

На правах рукописи



Никифоров Дмитрий Михайлович

**ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ОРИГИНАЛЬНЫХ
ДИПЕПТИДНЫХ МИМЕТИКОВ НЕЙРОТРОФИНА-3**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»

Научный руководитель:

Поварнина Полина Юрьевна – кандидат биологических наук, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологии психических заболеваний

Официальные оппоненты:

Яснецов Виктор Владимирович – доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, заведующий лабораторией экспериментальной и клинической фармакологии, ведущий научный сотрудник, заместитель заведующего отделом космической радиобиологии и фармакологии

Хлебникова Надежда Николаевна – доктор биологических наук, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», ведущий научный сотрудник лаборатории общей патологии нервной системы

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «8» сентября 2026 года в 15.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.183.02 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» Министерства образования и науки Российской Федерации (125315, Москва, Балтийская ул. д.8).

E-mail:

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 125315, Москва, Балтийская ул. д.8, ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» по адресу: 125315, Москва, Балтийская ул. д.8 и на сайте www.academpharm.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.183.02

кандидат биологических наук



Васильева Екатерина Валерьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Накоплено большое количество данных о связи дефицита белков семейства нейротрофинов, к которым у позвоночных относится фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF), мозговой нейротрофический фактор (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), нейротрофин-3 (NT-3) и нейротрофин-4 (NT-4), и/или нарушения их работы с патогенезом различных неврологических и психических заболеваний. Эти данные, а также данные о физиологических функциях нейротрофинов (нейропротекция, нейрорегенерация, поддержание нейропластичности) способствовали росту интереса исследователей по всему миру к разработке терапевтических стратегий на основе этих белков.

Хотя функции нейротрофинов во многом пересекаются, каждый из них обладает уникальными свойствами, определяющими специфическую область его возможного применения. Эта уникальность обусловлена взаимодействием нейротрофинов с разными типами Trk рецепторов (TrkA, TrkB, TrkC), разной представленностью Trk рецепторов в тканях, а также разными эффектами нейротрофинов при взаимодействии с одним и тем же типом Trk рецепторов.

NT-3, в отличие от других нейротрофинов, взаимодействующих только с одним типом Trk рецепторов, активирует все эти рецепторы, связываясь с наибольшим сродством с TrkC (Bothwell M. // *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2014. Vol. 220. P. 3–15). NT-3 и TrkC рецепторы широко распространены во взрослом мозге позвоночных (Zhang H.-T., Li L.-Y. // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2007. Vol. 55. Issue 1. P. 1–19). TrkC является преобладающим типом Trk рецепторов в голубом пятне – одном из ядер ствола мозга – норадренергическом центре, который играет важную роль в физиологическом ответе на стрессовые стимулы и вовлечен в патофизиологию аффективных и тревожных расстройств, что определяет специфику участия NT-3 в регуляции эмоционального состояния (Smith M. A., Makino S. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995. Vol. 92, Issue 19. P. 8788–8792). Связь NT-3 с формированием эмоционального состояния обусловлена также тем, что сам нейротрофин и его TrkC рецепторы широко экспрессируются в структурах лимбической системы – префронтальной коре, гиппокампе и миндалинном теле, где вовлечены в регуляцию синаптической пластичности (Altar C.A., Criden M.R. // *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 1993. Vol. 13, Issue 2. P. 733–743). Также известно, что NT-3 играет важную роль в поддержании гиппокампальной нейропластичности и формировании памяти за счет регуляции синаптической пластичности, нейрогенеза и синаптогенеза (Shimazu K., Zhao M. // *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*. 2006. Vol. 13, Issue 3. P. 307–315). В экспериментах *in vivo* были выявлены нейропротекторные и нейрорегенеративные свойства NT-3 при его центральном введении на моделях церебральной ишемии (Galvin K.A., Oorschot D.E. // *Neuroscience*. 2003. Vol. 118 Issue 4. P. 1023–1032; Zhang J., Shi Q. // *Neuroscience*. 2012. Vol. 222. P. 1–9); повреждения спинного мозга (Cong Y., Wang C. // *Journal of Surgical Research*. 2020. Vol. 247. P. 128–135) и периферических нервов (Wang H., Ni H. // *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 2016. Vol. 46, Issue 6. P. 578–585); моделях болезни Альцгеймера и Паркинсона (Gu S., Huang H. // *Brain*

Research. 2009. Vol. 1257. P. 1–9; Yan Z., Shi X. // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2021. Vol. 15. P. 629356); антидепрессантоподобная активность (Shirayama Y., Chen A.C.-H. // *Journal of Neuroscience*. 2002. Vol. 22, Issue 8. P. 3251–3261); анксиолитическая активность (D'Amico D., Gener T. // *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2017. Vol. 42, Issue 2. P. 462–472; Miranda A.S.de., Barros J.L.V.M.de. // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2020. Vol. 24, Issue 12. P. 1225–1238); мнемотропная активность (Liu D.B., Zhang J. // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2019. Vol. 23, Issue 5. P. 2182–2187). В клинических исследованиях установлена вовлеченность NT-3 в патогенез депрессии, тревожных расстройств, шизофрении (Durany N., Michel T. // *Schizophrenia Research*. 2001. Vol. 52, Issues 1–2. P. 79–86; Muiños-Gimeno M., Guidi M. // *Human Mutation*. 2009. Vol. 30, Issue 7. P. 1062–1071; Ogłodek E. A., Just M.J. // *Pharmacological Reports: PR*. 2016. Vol. 68, Issue 5. P. 945–951).

Степень разработанности проблемы. NT-3 перспективен в качестве основы для создания лекарственных средств с патогенетически-обоснованным механизмом действия для лечения социально значимых заболеваний. Полноразмерный NT-3 сам по себе, как и другие нейротрофины, непригоден для клинического применения из-за низкой биодоступности и широкого спектра физиологических функций, что обуславливает риск развития нежелательных эффектов, таких как гипералгезия (Malcangio M., Lessmann V. // *The Journal of Neuroscience*. 1997. Vol. 17, Issue 21. P. 8459–8467). Преодолеть эти ограничения возможно созданием низкомолекулярных системно активных миметиков NT-3, реализующих терапевтические эффекты полноразмерного нейротрофина и лишенных его побочных эффектов. В настоящее время низкомолекулярные миметики NT-3 разрабатываются рядом исследовательских групп за рубежом (Chen D., Brahimi F. // *ACS Chemical Biology*. 2009. Vol. 4, Issue 9. P. 769–781; Zaccaro M.C., Lee H.B. // *Chemistry and Biology*. 2005. Vol. 12, Issue 9. P. 1015–1028). В отличие от миметиков NGF и BDNF, которым посвящено большое количество работ начиная с 1990-х годов, сейчас существует лишь небольшое число публикаций, в которых описываются миметики NT-3 (Pattarawarapan M., Zaccaro M.C. // *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002. Vol. 45, Issue 20. P. 4387–4390).

В отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» член-корреспондентом РАН Т.А. Гудашевой была разработана оригинальная стратегия создания дипептидных миметиков нейротрофинов (Гудашева Т.А., Антипова Т.А. // *Доклады Академии наук*. 2010. Т. 434, Выпуск 4. С. 549–552; Gudasheva T.A., Povarnina P.Y. // *Medicinal Research Reviews*. 2021. Vol. 41, Issue 5. P. 2746–2774), основанная на гипотезе (Гудашева Т.А., Тарасюк А.В. // *Биоорганическая химия*. 2012. Том. 38. С. 280), что основными фармакофорами – структурными элементами молекулы, отвечающими за её способность взаимодействовать с рецепторами и, как следствие, обеспечивающими её биологическую активность при взаимодействии с Trk рецепторами – являются наиболее экспонированные дипептидные фрагменты β -изгибов шпилькообразных петель нейротрофинов. С помощью этой стратегии ранее были получены фармакологически пригодные дипептидные миметики NGF и BDNF, для наиболее

перспективных из которых был завершён полный цикл доклинических исследований в качестве средства лечения ишемического инсульта и потенциального антидепрессанта (Gudasheva T.A., Povarnina P.Y. // *Medicinal Research Reviews*. 2021. Vol. 41, Issue 5. P. 2746–2774).

С использованием данной стратегии были получены дипептидные миметики 4-й петли NT-3 соединения ГТС-301 (гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-аспарагинил-L-аспарагина)), ГТС-302 (гексаметилендиамид бис-(N-γ-оксибутирил-L-глутамил-L-аспарагина)) и ГТС-305 (гексаметилендиамид бис-(N-моносукциниламид-L-аспарагинил-L-лизина) (Патент РФ № 2800369 С1, дата приоритета от 05.04.2022 г.). Также были получены дипептидные миметики 2-й и 3-й петель NT-3 соединения ГТС-321 (гексаметилендиамид бис-(N-оксибутирил-глицил-L-аспарагина) и ГТС-303 (гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-лизил-L-гистидина) соответственно.

Дипептидные миметики отдельных петель NT-3 стали объектом исследования в настоящей работе.

Цель исследования. Целью исследования является анализ *in vivo* спектра фармакологической активности оригинальных дипептидных миметиков нейротрофина-3 (NT-3) и отбор из них соединения-лидера.

Задачи исследования.

1. Провести скрининг по антидепрессантоподобной активности дипептидных миметиков отдельных петель NT-3 при их остром и субхроническом внутривнутрибрюшинном (в/б) введении в тесте вынужденного плавания на мышах.
2. Проанализировать зависимость антидепрессантоподобного эффекта от дозы у соединения-лидера при его в/б введении в тесте вынужденного плавания на мышах.
3. Провести изучение антидепрессантоподобной активности соединения-лидера при его пероральном введении в тесте вынужденного плавания на мышах.
4. Подтвердить антидепрессантоподобную активность соединения-лидера на модели депрессивно-подобного состояния, вызванного социальным стрессом, на мышах.
5. Выявить возможные мнемотропные эффекты дипептидных миметиков NT-3 при их остром в/б введении в тесте распознавания нового объекта на крысах.
6. Выявить возможную анксиолитическую активность дипептидных миметиков NT-3 при их остром в/б введении в тесте приподнятого крестообразного лабиринта на мышах.
7. Выявить возможную нейропротекторную активность дипептидных миметиков NT-3 на модели ишемического инсульта, индуцированного окклюзией средней мозговой артерии у крыс.

Научная новизна. Впервые было установлено, что дипептидные миметики NT-3 при системном введении проявляют в экспериментах *in vivo* антидепрессантоподобную, анксиолитическую и мнемотропную активности. Антидепрессантоподобная активность наиболее перспективного соединения дипептида ГТС-302 была подтверждена на модели хронического социального стресса на мышах. У ГТС-302 была также выявлена нейропротекторная активность на модели ишемического инсульта на крысах.

Теоретическая и практическая значимость. Фундаментальное значение работы заключается в том, что с помощью дипептидных миметиков отдельных петель NT-3 как молекулярных инструментов было показано, что именно 4-я петля нейротрофина является основной для реализации фармакологической активности.

Практическая значимость работы состоит в том, что системно активные дипептидные миметики NT-3 могут стать основой для разработки лекарственных средств с новым механизмом действия для лечения социально значимых психических и неврологических заболеваний, в патогенез которых вовлечен полноразмерный нейротрофин.

Методология и методы исследования. Методологический подход включал в себя скрининг дипептидных миметиков NT-3 по антидепрессантоподобной активности в тесте вынужденного плавания на мышах; расширенное изучение этой активности (зависимость эффекта от дозы, стереоспецифичность) у отобранных соединений; подтверждение антидепрессантоподобной активности наиболее перспективного соединения на модели хронического социального стресса на мышах; изучение анксиолитической и мнемотропной активности отобранных на предыдущих этапах соединений соответственно в тесте приподнятого крестообразного лабиринта на мышах и тесте распознавания нового объекта на крысах; выявление нейропротекторной активности соединения-лидера на модели ишемического инсульта на крысах. Фармакологическая активность соединения-лидера определялась как с помощью поведенческих эффектов, так и с помощью биохимических и морфометрических методов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Антидепрессантоподобная активность дипептидных миметиков отдельных петель NT-3 в тесте вынужденного плавания на мышах при в/б введении.
2. Зависимость выраженности антидепрессантоподобного эффекта миметика 4-й петли NT-3 соединения-лидера ГТС-302 от дозы в тесте вынужденного плавания на мышах.
3. Антидепрессантоподобная активность соединения ГТС-302 в тесте вынужденного плавания на мышах при пероральном введении.
4. Антидепрессантоподобная активность соединения ГТС-302 на модели депрессивно-подобного состояния на мышах, индуцированного 10-дневным социальным стрессом.
5. Мнемотропная активность дипептидных миметиков 4-й петли NT-3 соединений ГТС-301 и ГТС-302 в тесте распознавания нового объекта на крысах.
6. Анксиолитическая активность соединения ГТС-302 в тесте приподнятого крестообразного лабиринта на мышах.
7. Нейропротекторная активность соединения ГТС-302 на модели ишемического инсульта у крыс, индуцированного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии.

Степень достоверности. Достоверность полученных результатов подтверждается применением валидированных, широко применяемых фармакологических, биохимических и морфометрических методов, достаточным объемом экспериментальных выборок, применением адекватных статистических методов.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на VI Съезде фармакологов России (Московская область, 2023 г.) и XI Российском симпозиуме «Белки и пептиды», (Московская область, 2024 г.).

Личный вклад автора. Автором лично проведен анализ литературы по теме диссертации, выполнены исследования по выявлению антидепрессантоподобной, анксиолитической, мнемотропной активности миметиков NT-3. При активном участии автора проводились исследования по подтверждению антидепрессантоподобной активности и выявлению нейропротекторной активности соединения-лидера на моделях хронического социального стресса и окклюзии средней мозговой артерии соответственно. Автором лично проведена статистическая обработка данных, интерпретированы полученные результаты, сформулированы выводы. При активном участии автора подготовлены публикации по результатам работы.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них 7 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России, 3 тезисов в материалах научных съездов и конференций и 1 патент Российской Федерации.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 132 страницах печатного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 8 отечественных и 199 зарубежных источников. Работа содержит 8 таблиц и 14 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Препараты и вещества. Оригинальные димерные дипептидные миметики отдельных петель NT-3: гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-аспарагинил-L-аспарагина) (ГТС-301), гексаметилендиамид бис-(N-γ-оксибутирил-L-глутамил-L-аспарагина) (ГТС-302), гексаметилендиамид бис-(N-моносукциниламид-L-аспарагинил-L-лизина) (ГТС-305), гексаметилендиамид бис-(N-гидроксибутирил-глицил-L-аспарагина) (ГТС-321) и гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-лизил-L-гистидина) (ГТС-303) были синтезированы в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий». Миметики растворяли в дистиллированной воде или суспензировали в 1%-ном растворе Tween-80. Дозы миметиков NT-3 для *in vivo* исследований были выбраны исходя из концентраций, в которых они проявляли нейропротекторную активность *in vitro*, на основании соответствия активных доз *in vitro* и *in vivo*, ранее установленного для дипептидных миметиков NGF и BDNF (Gudasheva T.A., Povarnina P.Y. // *Medicinal Research Reviews*. 2021. Vol. 41, Issue 5. P. 2746–2774).

В качестве препаратов сравнения использовался amitriptilin (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия) и пирacetam (Олайнфарм, Латвия). Также использовались Tween-80 (neoFroxx GmbH, Германия), хлоралгидрат (Macklin, Китай), 2,3,5-хлорид трифенилтетразолия (Merck KGaA, Германия), формалин (AppliChem GmbH, Германия). Для Вестерн-блот анализа использовались первичные антитела к синаптофизину (BD Bioscience,

США), PSD-95, BDNF (ThermoFisher, США) и β -актину (Abcam, Великобритания) и вторичные антитела против IgG кролика или мыши (ThermoFisher, США).

Экспериментальные животные. Эксперименты проведены на 192 крысах-самцах линии Wistar, полученных из филиала «Андреевка» Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства", 942 мышах-самцах линии BALB/c и 90 мышах-самцах линии C57Bl/6, полученных из филиала «Столбовая» или из филиала «Андреевка» Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства". Животных содержали при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному корму и воде. Эксперименты с животными проводили в соответствии с «Руководством по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований» (ПРИЛОЖЕНИЕ к Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 года № 33). Проведение экспериментов было одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «ФИЦ биомедицинских и фармацевтических технологий».

Методы исследования. Скрининг миметиков NT-3 по антидепрессантоподобной активности проводили в тесте вынужденного плавания на мышах BALB/c (*Porsolt R.D., Le Pichon M. // Nature. 1977. Vol. 266, Issue 5604. P. 730–732*) в модификации с двумя сессиями плавания (*Angoa-Pérez M., Kane M.J. // ACS Chemical Neuroscience. 2014. Vol. 5, Issue 10. P. 908–919*). Миметики вводили в/б или перорально однократно (за 24 ч до тестовой посадки) или субхронически (7 дней, последнее введение было за 24 ч до тестовой посадки).

Для исключения стимулирующей активности миметиков NT-3 проводили тест двигательной активности на мышах BALB/c с помощью инфракрасного актиметра (Panlab, Испания) согласно инструкции к прибору и программы ActiTrack. Миметики вводили в/б в наиболее активных дозах по результатам теста вынужденного плавания за 24 ч до изучения их влияния на двигательную активность.

Антидепрессантоподобную активность дипептида ГТС-302 подтверждали на модели деперссивно-подобного состояния, индуцированного 10-дневным социальным стрессом на мышах (*Kudryavtseva N., Avgustinovich F. // Current Drug Metabolism. 2008. Vol. 9, Issue 4. P. 352–360*). В качестве как агрессоров, так и жертв, использовали мышей-самцов линии C57BL/6. Дипептид ГТС-302 вводили мышам ежедневно в/б в течение 10 дней стрессирования. На следующий день после окончания стрессирования агедонию оценивали в тесте предпочтения 1%-го раствора сахарозы. (*Scheggi S., De Montis M.G. // International Journal of Neuropsychopharmacology. 2018. Vol. 21, Issue 11. P. 1049–1065*). После окончания поведенческого тестирования для оценки гиппокампальной нейропластичности определяли с помощью Вестерн-блот анализа (*Mahmood T., Saeed F.-A. North American Journal of Medical Sciences // 2012. Vol. 4, Issue 9. P. 429–434*) иммунореактивность к синаптическим белкам синаптофизину и PSD-95, а также к маркерам нейропластичности CREB и BDNF.

Для выявления возможной анксиолитической активности миметиков использовали тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) на мышах BALB/c (*Pellow S., Chopin P. // Journal of Neuroscience Methods. 1985. Vol. 14, Issue 3. P. 149–167*). Дипептиды вводили однократно в/б за 30 мин до теста.

Мнемотропную активность миметиков изучали в тесте распознавания нового объекта на крысах Wistar (*Ennaceur A., Delacour J. // Behavioural Brain Research. 1988. Vol. 31, Issue 1. P. 47–59*). Миметики вводили в/б за 24 ч до ознакомления крыс с объектами.

Нейропротекторную активность дипептидов ГТС-301 и ГТС-302 изучали на модели ишемического инсульта, индуцированного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА) на крысах Wistar (*Longa E.Z., Weinstein P.R. // Stroke. 1989. Vol 20, Issue 1. P. 84–91*). Во внутреннюю сонную артерию крыс вводили нейлоновый филамент, покрытый силиконом, до перекрытия средней мозговой артерии. Перекрытие кровотока осуществляли в течение 60 мин, после чего нить извлекали из сосуда, восстанавливая кровоснабжение в бассейне средней мозговой артерии. Дипептиды ГТС-301 и ГТС-302 вводили в/б через 4 ч после операции и в течение последующих 6 суток. На 3-и и 6-е сутки после операции неврологический статус определяли с помощью теста стимуляции конечностей (*Jolkkonen J., Puurunen K. // European Journal of Pharmacology. 2000. Vol. 400, Issue 2–3. P. 211–219*), на 7-е сутки животных декапетировали, головной мозг извлекали и определяли объем инфаркта мозга с помощью морфометрии срезов, окрашенных 2,3,5-хлоридом трифенилтетразолия (*Bederson J.B., Pitts L.H. // Stroke. 1986. Vol. 17, Issue 6. P. 1304–1308*). Объем инфаркта мозга определяли относительно неповрежденного полушария с поправками на возможный отек или атрофию ткани в ишемизированном полушарии по следующей формуле:

$V = [(V_{in} \times (V_c / V_i)) / V_c] * 100\%$, где V_{in} – объем инфаркта мозга, V_i – объем ипсилатерального полушария, V_c – объем контрлатерального полушария.

Статистический анализ данных. Статистический анализ данных проводили с помощью компьютерной программы GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Для проверки нормальности распределения использовали W-критерий Шапиро-Уилка. Для сравнения двух групп использовали U тест Манна-Уитни. Этот же тест использовали для анализа данных Вестерн-блот анализа независимо от количества групп в связи с маленькими выборками. При наличии одной переменной для сравнения трех и более групп в случае нормального распределения использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующими множественными сравнениями с помощью теста Даннета, в случае отсутствия нормальности распределения применяли критерий Краскела-Уоллиса с последующим тестом Данна или U тест Манна-Уитни с поправкой Бенджамина-Хохберга. При наличии двух переменных для сравнения трех и более групп использовали двухфакторный дисперсионный анализ с последующими множественными сравнениями с помощью теста Тьюки. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Скрининг по антидепрессантоподобной активности дипептидных миметиков отдельных петель NT-3 при их остром и субхроническом в/б введении

При остром введении миметиков антидепрессантоподобную активность проявлял только миметик 4-й петли NT-3 ГТС-302, который во всех изученных дозах (1, 5 и 10 мг/кг) статистически значимо снижал время иммобильности мышей соответственно на 19, 17 и 22% по сравнению с контролем (Табл. 1). Амитриптилин в дозе 10 мг/кг снижал время иммобильности на 41%. Миметики 4-й петли ГТС-301 и ГТС-305, а также миметики 2-й и 3-й петель, дипептиды ГТС-321 и ГТС-303 соответственно, оказались неактивными.

Таблица 1 – Скрининг по антидепрессантоподобной активности дипептидных миметиков отдельных петель NT-3 при их остром в/б введении в тесте вынужденного плавания на мышах

Группа	Число мышей в группах	Время иммобильности, с	Время иммобильности, % ₁	Активность, % ²
Миметик 4-й петли ГТС-301				
<i>Эксперимент 1</i>				
Контроль	10	197,8±8,4	100	0
ГТС-301 (1 мг/кг)	10	208,3±8,7	105	-5
ГТС-301 (5 мг/кг)	9	174,2±8,8	88	12
ГТС-301 (10 мг/кг)	8	235,3±8,1	118	-18
<i>Эксперимент 2</i>				
Контроль	10	224,5±11,8	100	0
ГТС-301 (0,1 мг/кг)	10	234,3±9,0	104	-4
ГТС-301 (0,5 мг/кг)	10	241,4±12,0	107	-7
<i>Эксперимент 3</i>				
Контроль	11	208,8±5,6	100	0
ГТС-301 (20 мг/кг)	10	186,4±13,5	89	11
Миметик 4-й петли ГТС-302				
<i>Эксперимент 1</i>				
Контроль	11	226,7±7,5	100	0
ГТС-302 (1 мг/кг)	8	183,6±6,8**	81**	19
ГТС-302 (5 мг/кг)	10	188,9±10,2*	83*	17
ГТС-302 (10 мг/кг)	10	177,8±10,3**	78**	22
<i>Эксперимент 2</i>				
Контроль	11	164,2±7,5	100	0
ГТС-302 (0,1 мг/кг)	10	143,5±15,2	87	13
ГТС-302 (0,5 мг/кг)	10	113,5±11,2*	70*	30
ГТС-302 (20 мг/кг)	10	125,2±12,6	76	24
ГТС-302 (50 мг/кг)	10	132,1±14,0	81	19
Миметик 4-й петли ГТС-305				
Контроль	10	189,2±11,6	100	0
ГТС-305 (1 мг/кг)	10	186,9±8,6	99	1
ГТС-305 (5 мг/кг)	10	171,5±6,5	91	9
ГТС-305 (10 мг/кг)	10	172,3±4,5	91	9

Миметик 3-й петли ГТС-303				
Контроль	10	184,7±9,0	100	0
ГТС-303 (1 мг/кг)	10	190,8±10,4	103	-3
ГТС-303 (5 мг/кг)	10	181,2±8,4	98	2
ГТС-303 (10 мг/кг)	10	187,3±14,2	101	-1
Миметик 2-й петли ГТС-321				
Контроль	10	215,7±7,1	100	0
ГТС-321 (1 мг/кг)	10	179,1±12,0	83	17
ГТС-321 (5 мг/кг)	10	197,2±15,0	91	9
ГТС-321 (10 мг/кг)	10	203,5±15,3	94	6
Препарат сравнения				
Амитриптилин (10 мг/кг)	9	133,0±12,5****	59****	41
Примечание: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. ¹ Время иммобильности в процентах относительно контрольной группы рассчитывалось по формуле: $T_{им, \%} = T_{экс} / T_{к} * 100\%$, где $T_{к}$ – время иммобильности в контроле, $T_{экс}$ – время иммобильности в группах мышей, получавших исследуемые соединения или амитриптилин. ² Активность рассчитывалась по формуле: $A\% = T_{к} - T_{экс} / T_{к} * 100\%$, где $T_{к}$ – время иммобильности в контроле, $T_{экс}$ – время иммобильности в группах мышей, получавших исследуемые соединения или амитриптилин. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,0001$ по сравнению с контрольной группой (однофакторный ANOVA, тест Даннета).				

В связи с тем, что ранее для дипептидных миметиков NGF и BDNF было показано, что наиболее выраженной фармакологической активностью обладают миметики наиболее экспонированной 4-й петли (*Gudasheva T.A., Povarnina P.Y. // Medicinal Research Reviews. 2021. Vol. 41, Issue 5. P. 2746–2774*), и что в настоящей работе в изученных условиях также активность была выявлена только у миметика 4-й петли NT-3, миметики 2-й и 3-й петель NT-3 далее не изучались.

При субхроническом (7-дневном) в/б введении в ряду дипептидных миметиков 4-й петли NT-3 активность проявляли соединения ГТС-301 и ГТС-302 (Табл. 2). Дипептид ГТС-302 так же как и при однократном введении статистически значимо снижал время иммобильности во всех изученных дозах – 1, 5 и 10 мг/кг. При этом этот эффект дипептида был более выраженным, чем при остром введении. Если в первом случае он составлял 17-22%, то во втором – 30-34%.

Дипептид ГТС-301 статистически значимо снижал время иммобильности на 22, 26 и 27% в дозах 10, 20 и 40 мг/кг соответственно, в более низких дозах соединение было неактивным.

Стимулирующее влияние ГТС-301 и ГТС-302 на двигательную активность мышей было исключено по результатам теста в инфракрасном актиметре, что позволяет считать заключение об их антидепрессантоподобной активности корректным.

Дипептид ГТС-305 так же как и при остром введении не проявлял антидепрессантоподобной активности.

Таблица 2 – Скрининг по антидепрессантоподобной активности дипептидных миметиков 4-й петли NT-3 при их 7-дневном в/б введении в тесте вынужденного плавания на мышах

Группа	Число мышей в группах	Время иммобильности, с	Время иммобильности, % ¹	Активность, % ²
ГТС-301				
<i>Эксперимент 1</i>				
Контроль	10	199,9±7,8	100	0
ГТС-301 (0,1 мг/кг)	10	199,8±8,1	100	0
ГТС-301 (0,5 мг/кг)	10	207,5±15,5	103	-3
ГТС-301 (1 мг/кг)	10	179,5±9,8	90	10
ГТС-301 (5 мг/кг)	10	189,5±11,8	95	5
ГТС-301 (10 мг/кг)	10	155,5±9,6*	78*	22
<i>Эксперимент 2</i>				
Контроль	9	213,6±10,9	100	0
ГТС-301 (20 мг/кг)	10	159,3±12,7**	74**	26
ГТС-301 (40 мг/кг)	9	156,4±9,0**	73**	27
ГТС-302				
Контроль	11	184,9±6,8	100	0
ГТС-302 (1 мг/кг)	8	122,8±7,0****	66****	34
ГТС-302 (5 мг/кг)	10	134,8±8,5****	73****	27
ГТС-302 (10 мг/кг)	10	129,2±5,2****	70****	30
ГТС-305				
Контроль	9	161,7±12,1	100	0
ГТС-305 (5 мг/кг)	10	167,4±6,1	103	-3
ГТС-305 (10 мг/кг)	9	174,0±13,0	107	-7
ГТС-305 (20 мг/кг)	10	152,3±7,1	94	6
Препарат сравнения				
Амитриптилин (10 мг/кг)	9	108,5±6,1****	59****	41
Примечание: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.				
¹ Время иммобильности в процентах относительно контрольной группы рассчитывалось по формуле: $T_{им, \%} = T_{эксп} / T_{к} * 100\%$, где $T_{к}$ – время иммобильности в контроле, $T_{эксп}$ – время иммобильности в группах мышей, получавших исследуемые соединения или амитриптилин.				
² Активность рассчитывалась по формуле: $A\% = T_{к} - T_{эксп} / T_{к} * 100\%$, где $T_{к}$ – время иммобильности в контроле, $T_{эксп}$ – время иммобильности в группах мышей, получавших исследуемые соединения или амитриптилин.				
* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,0001$ по сравнению с контрольной группой (однофакторный ANOVA, тест Даннета).				

Таким образом, в ряду дипептидных миметиков отдельных петель NT-3 антидепрессантоподобную активность проявляли миметики 4-й петли ГТС-301 и ГТС-302, из которых последний оказался более активным.

Изучение антидепрессантоподобной активности ГТС-302 при его пероральном введении

При однократном пероральном введении за 24 ч до теста ГТС-302 статистически значимо снижал время иммобильности у мышей во всех изученных дозах – 0,5; 1; 2,5; 5 и 10 мг/кг на 30%, 23%, 28%, 26% и 33% соответственно по сравнению с контрольными

животными (Табл. 3). Эффект ГТС-302 в дозе 0,5 мг/кг был сопоставим по выраженности с эффектом амитриптилина в дозе 10 мг/кг.

Таблица 3 – Изучение антидепрессантоподобной активности дипептида ГТС-302 при его остром пероральном введении в тесте вынужденного плавания на мышах

Группа	Количество мышей в группах	Время иммобильности, с	Время иммобильности, % ₁	Активность, % ²
<i>Эксперимент 1</i>				
Контроль	10	160,8±9,2	100	0
ГТС-302 (0,5 мг/кг)	10	113,0±6,9**	70	30
ГТС-302 (1 мг/кг)	10	123,8±11,1*	77	23
Амитриптилин (10 мг/кг)	10	107,8±7,3***	67	33
<i>Эксперимент 2</i>				
Контроль	10	147,7±5,4	100	0
ГТС-302 (2,5 мг/кг)	10	105,8±9,7**	72	28
ГТС-302 (5 мг/кг)	10	108,6±4,5**	74	26
ГТС-302 (10 мг/кг)	10	113,0±9,7*	77	23
Амитриптилин (10 мг/кг)	10	97,0±8,1***	66	34
Примечание: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. ¹ Время иммобильности в процентах относительно контрольной группы рассчитывалось по формуле: $T_{им, \%} = T_{эксп} / T_k * 100\%$, где T_k – время иммобильности в контроле, $T_{эксп}$ – время иммобильности в группах мышей, получавших исследуемые соединения или амитриптилин. ² Активность рассчитывалась по формуле: $A\% = T_k - T_{эксп} / T_k * 100\%$, где T_k – время иммобильности в контроле, $T_{эксп}$ – время иммобильности в группах мышей, получавших исследуемые соединения или амитриптилин. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой (однофакторный ANOVA, тест Даннета).				

Сохранение дипептидом ГТС-302 антидепрессантоподобной активности при пероральном введении свидетельствует в пользу его устойчивости к действию пептидаз, что важно для потенциального лекарственного препарата.

Подтверждение антидепрессантоподобной активности ГТС-302 на модели депрессивно-подобного состояния, вызванного социальным стрессом, на мышах

Схема эксперимента представлена на рисунке 1.

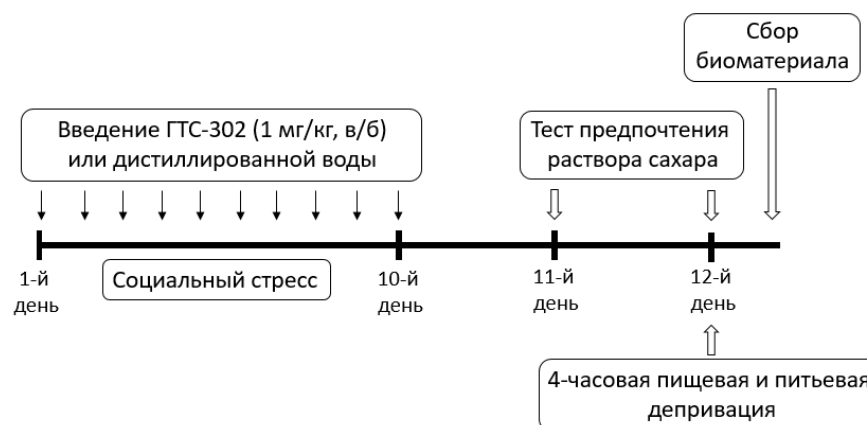
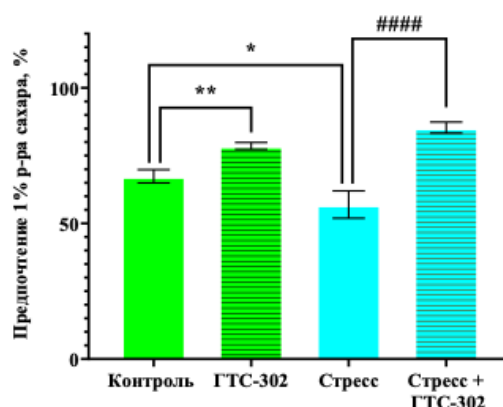


Рисунок 1 – Дизайн исследования антидепрессантоподобной активности ГТС-302 на модели депрессивно-подобного состояния, вызванного социальным стрессом, на мышах

Установлено, что ГТС-302 в условиях экспериментальной модели депрессии на мышах, индуцированной 10-дневным социальным стрессом, при введении на фоне стресса в дозе 1 мг/кг, в/б, полностью противодействует развитию агедонии (один из основных симптомов депрессивно-подобного состояния) в тесте предпочтения раствора сахара (рисунок 2). Интересно отметить, что при этом ГТС-302 статистически значимо увеличивал предпочтение раствора сахарозы и у мышей, не подвергавшихся стрессу, что может быть обусловлено его мнемотропной активностью, поскольку, согласно литературным данным (Verharen J.P.H., de Jong J.W. // *Nature Communications*. 2023. Vol. 14, Issue 1. P. 2419), предпочтение раствора сахара отражает не только способность получать удовольствие, но и память о расположении поилки со сладкой водой.

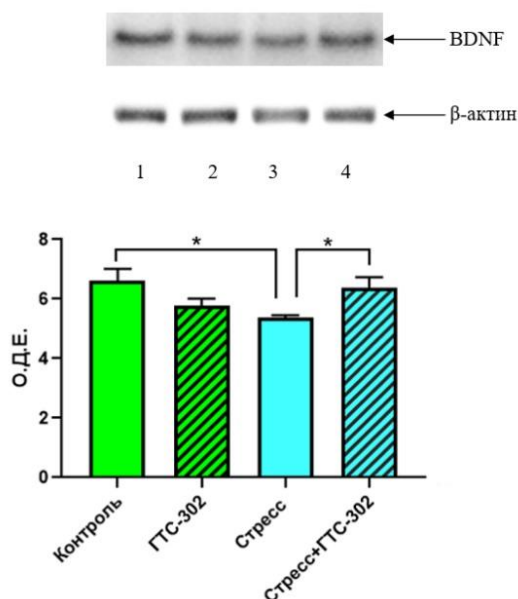


Примечание: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. Предпочтение мышами 1% р-ра сахара рассчитывали по формуле: $\text{Предпочтение, \%} = \frac{M_{\text{потреблённого р-ра сахара}}}{(M_{\text{потреблённого р-ра сахара}} + M_{\text{потреблённой воды}})} \times 100\%$.

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ по сравнению с группой «Контроль», #### - $p < 0,001$ по сравнению с группой «Стресс» (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, тест Тьюки)

Рисунок 2 - Дипептид ГТС-302 полностью противодействует снижению предпочтения раствора сахара у мышей на модели хронического социального стресса

Также ГТС-302 полностью противодействовал вызванному стрессом снижению иммунореактивности к BDNF в гиппокампе мышей, которое рассматривается как релевантный показатель депрессивно-подобного состояния (Castrén E., Monteggia L.M. // *Biological Psychiatry*. 2021. Vol. 90, Issue 2. P. 128–136) (рисунок 3)¹.



Примечание: Дорожки: 1-контроль, 2 – ГТС-302, 3 – стресс, - 4 – Стресс+ГТС-302. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. О.Д.Е. – относительные денситометрические единицы
Рисунок 3 – Содержание синаптофизина в гиппокампе. Данные Вестерн-блот анализа

Не было выявлено влияния стресса или ГТС-302 на иммунореактивность к синаптическим маркерам (синаптофизин, PSD-95) в гиппокампе мышей.

Таким образом, ГТС-302 при хроническом в/б введении полностью противодействовал развитию депрессивно-подобного состояния у мышей, индуцированного хроническим социальным стрессом как по поведенческим, так и по биохимическим показателям.

Выявление возможных мнемотропных эффектов миметиков 4-й петли NT-3

Установлено, что в ряду дипептидных миметиков 4-й петли NT-3 мнемотропной активностью в тесте распознавания нового объекта при остром в/б введении крысам обладают дипептиды ГТС-301 и ГТС-302. ГТС-301 в дозе 1 мг/кг улучшал как кратковременную, так и долговременную память крыс. В этих же условиях препарат сравнения пирацетам в дозе 200 мг/кг улучшал только кратковременную память, при этом эффект ГТС-301 на кратковременную память по выраженности был сопоставим с эффектом пирацетама. В дозах 5 и 10 мг/кг ГТС-301 был неактивен. Дипептид ГТС-302 в дозах 1 и 5 мг/кг статистически значимо улучшал кратковременную память, а в дозе 10 мг/кг – долговременную (таблица 4).

¹ Исследование влияния ГТС-302 на уровень маркера нейропластичности BDNF в гиппокампе мышей, подвергавшихся 10-дневному социальному стрессу, проводили совместно с лабораторией молекулярной фармакологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (руководитель к.б.н. Зайнуллиной Л.Ф.) в группе фармакологии нейропротекции с н.с. И.О. Логвиновым и в.н.с., к.б.н. Т.А. Антиповой

Соединение ГТС-305 вводили в более высоких дозах – 10, 25 и 50 мг/кг, в/б, что обусловлено отсутствием у него активности в дозах до 10 мг/кг, как было установлено при скрининге миметиков по антидепрессантоподобной активности. Во всех изученных дозах соединение было неактивно (таблица 4).

Таблица 4 – Выявление возможной мнемотропной активности миметиков 4-й петли NT-3 при их остром в/б введении в тесте распознавания объекта на крысах

Вещество и доза	Количество крыс в группах	Тест на кратковременную память (через 1 ч после ознакомления с объектами)			Тест на долговременную память (через 24 ч после ознакомления с объектами)		
		Время исследования знакомого объекта, с	Время исследования нового объекта, с	КД1 ¹	Время исследования знакомого объекта, с	Время исследования нового объекта, с	КД2 ¹
ГТС-301							
Контроль	9	16,5±1,7	18,7±3,4	0,01±0,09	15,7±2,7	23,6±5,2	0,14±0,10
ГТС-301, 1 мг/кг	10	9,8±2,3	29,0±6,5	0,41±0,13*	10,7±2,0	35,9±7,3	0,49±0,06*
ГТС-301, 5 мг/кг	10	14,9±2,8	20,2±3,7	0,14±0,10	12,1±1,8	24,4±3,3	0,33±0,07
ГТС-301, 10 мг/кг	9	13,3±1,7	22,7±5,2	0,17±0,12	16,9±2,8	22,8±3,1	0,17±0,09
ГТС-302							
Контроль	10	16,3±3,3	36,7±8,3	0,3±0,1	10,6±2,6	26,1±6,1	0,29±0,18
ГТС-302, 1 мг/кг	10	8,4±1,8	42,8±9,7	0,61±0,08*	8,6±1,5	37,8±4,4	0,60±0,09
ГТС-302, 5 мг/кг	10	8,5±1,1	51,6±10,4	0,70±0,06* *	6,1±1,0	34,0±5,7	0,65±0,06
ГТС-302, 10 мг/кг	10	9,2±1,5	36,0±5,0	0,54±0,10	6,7±1,0	45,5±3,5	0,73±0,04##
ГТС-305							
Контроль	10	9,07±2,17	11,0±1,9	0,18±0,08	11,3±2,7	17,5±2,8	0,25±0,07
ГТС-305, 10 мг/кг	10	9,17±1,19	11,9±1,5	0,12±0,07	13,0±2,6	24,8±1,9	0,35±0,09
ГТС-305, 25 мг/кг	10	9,11±2,24	12,5±1,6	0,23±0,12	13,3±1,8	20,2±2,0	0,22±0,05
ГТС-305, 50 мг/кг	10	9,28±2,45	19,6±4,1	0,35±0,11	13,4±2,5	17,4±2,3	0,16±0,04
Препарат сравнения / Положительный контроль							
Пирацетам, 200 мг/кг	9	10,5±2,8	36,0±10,4	0,51±0,08* *	14,4±1,7	32,6±7,4	0,33±0,08
Примечание: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.							
¹ КД – коэффициент дискриминации рассчитывали по формуле: $K = (T_{\text{нов}} - T_{\text{зн}}) / (T_{\text{нов}} + T_{\text{зн}})$, где $T_{\text{нов}}$ – время исследования нового объекта, $T_{\text{зн}}$ – время исследования знакомого объекта, Значения КД>0 означают, что животное помнит знакомый объект.							
* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой (однофакторный ANOVA, тест Даннета); ## - $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой (критерий Краскела-Уоллиса, тест Данна).							

Таким образом, в ряду миметиков 4-й петли NT-3 мнемотропную активность проявляли, как и в случае с антидепрессантоподобной активностью, дипептиды ГТС-301 и ГТС-302, а дипептид ГТС-305 оказался неактивным.

Для дальнейших исследований отобраны соединения ГТС-301 и ГТС-302.

Выявление возможного анксиолитического действия соединений ГТС-301 и ГТС-302

Установлено, что ГТС-302 проявляет анксиолитическую активность в тесте ПКЛ на мышах при остром в/б введении во всех изученных дозах - 1, 5 и 10 мг/кг. Наиболее выраженный эффект ГТС-302 демонстрировал в дозе 1 мг/кг, статистически значимо увеличивая в 7,6 раз время пребывания и в 5,1 раз число заходов мышей в открытые рукава установки по сравнению с контрольной группой (таблица 5). В дозе 5 мг/кг ГТС-302 увеличивал в 4,7 и 3,7 раз соответственно время пребывания в открытых рукавах и число заходов в них. В дозах 0,5 мг/кг и 10 мг/кг ГТС-302 был неактивен. Таким образом, для ГТС-302, как и в случае антидепрессантоподобной активности, установлена зависимость анксиолитического эффекта от дозы.

Дипептид ГТС-301 был неактивен во всех изученных дозах (таблица 5).

Таблица 5 – Выявление возможного анксиолитического действия ГТС-301 и ГТС-302 при их остром в/б введении в тесте ПКЛ на мышах

Группа	Число мышей в группе	Время в открытых рукавах		Выходы в открытые рукава		Количество заходов в закрытые рукава, ед.
		с	% ¹	ед.	% ²	
ГТС-301						
Контроль	10	1,2±1,2	0,7±0,7	0,2±0,2	1,3±1,3	3,5±1,3
ГТС-301, 1 мг/кг	10	0,24±0,24	0,1±0,1	0,3±0,3	7,5±7,5	1,7±0,5
ГТС-301, 5 мг/кг	10	28,8±14,1	27,7±12,6	1,1±0,6	23,3±11,5	2,6±0,7
ГТС-301, 10 мг/кг	10	36,4±21,5	20,5±10,3	0,9±0,4	16,9±8,3	2,8±1,1
ГТС-302						
<i>Эксперимент 1</i>						
Контроль	9	7,5±4,3	4,7±2,7	0,7±0,4	6,0±3,4	9,4±0,8
ГТС-302, (0,5 мг/кг)	10	25,0±7,3	15,7±4,7	2,1±0,4#	19,6±4,1	8,6±0,7
ГТС-302, (1 мг/кг)	10	51,1±9,4***	30,1±5,5**	3,6±0,5***	31,5±4,8***	8,0±1,0
ГТС-302, (5 мг/кг)	10	35,3±9,0*	19,8±5,1	2,6±0,5*	23,2±3,9*	8,2±0,8
ГТС-302, (10 мг/кг)	10	18,6±5,3	11,1±3,3	1,1±0,3	10,5±3,0	9,6±0,8
<i>Эксперимент 2</i>						
Контроль	10	37,9±29,1	14,6±10,1	0,8±0,5	16,8±10,2	3,7±0,7
ГТС-302, 0,1 мг/кг	10	127,0±43,8	46,6±15,9	0,5±0,2	42,5±15,8	3,3±0,6
Примечание: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.						
¹ Время в открытых рукавах представлено в относительных единицах (в %), которые рассчитывали по формуле: $t_{o.p.} \% = t_{o.p.} / (t_{o.p.} + t_{z.p.}) * 100\%$, где $t_{o.p.} \%$ - относительное время в открытых рукавах, %; $t_{o.p.}$ - время в открытых рукавах; $t_{z.p.}$ - время в закрытых рукавах.						

²Число выходов в открытые рукава представлено в относительных единицах (в %), которые рассчитывали по формуле: $n_{o.p.,\%} = n_{o.p.} / (n_{o.p.} + n_{з.p.,c}) * 100\%$, где $\Delta n_{o.p.,\%}$ - относительное число заходов в открытые рукава, %; $n_{o.p.,c}$ - число заходов в открытые рукава; $n_{з.p.,c}$ - число заходов в закрытые рукава. # - $p = 0,06$; * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой (однофакторный ANOVA, тест Даннета).

Таким образом, миметик 4-й петли NT-3 дипептид ГТС-302 проявляет ангиолитическую активность при остром в/б введении, а ГТС-301 оказался неактивным.

Изучение нейропротекторной активности миметиков ГТС-301 и ГТС-302 на модели ишемического инсульта у крыс

Схема эксперимента представлена на рис. 4.

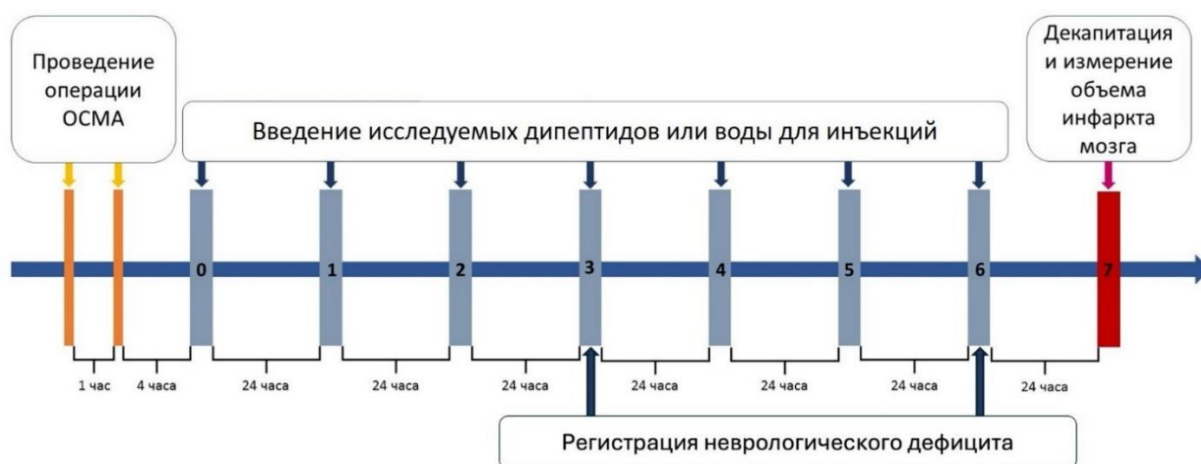
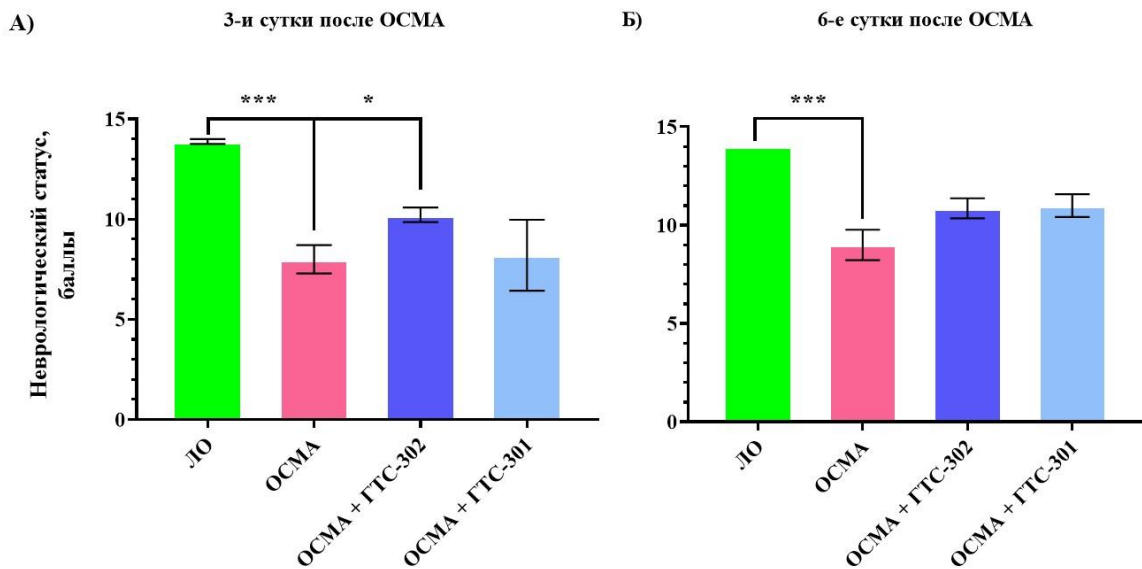


Рисунок 4 – Дизайн исследования нейропротекторной активности миметиков ГТС-301 и ГТС-302 на модели ишемического инсульта, вызванного ОСМА, у крыс

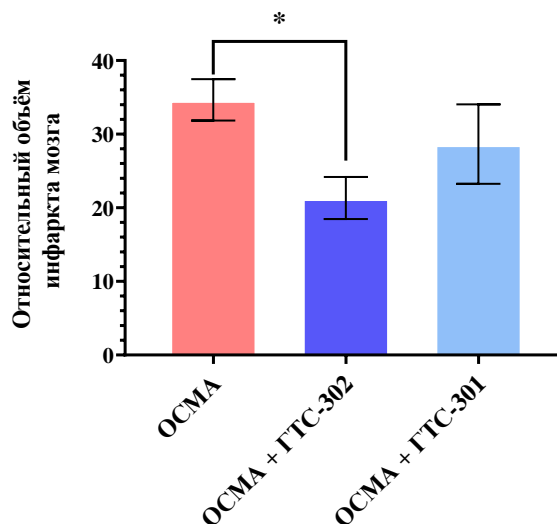
В тесте стимулирования конечностей у ложнооперированных животных (группа «ЛО») не было выявлено неврологического дефицита. У всех групп животных с ОСМА количество баллов для левой (контралатеральной повреждению) стороны тела в данном тесте было статистически значимо снижено по сравнению с группой «ЛО» как на 3-и, так и на 6-е сутки после операции (рисунок 5), что свидетельствует об ухудшении чувствительности и двигательных функций. Дипептид ГТС-302 статистически значимо улучшал неврологический статус на 3-и сутки после операции, а ГТС-301 был неактивен (рисунок 5).



Примечание: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. *** - $p < 0,001$ по сравнению с группой ЛО (тест Манна-Уитни с поправкой Бенджамина-Хохберга) # - $p = 0,026$ по сравнению с группой ОСМА (тест Манна-Уитни с поправкой Бенджамина-Хохберга).

Рисунок 5 – Неврологический статус крыс в тесте стимулирования конечностей. А – 3-й день после ОСМА; Б – на 6-й день после ОСМА.

У животных из группы «ОСМА» в правом полушарии была выявлена выраженная зона инфаркта (Табл. 11, Рис. 15), объем которой составлял $34,7 \pm 2,8\%$ от контрлатерального полушария. Введение ГТС-302 приводило к статистически значимому снижению объема инфаркта мозга на 35% (до $21,3 \pm 2,9\%$ от контрлатерального полушария (рисунок 6)). Дипептид ГТС-301 не оказывал статистически значимого эффекта.



Примечание: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. Относительный объём инфаркта мозга рассчитывали по формуле: $V = [(V_{in} \times (V_c / V_i)) / V_c] \times 100\%$, где V_{in} – объём инфаркта мозга, V_i – объём ипсилатерального полушария, V_c – объём контрлатерального полушария, позволяющей исключить погрешности измерения, связанные с отёком или атрофией ткани в ишемизированном полушарии. # - $p = 0,06$;

* - $p = 0,03$ по сравнению с группой «ОСМА» (однофакторный ANOVA, тест Даннета).

Рисунок 6 – Исследование влияния ГТС-301 и ГТС-302 на объём инфаркта на модели ишемического инсульта, индуцированного окклюзией средней мозговой артерии.

Таким образом, на модели ишемического инсульта из изученных соединений эффективность проявил также дипептид ГТС-302.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявление возможной антидепрессантоподобной активности у дипептидных миметиков 2-й, 3-й и 4-й петель NT-3 в тесте вынужденного плавания на мышах показало, что при остром введении этой активностью обладает только миметик 4-й петли ГТС-302 (1-10 мг/кг, в/б), а при субхроническом – миметики 4-й петли ГТС-301 (20-40 мг/кг, в/б) и ГТС-302 (1-10 мг/кг, в/б). Миметик 4-й петли ГТС-305, а также миметики 2-й и 3-й петель оказались неактивными. Для дальнейших исследований были отобраны миметики 4-й петли NT-3. Для наиболее активного соединения ГТС-302 была выявлена зависимость антидепрессантоподобной активности от дозы. Активность ГТС-302 сохранялась при пероральном введении в дозах 0,5-10 мг/кг.

Для ГТС-301 была выявлена стереоспецифичность антидепрессантоподобного эффекта по N-концевому аспарагину (активными оказались только LL – и LD-стереоизомеры), что свидетельствует о ключевой роли этого аминокислотного остатка во взаимодействии с рецептором.

Антидепрессантоподобная активность ГТС-302 была подтверждена на модели депрессивно-подобного состояния на мышах, индуцированного 10-дневным социальным стрессом. На этой модели ГТС-302 при 10-дневном в/б введении (1 мг/кг) на фоне стресса полностью противодействовал развитию агедонии (один из основных симптомов депрессии) в тесте предпочтения раствора сахара, а также полностью противодействовал снижению иммунореактивности к BDNF в гиппокампе стрессированных мышей, которое рассматривается как релевантный показатель депрессивно-подобного состояния (*Castren E., Monteggia L.M. // Biological Psychiatry. 2021. Vol. 90, Issue 2. P. 128–136; Ji C.-H., Gu J.-H. // Biochemical Pharmacology. 2022. Vol. 195. P. 114836*). Интересно отметить, что ГТС-302 увеличивал предпочтение раствора сахара и у мышей, не подвергавшихся стрессу, что можно предположительно отнести к его мнемотропной активности, поскольку, согласно литературным данным, предпочтение раствора сахара отражает не только способность получать удовольствие, но и память о расположении соответствующей поилки (*Verharen J.P.H., Jong J.W.de // Nature Communications. 2023. Vol. 14, Issue 1. P. 2419*).

Было установлено, что в ряду дипептидных миметиков 4-й петли NT-3 мнемотропной активностью в тесте распознавания нового объекта на крысах обладают соединения ГТС-301 (1 мг/кг, в/б) и ГТС-302 (1, 5, 10 мг/кг, в/б). Тогда как ГТС-301 улучшал только долговременную память, ГТС-302 – долговременную и кратковременную. Дипептид ГТС-305 оказался неактивным, как и в случае антидепрессантоподобной активности. Для дальнейших исследований были отобраны ГТС-301 и ГТС-302.

Анксиолитическую активность в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» на мышах проявлял только ГТС-302 (1-10 мг/кг, в/б), но не ГТС-301. Различия в фармакологических эффектах ГТС-301 и ГТС-302 можно предположительно объяснить разницей в паттернах активации пострецепторных сигнальных каскадов, выявленной в

лаборатории молекулярной фармакологии под руководством к.б.н. Антиповой Т.А. (Коллек Л.Г., Константинопольский М.А. // *Биохимия*. 2024. Том 89, Выпуск 2. С. 1882–1892). В то время как ГТС-302 активировал все три основных сигнальных каскада Trk рецепторов – PI3K/Akt, MAPK/ERK и PLC- γ , ГТС-301 активировал только MAPK/ERK и PLC- γ . Для расширенных исследований было выбрано более активное соединение ГТС-302.

На модели ишемического инсульта на крысах, индуцированного окклюзией средней мозговой артерии, ГТС-302 при 7-дневном в/б введении статистически значимо снижал объем инфаркта мозга примерно на 40%. Тем самым была показана нейропротекторная активность миметика ГТС-302.

Таким образом, в ряду димерных дипептидных миметиков отдельных петель NT-3 в качестве наиболее перспективного соединения отобран миметик 4-й петли ГТС-302, обладающий *in vivo* при системном введении антидепрессантоподобной, мнемотропной, анксиолитической и нейропротекторной видами активности (Никифоров Д.М., Поварнина П.Ю. // *Медицинский академический журнал*. 2023. Том 23, Выпуск 2. С. 87–99). Дипептид ГТС-302 может стать основой для разработки лекарственных средств для лечения социально-значимых заболеваний, в патогенез которых вовлечен NT-3 (депрессия, тревожные расстройства, шизофрения, нейродегенеративные заболевания).

ВЫВОДЫ

1. В ряду дипептидных миметиков отдельных петель NT-3 антидепрессантоподобная активность в тесте вынужденного плавания на мышах при остром в/б введении обнаружена у миметика 4-й петли ГТС-302 (1-10 мг/кг); при субхроническом в/б введении антидепрессантоподобные эффекты проявляют миметики 4-й петли ГТС-302 (1-10 мг/кг) и ГТС-301 (10-40 мг/кг).

2. Антидепрессантоподобный эффект соединения-лидера ГТС-302 зависит от дозы: при в/б введении в тесте вынужденного плавания на мышах активные дозы находятся в диапазоне от 0,5 до 10 мг/кг, в более низких и более высоких дозах активность не обнаруживается.

3. Антидепрессантоподобная активность соединения ГТС-302 в тесте вынужденного плавания на мышах сохраняется при пероральном введении в дозах от 0,5 до 10 мг/кг.

4. Антидепрессантоподобная активность соединения ГТС-302 подтверждается на модели депрессивно-подобного состояния на мышах, индуцированного 10-дневным социальным стрессом. Соединение ГТС-302 при 10-дневном в/б введении (1 мг/кг) на фоне стресса полностью противодействует развитию агедонии и снижению иммунореактивности к BDNF в гиппокампе.

5. В ряду дипептидных миметиков 4-й петли NT-3 мнемотропной активностью при остром в/б введении в тесте распознавания нового объекта на крысах обладают соединения ГТС-301 (1 мг/кг) и ГТС-302 (1, 5 и 10 мг/кг).

6. Анксиолитическая активность в тесте приподнятого крестообразного лабиринта на мышах при остром в/б введении наблюдается у соединения ГТС-302 (1, 5 и 10 мг/кг).

7. Соединение ГТС-302 (1 мг/кг, 7-дневное в/б введение) проявляет нейропротекторную активность на модели ишемического инсульта на крысах, индуцированного транзиторной окклюзией средней мозговой артерией, снижая объем инфаркта мозга на 40%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Дипептидный миметик 4-й петли NT-3 соединение ГТС-302, сочетающий антидепрессантоподобную активность с нейропротекторной, мнотропной и анксиолитической, перспективен для дальнейшей разработки в качестве потенциального лекарственного препарата.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки

России:

1. Гудашева, Т. А. Первый дипептидный миметик нейротрофина-3: дизайн и фармакологические свойства / Т. А. Гудашева, Н. М. Сазонова, А. В. Тарасюк, И. О. Логвинов, Т. А. Антипова, **Д. М. Никифоров**, П. Ю. Поварнина, С. Б. Середенин // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2022. – Т. 505, № 1. – С. 303-309.
2. Tarasiuk, A. V. Design and synthesis of a novel dipeptide mimetic of the 4th loop of neurotrophin-3 and its pharmacological effects / A. V. Tarasiuk, N. M. Sazonova, M. V. Melnikova, S. V. Pomogaybo, I. O. Logvinov, S. V. Nikolaev, **D. M. Nikiforov**, T. A. Antipova, P. Yu. Povarnina, Yu. V. Vakhitova, T. A. Gudasheva, S. B. Seredenin // Mendeleev Communications. – 2023. – Vol. 33, № 6. – P.786–789.
3. Сазонова, Н. М. Доказательство стереоспецифичности цитопротекторного и антидепрессантоподобного действия ГТС-301, димерного дипептидного мименика нейротрофина-3 / Н. М. Сазонова, А. В. Тарасюк, Н. М. Мельникова, И. А. Жанатаев, И. О. Логвинов, С. В. Николаев, **Д. М. Никифоров**, Т. А. Антипова, П. Ю. Поварнина, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин // Химико-фармацевтический журнал. – 2023. – Т. 57. №12. – С. 23-32.
4. **Никифоров, Д. М.** Исследование спектра фармакологической активности нового оригинального миметика NT-3 дипептида ГТС-302 / **Д. М. Никифоров**, П. Ю. Поварнина, Т. А. Гудашева [и др.] // Медицинский академический журнал. - 2023. - Т. 23, №2. - С. 87-99.
5. Povarnina, P. Y. The Dipeptide Mimetic of the Compound GTS-302, Exhibits Antidepressant-Like Activity in a Mouse Social Defeat Stress Model / P. Y. Povarnina, **D. M. Nikiforov**, T. A. Antipova, I. O. Logvinov // Exploration of Drug Science. – 2024. – Vol. 7, № 1. – P. 1-9.
6. **Nikiforov, D. M.** Study of the Pharmacological Activity Spectrum of the New Original NT-3 Mimetic Dipeptide GTS-302 / **D. M. Nikiforov**, P. Y. Povarnina, T. A. Gudasheva [et al.] // Dokl Biochem Biophys. – 2025. – Vol. 520, № 1. – P. 74-82.

7. **Никифоров, Д. М.** Изучение нейропротекторного действия дипептидных миметиков NT-3 соединений ГТС-301 и ГТС-302 на экспериментальной модели ишемического инсульта / Д. М. Никифоров, П. Ю. Поварнина, Т. А. Гудашева // Фармакокинетика и Фармакодинамика. – 2026. – № 1. – С. 12-19.

Тезисы докладов в материалах научных съездов и конференций:

1. **Никифоров, Д. М.** Спектр фармакологической активности димерного дипептидного миметика 4-й петли NT-3 ГТС-302 / Д. М. Никифоров, П. Ю. Поварнина, Т. А. Гудашева // Материалы VI съезда фармакологов России «Смена поколений и сохранение традиций. Новые идеи – новые лекарства» (20-24 ноября 2023 года). – 2023. – С. 115.

2. Сазонова, Н. М. Синтез диастереомеров низкомолекулярного миметика нейротрофина-3 дипептида ГТС-301 и изучение их антидепрессантоподобной активности / Н. М. Сазонова, М. В. Мельникова, А. В. Тарасюк, Д. М. Никифоров, А. Г. Ребеко, П. И. Антипов, Т. А. Гудашева // Материалы VI съезда фармакологов России «Смена поколений и сохранение традиций. Новые идеи – новые лекарства» (20-24 ноября 2023 года). – 2023. – С. 131а.

3. Поварнина, П. Ю. Изучение нейропсихотропной активности димерного дипептидного миметика 4-й петли нейротрофина-3 / П. Ю. Поварнина, Д. М. Никифоров, Т. А. Гудашева // Сборник тезисов докладов VI Международной конференции «ПОСТГЕНОМ'2024», XI Российского симпозиума «Белки и пептиды» и Российско-китайского конгресса в области наук о жизни. Москва, 2024. – 2024. – С. 269.

Патент:

Российской Федерации № 2800369 С1. Димерные дипептидные миметики нейротрофина-3. Патентообладатель ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий». № заявл. 2022108924, 05.04.2022; опубл. 20.07.2023. Бюл. № 20.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКТ	- threonine-protein kinase (серин-треониновая протеинкиназа)
BDNF	- brain-derived neurotrophic factor (мозговой нейротрофический фактор)
CREB	- cAMP response element-binding protein (белок, связывающий цАМФ-зависимый элемент)
ERK	- extracellular signal-regulated kinase (киназа, регулируемая внеклеточными сигналами)
MAPK	- mitogen-activated protein kinase (митоген-активируемая протеинкиназа)
NGF	- nerve growth factor (фактор роста нервов)
NT-3	- neurotrophin-3 (нейротрофин-3)
NT-4	- neurotrophin-4 (нейротрофин-4)
pCREB	- фосфорилированный CREB
PI3K	- phosphatidylinositol-3-kinase (фосфатидилинозитол-3-киназа)

PLC γ	- phospholipase C gamma (фосфолипаза С гамма)
Trk A, B, C	- tropomyosin-related kinases A, B and C (тирозинкиназные рецепторы A, B, C)
ОСМА	- окклюзия средней мозговой артерии
ПКЛ	- приподнятый крестообразный лабиринт