth factor-like neurotrophic activity [Электронный ресурс] / F.M. Longo, M. Manthorpe. – 1999.
111. Lu, B. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases / B. Lu, G. Nagappan, X. Guan, P.J. Nathan, P. Wren // *Nature Reviews. Neuroscience*. – 2013. – Vol. 14 – № 6 – P. 401–416.
112. Luo, D. 7,8-dihydroxyflavone protects 6-OHDA and MPTP induced dopaminergic neurons degeneration through activation of TrkB in rodents / D. Luo, Y. Shi, J. Wang, Q. Lin, Y. Sun, K. Ye, Q. Yan, H. Zhang // *Neuroscience Letters*. – 2016. – Vol. 620 – P. 43–49.
113. MacLennan, A.J. Chronic ethanol administration decreases brain-derived neurotrophic factor gene expression in the rat hippocampus / A.J. MacLennan, N. Lee, D.W. Walker // *Neuroscience Letters*. – 1995. – Vol. 197 – № 2 – P. 105–108.
114. Maines, M.D. The heme oxygenase system and its functions in the brain / M.D. Maines // *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*. – 2000. – Vol. 46 – № 3 – P. 573–585.
115. Maisonpierre, P.C. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF / P.C. Maisonpierre, L. Belluscio, S. Squinto, N.Y. Ip, M.E. Furth, R.M. Lindsay, G.D. Yancopoulos // *Science (New York, N.Y.)*. – 1990. – Vol. 247 – № 4949 Pt 1 – P. 1446–1451.
116. Makar, T.K. TrkB agonist, 7,8-dihydroxyflavone, reduces the clinical and pathological severity of a murine model of multiple sclerosis / T.K. Makar, V.K.C. Nimmagadda, I.S. Singh, K. Lam, F. Mubariz, S.I.V. Judge, D. Trisler, C.T. Bever // *Journal of Neuroimmunology*. – 2016. – Vol. 292 – P. 9–20.

117. Malyshev, I.I. Heat shock proteins and heart protection / I.I. Malyshev, E.V. Malysheva // *Biulleten' Eksperimental'noi Biologii I Meditsiny*. – 1998. – Vol. 126 – № 12 – P. 604–611.
118. Mark, L.P. Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging / L.P. Mark, R.W. Prost, J.L. Ulmer, M.M. Smith, D.L. Daniels, J.M. Strottmann, W.D. Brown, L. Hacein-Bey // *AJNR. American journal of neuroradiology*. – 2001. – Vol. 22 – № 10 – P. 1813–1824.
119. Martínez, H.J. Nerve growth factor promotes cholinergic development in brain striatal cultures / H.J. Martínez, C.F. Dreyfus, G.M. Jonakait, I.B. Black // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1985. – Vol. 82 – № 22 – P. 7777–7781.
120. Massa, S.M. Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents / S.M. Massa, T. Yang, Y. Xie, J. Shi, M. Bilgen, J.N. Joyce, D. Nehama, J. Rajadas, F.M. Longo // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2010. – Vol. 120 – № 5 – P. 1774–1785.
121. Matera, K.M. Histidine-132 does not stabilize a distal water ligand and is not an important residue for the enzyme activity in heme oxygenase-1 / K.M. Matera, H. Zhou, C.T. Migita, S.E. Hobert, K. Ishikawa, K. Katakura, H. Maeshima, T. Yoshida, M. Ikeda-Saito // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36 – № 16 – P. 4909–4915.
122. Matsuoka, Y. Expression profiles of BDNF splice variants in cultured DRG neurons stimulated with NGF / Y. Matsuoka, M. Yokoyama, H. Kobayashi, M. Omori, Y. Itano, K. Morita, H. Mori, T. Nakanishi // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2007. – Vol. 362 – № 3 – P. 682–688.
123. McCoubrey, W.K. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3 / W.K. McCoubrey, T.J. Huang,

- M.D. Maines // *European Journal of Biochemistry*. – 1997. – Vol. 247 – № 2 – P. 725–732.
124. McDonald, N.Q. Crystallization and characterization of the high molecular weight form of nerve growth factor (7 S NGF) / N.Q. McDonald, T.L. Blundell // *Journal of Molecular Biology*. – 1991. – Vol. 219 – № 4 – P. 595–601.
125. McDonald, N.Q. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif / N.Q. McDonald, W.A. Hendrickson // *Cell*. – 1993. – Vol. 73 – № 3 – P. 421–424.
126. Mezhlumyan, A.G. Antidepressant-like Effects of BDNF and NGF Individual Loop Dipeptide Mimetics Depend on the Signal Transmission Patterns Associated with Trk / A.G. Mezhlumyan, A.V. Tallerova, P.Y. Povarnina, A.V. Tarasiuk, N.M. Sazonova, T.A. Gudasheva, S.B. Seredenin // *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*. – 2022. – Vol. 15 – № 3 – P. 284.
127. Mobley, W.C. Choline acetyltransferase activity in striatum of neonatal rats increased by nerve growth factor / W.C. Mobley, J.L. Rutkowski, G.I. Tennekoon, K. Buchanan, M.V. Johnston // *Science (New York, N.Y.)*. – 1985. – Vol. 229 – № 4710 – P. 284–287.
128. Muller, Y. Autocrine regulation of apoptosis and bcl-2 expression by nerve growth factor in early differentiating cerebellar granule neurons involves low affinity neurotrophin receptor / Y. Muller, K. Tangre, J. Clos // *Neurochemistry International*. – 1997. – Vol. 31 – № 2 – P. 177–191.
129. Nawa, H. Regulation of neuropeptide expression in cultured cerebral cortical neurons by brain-derived neurotrophic factor / H. Nawa, Y. Bessho, J. Carnahan, S. Nakanishi, K. Mizuno // *Journal of Neurochemistry*. – 1993. – Vol. 60 – № 2 – P. 772–775.

130. Neeper, S.A. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain / S.A. Neeper, F. Gómez-Pinilla, J. Choi, C.W. Cotman // *Brain Research*. – 1996. – Vol. 726 – № 1 – P. 49–56.
131. Nguyen, H.T.H. TrkB Agonist LM22A-4 Increases Oligodendroglial Populations During Myelin Repair in the Corpus Callosum / H.T.H. Nguyen, R.J. Wood, A.R. Prawdiuk, S.G.B. Furness, J. Xiao, S.S. Murray, J.L. Fletcher // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2019. – Vol. 12 – P. 205.
132. Nie, S. Small molecule TrkB agonist deoxygedunin protects nigrostriatal dopaminergic neurons from 6-OHDA and MPTP induced neurotoxicity in rodents / S. Nie, Y. Xu, G. Chen, K. Ma, C. Han, Z. Guo, Z. Zhang, K. Ye, X. Cao // *Neuropharmacology*. – 2015. – Vol. 99 – P. 448–458.
133. Nilsson, A.-S. Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish / A.-S. Nilsson, M. Fainzilber, P. Falck, C.F. Ibáñez // *FEBS Letters*. – 1998. – Vol. 424 – № 3 – P. 285–290.
134. Obermeier, A. Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex / A. Obermeier, R. Lammers, K.H. Wiesmüller, G. Jung, J. Schlessinger, A. Ullrich // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1993. – Vol. 268 – № 31 – P. 22963–22966.
135. Ochs, G. A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis / G. Ochs, R.D. Penn, M. York, R. Giess, M. Beck, J. Tonn, J. Haigh, E. Malta, M. Traub, M. Sendtner, K.V. Toyka // *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders: Official Publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases*. – 2000. – Vol. 1 – № 3 – P. 201–206.

136. Ohtsuka, K. Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40-- a review / K. Ohtsuka, M. Hata // *International Journal of Hyperthermia: The Official Journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group.* – 2000. – Vol. 16 – № 3 – P. 231–245.
137. Olson, C.L. Molecular and biochemical comparison of the 70-kDa heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi* / C.L. Olson, K.C. Nadeau, M.A. Sullivan, A.G. Winkquist, J.E. Donelson, C.T. Walsh, D.M. Engman // *The Journal of Biological Chemistry.* – 1994. – Vol. 269 – № 5 – P. 3868–3874.
138. O'Malley, B. The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future / B. O'Malley // *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.).* – 1990. – Vol. 4 – № 3 – P. 363–369.
139. Patapoutian, A. Trk receptors: mediators of neurotrophin action / A. Patapoutian, L.F. Reichardt // *Current Opinion in Neurobiology.* – 2001. – Vol. 11 – № 3 – P. 272–280.
140. Pattarawarapan, M. Molecular basis of neurotrophin-receptor interactions / M. Pattarawarapan, K. Burgess // *Journal of Medicinal Chemistry.* – 2003. – Vol. 46 – № 25 – P. 5277–5291.
141. Peng, S. Decreased brain-derived neurotrophic factor depends on amyloid aggregation state in transgenic mouse models of Alzheimer's disease / S. Peng, D.J. Garzon, M. Marchese, W. Klein, S.D. Ginsberg, B.M. Francis, H.T.J. Mount, E.J. Mufson, A. Salehi, M. Fahnstock // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience.* – 2009. – Vol. 29 – № 29 – P. 9321–9329.
142. Penn, R.D. Intrathecal ciliary neurotrophic factor delivery for treatment of amyotrophic lateral sclerosis (phase I trial) / R.D. Penn, J.S. Kroin, M.M. York, J.M. Cedarbaum // *Neurosurgery.* – 1997. – Vol. 40 – № 1 – P. 94–99; discussion 99-100.

143. Perier, C. Mitochondrial biology and Parkinson's disease / C. Perier, M. Vila // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. – 2012. – Vol. 2 – № 2 – P. a009332.
144. Poduslo, J.F. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF / J.F. Poduslo, G.L. Curran // Brain Research. Molecular Brain Research. – 1996. – Vol. 36 – № 2 – P. 280–286.
145. Pollack, S.J. Small molecule Trk receptor agonists and other neurotrophic factor mimetics / S.J. Pollack, S.J. Harper // Current drug targets. CNS and neurological disorders. – 2002. – Vol. 1 – № 1 – P. 59–80.
146. Qian, X. Identification and characterization of novel substrates of Trk receptors in developing neurons / X. Qian, A. Riccio, Y. Zhang, D.D. Ginty // Neuron. – 1998. – Vol. 21 – № 5 – P. 1017–1029.
147. Rai, R. Similarities and Differences of Hsp70, hsc70, Grp78 and Mortalin as Cancer Biomarkers and Drug Targets / R. Rai, A.L. Kennedy, Z.R. Isingizwe, P. Javadian, D.M. Benbrook // Cells. – 2021. – Vol. 10 – № 11 – P. 2996.
148. Reichardt, L.F. Neurotrophin-regulated signalling pathways / L.F. Reichardt // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. – 2006. – Vol. 361 – № 1473 – P. 1545–1564.
149. Rhee, S.G. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C / S.G. Rhee // Annual Review of Biochemistry. – 2001. – Vol. 70 – P. 281–312.
150. Richter, M. SK channel activation modulates mitochondrial respiration and attenuates neuronal HT-22 cell damage induced by H₂O₂ / M. Richter, C. Nickel, L. Apel, A. Kaas, R. Dodel, C. Culmsee, A.M. Dolga // Neurochemistry International. – 2015. – Vol. 81 – P. 63–75.

151. Ritossa, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila / F. Ritossa // *Experientia*. – 1962. – Vol. 18 – № 12 – P. 571–573.
152. Riveles, K. Cigarette smoke, nicotine and cotinine protect against 6-hydroxydopamine-induced toxicity in SH-SY5Y cells / K. Riveles, L.Z. Huang, M. Quik // *NeuroToxicology*. – 2008. – Vol. 29 – № 3 – P. 421–427.
153. Robinson, R.C. Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer / R.C. Robinson, C. Radziejewski, D.I. Stuart, E.Y. Jones // *Biochemistry*. – 1995. – Vol. 34 – № 13 – P. 4139–4146.
154. Robinson, R.C. The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site / R.C. Robinson, C. Radziejewski, G. Spraggon, J. Greenwald, M.R. Kostura, L.D. Burtnick, D.I. Stuart, S. Choe, E.Y. Jones // *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. – 1999. – Vol. 8 – № 12 – P. 2589–2597.
155. Rodríguez-Tébar, A. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor / A. Rodríguez-Tébar, G. Dechant, Y.A. Barde // *Neuron*. – 1990. – Vol. 4 – № 4 – P. 487–492.
156. Rodríguez-Tébar, A. Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor / A. Rodríguez-Tébar, G. Dechant, R. Götz, Y.A. Barde // *The EMBO journal*. – 1992. – Vol. 11 – № 3 – P. 917–922.
157. Rose, C.R. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels / C.R. Rose, R. Blum, K.W. Kafitz, Y. Kovalchuk, A. Konnerth // *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. – 2004. – Vol. 26 – № 11 – P. 1185–1194.

158. Rosenthal, A. Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor / A. Rosenthal, D.V. Goeddel, T. Nguyen, M. Lewis, A. Shih, G.R. Laramée, K. Nikolics, J.W. Winslow // *Neuron*. – 1990. – Vol. 4 – № 5 – P. 767–773.
159. Said, S.I. Molecules that protect: the defense of neurons and other cells / S.I. Said // *The Journal of Clinical Investigation*. – 1996. – Vol. 97 – № 10 – P. 2163–2164.
160. Saragovi, U.H. Nerve growth factor structural analogs and their uses [Электронный ресурс] / U.H. Saragovi, L. Lesauteur, C.A. Cuello. – 2000.
161. Schacter, B.A. Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system / B.A. Schacter, E.B. Nelson, H.S. Marver, B.S. Masters // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1972. – Vol. 247 – № 11 – P. 3601–3607.
162. Schipper, H.M. Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration / H.M. Schipper // *Experimental Gerontology*. – 2000. – Vol. 35 – № 6–7 – P. 821–830.
163. Schlessinger, J. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases / J. Schlessinger, A. Ullrich // *Neuron*. – 1992. – Vol. 9 – № 3 – P. 383–391.
164. Schmidt-Kastner, R. Transient changes of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in hippocampus during moderate ischemia induced by chronic bilateral common carotid artery occlusions in the rat / R. Schmidt-Kastner, J. Truettner, B. Lin, W. Zhao, I. Saul, R. Busto, M.D. Ginsberg // *Brain Research. Molecular Brain Research*. – 2001. – Vol. 92 – № 1–2 – P. 157–166.
165. Schmitt, M.P. Iron-dependent regulation of diphtheria toxin and siderophore expression by the cloned *Corynebacterium diphtheriae* repressor gene *dtxR* in

- C. diphtheriae C7 strains / M.P. Schmitt, R.K. Holmes // *Infection and Immunity*. – 1991. – Vol. 59 – № 6 – P. 1899–1904.
166. Seagar, M. Interactions between proteins implicated in exocytosis and voltage-gated calcium channels / M. Seagar, C. Lévêque, N. Charvin, B. Marquèze, N. Martin-Moutot, J.A. Boudier, J.L. Boudier, Y. Shoji-Kasai, K. Sato, M. Takahashi // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. – 1999. – Vol. 354 – № 1381 – P. 289–297.
167. Segal, R.A. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors / R.A. Segal, M.E. Greenberg // *Annual Review of Neuroscience*. – 1996. – Vol. 19 – P. 463–489.
168. Seidah, N. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases / N. Seidah, S. Benjannet, S. Pareek, D. Savaria, J. HAMELIN, B. GOULET, J. LALIBERTÉ, C. LAZURE, M. Chretien, R. MURPHY // *The Biochemical Journal*. – 1996. – Vol. 314 (Pt 3) – № Pt 3 – P. 951–60.
169. Seredenin, S.B. An experimental evaluation of the therapeutic window of the neuroprotective activity of a low-molecular nerve growth factor mimetic GK-2 / S.B. Seredenin, P.Yu. Povarnina, T.A. Gudasheva // *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. – 2018. – Vol. 118 – № 7 – P. 49.
170. Singh, M. The effect of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid expression in cortical and hippocampal brain regions of female Sprague-Dawley rats / M. Singh, E.M. Meyer, J.W. Simpkins // *Endocrinology*. – 1995. – Vol. 136 – № 5 – P. 2320–2324.
171. Sklar, P. Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. Brain-derived neurotrophic factor / P. Sklar, S.B. Gabriel, M.G. McInnis, P. Bennett, Y.-M. Lim, G. Tsan, S.

- Schaffner, G. Kirov, I. Jones, M. Owen, N. Craddock, J.R. DePaulo, E.S. Lander // *Molecular Psychiatry*. – 2002. – Vol. 7 – № 6 – P. 579–593.
172. Smeyne, R.J. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene / R.J. Smeyne, R. Klein, A. Schnapp, L.K. Long, S. Bryant, A. Lewin, S.A. Lira, M. Barbacid // *Nature*. – 1994. – Vol. 368 – № 6468 – P. 246–249.
173. Smith, M.A. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus / M.A. Smith, S. Makino, R. Kvetnansky, R.M. Post // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. – 1995. – Vol. 15 – № 3 Pt 1 – P. 1768–1777.
174. Sohrabji, F. Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor / F. Sohrabji, R.C. Miranda, C.D. Toran-Allerand // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1995. – Vol. 92 – № 24 – P. 11110–11114.
175. Stanga, S. How to Build and to Protect the Neuromuscular Junction: The Role of the Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor / S. Stanga, M. Boido, P. Kienlen-Campard // *International Journal of Molecular Sciences*. – Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. – Vol. 22 – № 1 – P. 136.
176. Stephens, R.M. Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses / R.M. Stephens, D.M. Loeb, T.D. Copeland, T. Pawson, L.A. Greene, D.R. Kaplan // *Neuron*. – 1994. – Vol. 12 – № 3 – P. 691–705.
177. Sun, Y. Developmental expression of heme oxygenase isozymes in rat brain. Two HO-2 mRNAs are detected / Y. Sun, M.O. Rotenberg, M.D. Maines // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1990. – Vol. 265 – № 14 – P. 8212–8217.

178. Tabakman, R. Interactions between the cells of the immune and nervous system: neurotrophins as neuroprotection mediators in CNS injury / R. Tabakman, S. Lecht, S. Sephanova, H. Arien-Zakay, P. Lazarovici // *Progress in Brain Research*. – 2004. – Vol. 146 – P. 387–401.
179. Tan, S. Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells / S. Tan, M. Wood, P. Maher // *Journal of Neurochemistry*. – 1998. – Vol. 71 – № 1 – P. 95–105.
180. Tao, X. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism / X. Tao, S. Finkbeiner, D.B. Arnold, A.J. Shaywitz, M.E. Greenberg // *Neuron*. – 1998. – Vol. 20 – № 4 – P. 709–726.
181. Tapia-Arancibia, L. Effects of alcohol on brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in discrete regions of the rat hippocampus and hypothalamus / L. Tapia-Arancibia, F. Rage, L. Givalois, P. Dingeon, S. Arancibia, F. Beaugé // *Journal of Neuroscience Research*. – 2001. – Vol. 63 – № 2 – P. 200–208.
182. Terry, M.J. (3Z)- and (3E)-phytochromobilin are intermediates in the biosynthesis of the phytochrome chromophore / M.J. Terry, M.T. McDowell, J.C. Lagarias // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – Vol. 270 – № 19 – P. 11111–11118.
183. *The Biology of heat shock proteins and molecular chaperones: Cold Spring Harbor monograph series, вып. 26 / под ред. R.I. Morimoto, A. Tissières, C. Georgopoulos*. – Plainview, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. – 610 с.
184. Thoenen, H. The synthesis of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal and cortical neurons is regulated by

- specific transmitter systems / H. Thoenen, F. Zafra, B. Hengerer, D. Lindholm // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1991. – Vol. 640 – P. 86–90.
185. Totoson, P. Activation of endothelial TrkB receptors induces relaxation of resistance arteries / P. Totoson, M. Pedard, C. Marie, C. Demougeot // *Vascular Pharmacology*. – 2018. – Vol. 106 – P. 46–53.
186. Travaglia, A. Copper, BDNF and Its N-terminal domain: inorganic features and biological perspectives / A. Travaglia, D. La Mendola, A. Magrì, V.G. Nicoletti, A. Pietropaolo, E. Rizzarelli // *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*. – 2012. – Vol. 18 – № 49 – P. 15618–15631.
187. Vaandrager, A.B. Signalling by cGMP-dependent protein kinases / A.B. Vaandrager, H.R. de Jonge // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 1996. – Vol. 157 – № 1–2 – P. 23–30.
188. Villoslada, P. Role of nerve growth factor and other trophic factors in brain inflammation / P. Villoslada, C.P. Genain // *Progress in Brain Research*. – 2004. – Vol. 146 – P. 403–414.
189. Wang, B. 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule tropomyosin-related kinase B (TrkB) agonist, attenuates cerebral ischemia and reperfusion injury in rats / B. Wang, N. Wu, F. Liang, S. Zhang, W. Ni, Y. Cao, D. Xia, H. Xi // *Journal of Molecular Histology*. – 2014. – Vol. 45 – № 2 – P. 129–140.
190. Wehrman, T. Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors / T. Wehrman, X. He, B. Raab, A. Dukipatti, H. Blau, K.C. Garcia // *Neuron*. – 2007. – Vol. 53 – № 1 – P. 25–38.

191. Welch, W.J. Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress / W.J. Welch, J.P. Suhan // *The Journal of Cell Biology*. – 1986. – Vol. 103 – № 5 – P. 2035–2052.
192. Wellmer, A. A double-blind placebo-controlled clinical trial of recombinant human brain-derived neurotrophic factor (rhBDNF) in diabetic polyneuropathy / A. Wellmer, V.P. Misra, M.K. Sharief, P.G. Kopelman, P. Anand // *Journal of the peripheral nervous system: JPNS*. – 2001. – Vol. 6 – № 4 – P. 204–210.
193. Wilks, A. Heme oxygenase (HO-1). Evidence for electrophilic oxygen addition to the porphyrin ring in the formation of alpha-meso-hydroxyheme / A. Wilks, J. Torpey, P.R. Ortiz de Montellano // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1994. – Vol. 269 – № 47 – P. 29553–29556.
194. Williams, G. Overcoming the inhibitors of myelin with a novel neurotrophin strategy / G. Williams, E.-J. Williams, P. Maison, M.N. Pangalos, F.S. Walsh, P. Doherty // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280 – № 7 – P. 5862–5869.
195. Willis, D. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response / D. Willis, A.R. Moore, R. Frederick, D.A. Willoughby // *Nature Medicine*. – 1996. – Vol. 2 – № 1 – P. 87–90.
196. Wirth, M.J. Accelerated dendritic development of rat cortical pyramidal cells and interneurons after biolistic transfection with BDNF and NT4/5 / M.J. Wirth, A. Brun, J. Grabert, S. Patz, P. Wahle // *Development (Cambridge, England)*. – 2003. – Vol. 130 – № 23 – P. 5827–5838.
197. Woo, J. Stress protein-induced immunosuppression: inhibition of cellular immune effector functions following overexpression of haem oxygenase (HSP 32) / J. Woo, S. Iyer, M.C. Cornejo, N. Mori, L. Gao, I. Sipos, M. Maines, R. Buelow // *Transplant Immunology*. – 1998. – Vol. 6 – № 2 – P. 84–93.

198. Wu, P. Taurine inhibits neuron apoptosis in hippocampus of diabetic rats and high glucose exposed HT-22 cells via the NGF-Akt/Bad pathway / P. Wu, X. Shi, M. Luo, null Inam-U-Llah, K. Li, M. Zhang, J. Ma, Y. Li, Y. Liu, C. Zhang, X. Liu, S. Li, Q. Li, X. Chen, X. Che, F. Piao // *Amino Acids*. – 2020. – Vol. 52 – № 1 – P. 87–102.
199. Xie, H. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease / H. Xie, L. Hu, G. Li // *Chinese Medical Journal*. – 2010. – Vol. 123 – № 8 – P. 1086–1092.
200. Xu, R. Effects of synthetic neural adhesion molecule mimetic peptides and related proteins on the cardiomyogenic differentiation of mouse embryonic stem cells / R. Xu, S.P. Srinivasan, P. Sureshkumar, E.N. Nembo, C. Schäfer, J. Semmler, M. Matzkies, M. Albrechtsen, J. Hescheler, F. Nguemo // *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. – 2015. – Vol. 35 – № 6 – P. 2437–2450.
201. Yamada, N. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema / N. Yamada, M. Yamaya, S. Okinaga, K. Nakayama, K. Sekizawa, S. Shibahara, H. Sasaki // *American Journal of Human Genetics*. – 2000. – Vol. 66 – № 1 – P. 187–195.
202. Yamada, K. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory / K. Yamada, M. Mizuno, T. Nabeshima // *Life Sciences*. – 2002. – Vol. 70 – № 7 – P. 735–744.
203. Yang, Y.-J. Small-molecule TrkB agonist 7,8-dihydroxyflavone reverses cognitive and synaptic plasticity deficits in a rat model of schizophrenia / Y.-J. Yang, Y.-K. Li, W. Wang, J.-G. Wan, B. Yu, M.-Z. Wang, B. Hu // *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. – 2014. – Vol. 122 – P. 30–36.

204. Zafra, F. Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors / F. Zafra, B. Hengerer, J. Leibrock, H. Thoenen, D. Lindholm // *The EMBO journal*. – 1990. – Vol. 9 – № 11 – P. 3545–3550.
205. Zafra, F. Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons / F. Zafra, E. Castrén, H. Thoenen, D. Lindholm // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1991. – Vol. 88 – № 22 – P. 10037–10041.
206. Zebrack, J.S. The role of inflammation and infection in the pathogenesis and evolution of coronary artery disease / J.S. Zebrack, J.L. Anderson // *Current Cardiology Reports*. – 2002. – Vol. 4 – № 4 – P. 278–288.
207. Zhang, J.Y. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents / J.Y. Zhang, X.G. Luo, C.J. Xian, Z.H. Liu, X.F. Zhou // *The European Journal of Neuroscience*. – 2000. – Vol. 12 – № 12 – P. 4171–4180.
208. Zhang, Y. Neuroprotection in transient focal brain ischemia after delayed intravenous administration of brain-derived neurotrophic factor conjugated to a blood-brain barrier drug targeting system / Y. Zhang, W.M. Pardridge // *Stroke*. – 2001. – Vol. 32 – № 6 – P. 1378–1384.
209. Zhang, H.-T. Immunohistochemical distribution of NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in adult rhesus monkey brains / H.-T. Zhang, L.-Y. Li, X.-L. Zou, X.-B. Song, Y.-L. Hu, Z.-T. Feng, T.T.-H. Wang // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*. – 2007. – Vol. 55 – № 1 – P. 1–19.

210. Zhang, Z. 7,8-dihydroxyflavone prevents synaptic loss and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease / Z. Zhang, X. Liu, J.P. Schroeder, C.-B. Chan, M. Song, S.P. Yu, D. Weinschenker, K. Ye // *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. – 2014. – Vol. 39 – № 3 – P. 638–650.
211. Zhang, M.-W. 7,8-Dihydroxyflavone reverses the depressive symptoms in mouse chronic mild stress / M.-W. Zhang, S.-F. Zhang, Z.-H. Li, F. Han // *Neuroscience Letters*. – 2016. – Vol. 635 – P. 33–38.
212. Zhou, A.W. Facilitation of AVP(4-8) on gene expression of BDNF and NGF in rat brain / A.W. Zhou, W.X. Li, J. Guo, Y.C. Du // *Peptides*. – 1997. – Vol. 18 – № 8 – P. 1179–1187.
213. Zhu, H.-Y. The Roles of Nitric Oxide Synthase/Nitric Oxide Pathway in the Pathology of Vascular Dementia and Related Therapeutic Approaches / H.-Y. Zhu, F.-F. Hong, S.-L. Yang // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22 – № 9 – P. 4540.