

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

*На правах рукописи*



Никифоров Дмитрий Михайлович

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

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук  
Поварнина Полина Юрьевна

Москва – 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	12
<b>1.1 Структура NT-3</b> .....	12
<b>1.2 Рецептор TrkC</b> .....	14
<b>1.3 Представленность NT-3 и его рецептора TrkC в организме</b> .....	19
<b>1.4 Функции NT-3</b> .....	20
<b>1.5 Вовлеченность NT-3 в патогенез психических заболеваний</b> .....	25
<i>1.5.1 NT-3 и депрессия</i> .....	25
<i>1.5.2 NT-3 и биполярное расстройство</i> .....	28
<i>1.5.3 NT-3 и тревожные расстройства</i> .....	29
<i>1.5.4 NT-3 и шизофрения</i> .....	31
<b>1.6 NT-3 и нейродегенеративные заболевания</b> .....	32
<b>1.7 Клинические исследования NT-3</b> .....	37
<b>1.8 Низкомолекулярные миметики NT-3</b> .....	38
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	46
<b>2.1 Реактивы</b> .....	46
<b>2.2 Животные</b> .....	48
<b>2.3 Поведенческие тесты</b> .....	49
<i>2.3.2 Тест на двигательную активность</i> .....	50
<i>2.3.3 Тест на предпочтение раствора сахарозы</i> .....	51
<i>2.3.4 Тест распознавания нового объекта</i> .....	51
<i>2.3.5 Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»</i> .....	54
<i>2.3.6 Тест нормобарической гипоксии с гиперкапнией</i> .....	55
<b>2.4 Экспериментальные модели</b> .....	55
<i>2.4.1 Модель ишемического инсульта, индуцированного окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА)</i> .....	55
2.4.1.1 Моделирование ОСМА .....	55
2.4.1.2 Регистрация неврологического дефицита .....	57
<i>2.4.2 Модель депрессивно-подобного состояния, индуцированного социальным стрессом</i> .....	59
<b>2.5 Вестерн-блот анализ</b> .....	60

2.6 Статистические методы.....	62
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>64</b>
<b>3.1 Скрининг по антидепрессантоподобной активности дипептидных миметиков отдельных петель NT-3 при их остром и субхроническом в/б введении .....</b>	<b>64</b>
<b>3.2 Изучение антидепрессантоподобной активности ГТС-302 при его пероральном введении .....</b>	<b>72</b>
<b>3.3 Изучение стереоспецифичности антидепрессантоподобного эффекта ГТС-301 .....</b>	<b>74</b>
<b>3.4 Подтверждение антидепрессантоподобной активности ГТС-302 на модели депрессивно-подобного состояния, вызванного социальным стрессом, на мышах .....</b>	<b>76</b>
<b>3.5 Выявление возможного влияния миметиков 4-й петли NT-3 ГТС-301 и ГТС-302 на двигательную активность животных .....</b>	<b>83</b>
<b>3.6 Выявление возможных мнемотропных эффектов миметиков 4-й петли NT-3 .....</b>	<b>85</b>
<b>3.7 Выявление возможного анксиолитического действия соединений ГТС-301 и ГТС-302.....</b>	<b>89</b>
<b>3.8 Выявление возможной нейропротекторной активности миметиков 4-й петли NT-3 ГТС-301 и ГТС-302.....</b>	<b>92</b>
<i>3.8.1 Изучение антигипоксической активности миметиков ГТС-301 и ГТС-302 на модели нормобарической гипоксии с гипокапнией .....</i>	<i>93</i>
<i>3.8.2 Изучение нейропротекторной активности миметиков ГТС-301 и ГТС-302 на модели ишемического инсульта у крыс.....</i>	<i>95</i>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>100</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>103</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>105</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>106</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ.....</b>	<b>108</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>109</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 [25]. NT-3 и TrkC рецепторы широко распространены во взрослом мозге позвоночных [122, 199]. TrkC является превалирующим 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 [167]. 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 миндалевидном теле, где вовлечены в регуляцию синаптической пластичности [10, 160, 165]. Также известно, что NT-3 играет важную роль в поддержании гиппокампальной нейропластичности и формировании памяти за счет регуляции синаптической пластичности, нейро- и синаптогенеза [13, 73, 147, 160].

В экспериментах *in vivo* были выявлены нейропротекторные и нейрорегенеративные свойства NT-3 при его центральном введении на моделях церебральной ишемии [60, 200], повреждения спинного мозга [39] и периферических нервов [184], моделях болезни Паркинсона и Альцгеймера [62, 191]; антидепрессантоподобная активность [161]; анксиолитическая активность [56, 124]; когнитотропная активность [103]. В клинических исследованиях установлена вовлеченность NT-3 в патогенез депрессии, тревожных расстройств и шизофрении [49, 74, 126, 131].

### **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 гиперальгезия [112, 185]. 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 [35, 197]. В

отличие от миметиков NGF и BDNF, которым посвящено большое количество работ начиная с 1990-х годов [67], сейчас существует лишь небольшое число публикаций, в которых описываются миметики NT-3 [35, 138, 197].

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 [1, 67, 68], основанная на гипотезе [64], 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  $\beta$ -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 [67].

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- $\gamma$ -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 внутрибрюшинном (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 мнотропную 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; и 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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Структура NT-3

Нейротрофин-3 (NT-3) является представителем семейства нейротрофинов, группы эндогенных структурно гомологичных полипептидов, играющих важную роль в регуляции дифференцировки, пролиферации, миелинизации нейронов, поддержании их жизнеспособности и фенотипической стабильности.

Ген NT-3 был одновременно идентифицирован в 1990 году несколькими исследовательскими командами: Хоном А., Либроком Дж. и др. у мыши [80], Мизонпре П. К. и Беллусио Л. у крысы [88], и Кевин Р. Джонс и Луи Ф. Рейхардом у человека [111] с помощью скрининга ДНК по общим для генов *ngf* и *bdnf* последовательностям нуклеотидов, так как предполагалось, что и гены, кодирующие другие гипотетические нейротрофины, будут содержать сходные последовательности.

Ген *nt-3* локализован у человека в плече p13 12 хромосомы [112]. В клетках NT-3 изначально синтезируется в виде белка-предшественника proNT-3 массой 35-37кДа, который под воздействием сериновых протеаз – фуринов - впоследствии подвергается расщеплению до зрелого NT-3 [155].

ProNT-3 проявляет ярко выраженные проапоптотические свойства и обладает высоким сродством к рецепторам p75<sup>NTR</sup> и сортилину [196]. Предполагается, что нарушение процесса расщепления proNT-3 до зрелой формы нейротрофина в нейронах спирального ганглия на фоне экспрессии p75<sup>NTR</sup> и сортилина может являться причиной ухудшения или полной потери слуха [172].

Зрелая форма молекулы NT-3 включает в себя 2 полипептидные цепи, состоящие из 119 аминокислотных остатков с молекулярной массой по 13,5 кДа каждая [92]. Трехмерная структура NT-3 была определена методом

рентгеновской кристаллографии с использованием рекомбинантного человеческого NT-3, экспрессированного в *Escherichia coli*, в 1998 году [28] (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Кристаллическая структура NT-3 (pdb ID: 1nt3)

Было установлено [28], что каждый мономер NT-3 состоит из четырех антипараллельных  $\beta$ -тяжей, при этом четвертый  $\beta$ -тяж закручен вокруг третьего.  $\beta$ -Тяжи NT-3 связаны тремя дисульфидными мостиками. Кроме консервативных участков, NT-3 содержит неконсервативные области, по-видимому, играющие ключевую роль во взаимодействии с рецепторами. Было изучено взаимодействие NT-3 с TrkC (tropomyosin-related kinase C) и p75<sup>NTR</sup> (p75 neurotrophin receptor) рецепторами с использованием химерных конструкций (содержащих фрагменты как NT-3, так и NGF), аланин-сканирующего и сайт-направленного мутагенеза [177]. В результате было установлено, что за связывание с TrkC могут отвечать небольшие

неконсервативные участки, расположенные вокруг центральной области пучка  $\beta$ -тяжей, содержащие аминокислотные остатки: Arg<sup>103</sup> ( $\beta$ -тяж 4), Lys<sup>80</sup> и Gln<sup>83</sup> ( $\beta$ -тяж 3), Arg<sup>56</sup> и Glu<sup>54</sup> ( $\beta$ -тяж 2) Thr<sup>22</sup> ( $\beta$ -тяж 1) [177]. Сравнение структур NT-3 и NGF показало, что эти участки NT-3 пространственно совпадают с участками NGF, отвечающими за его связывание с тирозинкиназным рецептором TrkA (tropomyosin-related kinase A) [28]. Замена на Thr<sup>22</sup> соответствующего остатка Gly<sup>23</sup> в молекуле NGF приводила к увеличению его сродства к TrkC в 240 раз [178].

## 1.2 Рецептор TrkC

Одним из важных отличий NT-3 от других представителей семейства нейротрофинов является его способность взаимодействовать со всеми тремя представителями тирозинкиназных рецепторов нейротрофинов: TrkC – собственным рецептором NT-3, TrkA – рецептором NGF, TrkB – рецептором BDNF [25].

TrkC-рецептор относится к семейству тирозинкиназных рецепторов нейротрофинов. Как и у других представителей этого семейства рецепторов внеклеточная часть TrkC состоит из пяти доменов, первые три из которых представляют собой участки богатые лейцином и цистеином, в то время как четвертый и пятый домены по своей структуре относятся к иммуноглобулиноподобным доменам первого типа (I-set of immunoglobulin-like domains) [154]. Установлено [22], что именно пятый домен TrkC играет ключевую роль в связывании рецептора с лигандом, а также отвечает за специфичность этого связывания.

Активация TrkC происходит посредством его димеризации при связывании с NT-3, что в свою очередь приводит к транс-аутофосфорилированию его консервативных тирозиновых остатков, находящихся во внутриклеточном домене рецептора. Фосфорилированные

тирозиновые остатки цитоплазматического домена служат местами стыковки для адапторных белков, которые обеспечивают взаимодействие между молекулой рецептора и киназами внутри клетки [58]. В число таких адапторных молекул входят белки, содержащие домены SH2 (Src-homology-2) или РТВ (phosphotyrosine-binding), а именно белки SHC1 (SHC (Src-homology 2 domain containing) transforming protein 1), Dok5 и Dok6 (tyrosine kinase/docking protein 5 and 6), FRS2 и FRS3 (fibroblast growth factor receptor substrate 2 и 3), Crk (CT10 regulator of kinase), Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), Gab1 (Grb2-associated binder 1), участвующие в связывании и передаче сигналов от активированного TrkC к внутриклеточным каскадам.

Активация Trk рецепторов приводит к активации трех основных сигнальных путей (Рисунок 2):

- PI3K/Akt путь, опосредованный фосфатидилинозитол-3-киназой (PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase) и протеин-киназой В (также известной как Akt - threonine-protein kinase). Этот каскад инициируется при связывании адапторного белка SHC1 с тирозиновым остатком цитоплазматического домена TrkC [20]. Дальнейшая передача сигнала происходит через комплекс Grb2–Gab1, которые инициируют активацию PI3K [17, 44]. Этот сигнальный каскад обеспечивает нейропротекцию за счет активации экспрессии генов, участвующих в поддержании жизнеспособности клетки, и ингибирования экспрессии генов, участвующих в клеточной гибели, а также за счет активации анти-апоптотических белков и ингибирования про-апоптотических белков [27, 166]. Одним из компонентов PI3K/Akt каскада является белок mTOR (mammalian target of rapamycin) - важнейший регулятор биогенеза рибосом и трансляции белков, участвующий за счет этих своих функций в синаптогенезе и регуляции синаптической пластичности [50];

- MAPK/ERK путь, опосредованный митоген-активируемыми протеинкиназами (mitogen-activated protein kinases) и киназами, регулируемые внеклеточными сигналами (extracellular signal-regulated kinases). Этот каскад активируется при связывании адапторного белка SHC1 с

фосфорилированным остатком тирозина цитоплазматического домена TrkC рецептора [71, 82]. Помимо SHC1, в активации MAPK/ERK могут участвовать адапторные белки Frs2, Frs3, Doc5 и Doc6, которые опосредуют клеточную дифференцировку [102, 159]. Интересно отметить, что белки Doc5 и Doc6 связываются только с TrkB и TrkC, но не с TrkA рецепторами. MAPK/ERK каскад, так же как и PI3K/Akt сигнальный путь, вовлечен в нейропротекцию [24], но может участвовать и в гибели клеток в различных патологических условиях [94]. Было показано, что различия в динамике активации MAPK/ERK (кратковременная или долговременная активация) определяют переключение между нейропротекторными и нейротоксическими эффектами [36, 205]. Полагают, что основная функция MAPK/ERK каскада – регуляция дифференцировки и пролиферации клеток [148]. Низлежащим компонентом MAPK/ERK является транскрипционный фактор CREB (cAMP response element-binding protein), который считается одним из основных маркеров нейропластичности [150]. CREB активирует экспрессию генов, вовлеченных в поддержание жизнеспособности клеток, синаптогенез, нейрогенез, синаптическую пластичность и др., за счет чего играет роль в регуляции когнитивных функций и эмоционального статуса [56, 107, 134, 203];

- PLC-  $\gamma$ 1 путь, опосредованный фосфолипазой C (phospholipase C, gamma 1). PLC-  $\gamma$ 1 непосредственно связывается с фосфорилированным остатком тирозина цитоплазматического домена TrkC рецептора, что обеспечивает активацию кальциевого и диацилглицерин-зависимого каскада. Этот сигнальный каскад регулирует экспрессию и активность белков, вовлеченных в поддержание синаптической пластичности, активирует экспрессию генов, ответственных за дифференцировку клеток и рост аксонов [148]. Кроме того, он участвует в активации MAPK/ERK каскада и интернализации комплекса лиганд/рецептор в сигнальную эндосому [21].



сегодняшний день до конца не изучены. Установлено, что экспрессия некаталитических форм TrkC существенно повышена в сравнении с каталитической формой в первую и вторую недели постнатального развития [179], во время которых наиболее активно происходит синаптогенез. Существует несколько предположений относительно функций некаталитических форм TrkC. Так, рецепторы TrkC<sup>TK-</sup> могут играть роль ингибитора каталитической формы TrkC [19]. Также установлено [170], что некаталитические формы TrkC способны участвовать в процессе синаптогенеза в комплексе с белком PTP $\sigma$  (receptor type protein tyrosine phosphatase-sigma).

Также существуют каталитические изоформы TrkC; TrkC<sup>TK+</sup> (14) (TrkC K14), TrkC<sup>TK+</sup> (25) (TrkC K25), TrkC<sup>TK+</sup>(39) (TrkC K39), отличающиеся от основной изоформы (TrkC K1) наличием дополнительной последовательности аминокислотных остатков в цитоплазматическом домене после консервативного участка YST YYR, который включает в себя один из сайтов аутофосфорилирования [99, 176, 179]. Количество аминокислотных остатков, входящих в состав дополнительного участка, отражены в названии изоформы.

Важным функциональным отличием изоформ (TrkC K14 и TrkC K25) от TrkC является их неспособность активировать сигнальные каскады PI3K/АКТ и PLC- $\gamma$ 1 [99, 116]. Кроме того, было показано, что в культуре фибробластов, экспрессирующих TrkC K14, активация MAP-киназы под действием NT-3 протекает значительно медленнее, чем в тех же клетках, экспрессирующих TrkC K1 [70]. При этом выраженность активации MAPK и ее продолжительность в клетках, экспрессирующих TrkC K14, существенно меньше, чем в клетках, экспрессирующих TrkC K1 [71]. Функции, которые в организме могут выполнять эти каталитические изоформы TrkC, в настоящий момент неизвестны.

### 1.3 Представленность NT-3 и его рецептора TrkC в организме

С помощью ауторадиографии с использованием меченого радиоактивной меткой NT-3 было установлено [12], что наиболее высокая плотность связывания нейротрофина в головном мозге крыс наблюдается в молекулярном (I) и наружном зернистом (II) слоях коры, гиппокампе, обонятельном тракте, таламусе и амигдале. Умеренная плотность связывания NT-3 обнаружена в слоях коры IV-VI, стриатуме, дорзальных корешках и околоспинальном сером веществе спинного мозга.

С помощью иммуногистохимических методов было изучено распределение NT-3 в головном мозге макак резус [198]. Было показано, что в коре NT-3 содержится преимущественно в клетках II, III и V слоя. В основном NT-3 был распространен в популяциях больших и средних пирамидальных нейронов, расположенных в височной доле. Наибольшая плотность NT-3 наблюдалась в соме этих клеток, преимущественно в области цитоплазмы, окружающей ядро. В мозжечке NT-3 был обнаружен в клетках Пуркинье. Также NT-3 присутствует в зонах CA2 и CA3 гиппокампа и в мшистых волокнах, расположенных в гранулярном слое и полиморфном хилусе зубчатой извилины. В базальных ганглиях у макак резус NT-3 был обнаружен в хвостатом ядре, бледном шаре и ядрах миндалевидного тела. Присутствие NT-3 было выявлено в большинстве функциональных ядер продолговатого мозга и моста, в особенности большое количество NT-3 было выявлено в голубом пятне – главном норадренергическом центре головного мозга. Высокое содержание NT-3 в голубом пятне является одной из отличительных особенностей его распределения в головном мозге по отношению к остальным нейротрофинам. В структурах таламуса и гипоталамуса содержание NT-3 наоборот было значительно ниже, чем в случае других представителей семейства нейротрофинов, или не обнаруживалось вовсе. Среди глиальных клеток NT-3 в большом количестве содержался в микроглии и астроцитах, хотя небольшое его количество было обнаружено и в других типах глии [198]. В

другом исследовании на крысах мРНК NT-3 была обнаружена во всех слоях коры, гранулярных клетках мозжечка, гиппокампе, голубом пятне и базальных ядрах (хвостатое ядро и скорлупа) [166, 206].

Исследование представленности TrkC во взрослом головном мозге обезьян и человека иммунохимическими методами показало его высокое содержание в клетках Пуркинье мозжечка и пирамидальных клетках с I по V слоях коры [127]. Особый интерес представляет тот факт, что TrkC в отличие от TrkA и TrkB был обнаружен в голубом пятне, что может указывать на особую роль NT-3 в этой структуре головного мозга [152].

За пределами ЦНС у человека NT-3 широко распространен как в периферической нервной системе, так и в других тканях [190]. мРНК NT-3 была обнаружена в тканях многих внутренних органов, включая печень и селезенку, где её уровень был значительно выше, чем уровни мРНК других нейротрофинов. В почках, печени, легких и селезенке был обнаружен TrkC, что позволяет предположить, что NT-3 важен для поддержания нормального функционирования этих органов.

#### **1.4 Функции NT-3**

Как и другие нейротрофины, NT-3 необходим для нормального развития нервной системы. На разных этапах эмбриогенеза NT-3 и его основной рецептор TrkC экспрессируется в большинстве ее отделов, обеспечивая выживание, пролиферацию и дифференцировку многочисленных популяций нервных клеток [31]. В коре больших полушарий иммунореактивные к NT-3 клетки впервые детектируются у эмбрионов крысы на 13-й день в вентрикулярной зоне и первичном плексиформном слое [206]. Считается, что на раннем этапе эмбриогенеза NT-3 выполняет функцию митогена, то есть стимулирует деление (митоз) и пролиферацию для мигрирующих клеток нервного гребня.

Мыши с дефицитом NT-3, вызванным введением антител к нему во время эмбрионального развития, имели серьезные двигательные нарушения и умирали вскоре после рождения [54]. Введение антител к NT-3 в хорионаллантоисную мембрану (птичий гомолог плаценты млекопитающих) перепелкам на третьем дне эмбрионального развития приводило к потере 30% нейронов в узловатом ганглии и 30% в ганглиях задних корешков спинного мозга [30]. У нокаутных по гену NT-3 мышей было выявлено значительное снижение количества сенсорных и симпатических нейронов, а также глиальных клеток в головном и спинном мозге [173]. Так, в одном из исследований у нокаутных по *nt-3* мышей к 13 дню эмбрионального развития наблюдалось сокращение числа спинальных сенсорных нейронов примерно на две трети, что было обусловлено усилением апоптоза уже сформировавшихся нейронов и ускоренным нейрогенезом в дорсальных корешковых ганглиях между 11 и 12 днями эмбрионального развития без увеличения пролиферации нейрональных стволовых клеток, который истощил пул клеток-предшественников, сделав невозможным возмещение погибающих нейронов [54]. Такие животные умирали в течение первой недели после рождения. Нокаутные по гену *TrkC* мыши умирали в течение первых трех недель после рождения и характеризовались в первую очередь утратой проприоцептивных нейронов [120]. В целом нокаутные по *TrkC* гену животные демонстрировали менее тяжелые неврологические нарушения, чем животные, нокаутные по гену NT-3, что предположительно объясняется способностью последнего взаимодействовать с другими типами *Trk*-рецепторов [173].

Важную роль NT-3 играет в дифференцировке нервных клеток, позднее формирующих нервную систему кишечника, т. е. энтеральную нервную систему (ЭНС) [33]. ЭНС отличается от остальной части ПНС более высоким уровнем автономности, что выражается в её способности самостоятельно регулировать работу продольных и круговых/циркулярных гладких мышц, контролирующей перистальтику и секретомоторные рефлексy кишечника.

Двумя основными структурами, формирующими ЭНС, являются межмышечное (Ауэрбахово) нервное сплетение и подслизистое (Мейсснерово) нервное сплетение, в совокупности включающие в себя около 100 миллионов нервных клеток. На культуре предшественников нервных клеток кишечника крысы было показано [32], что из всех нейротрофинов только NT-3 стимулирует их дифференцировку, а также вовлечен в поддержание их жизнеспособности. Инкубация этих клеток с NT-3 в течение 6 дней приводила к увеличению количества нейронов в 2,5 раза по сравнению с аналогичной культурой, не подвергавшейся воздействию NT-3. Удаление NT-3 из культуральной среды нервных клеток кишечника крысы после их дифференцировки приводило к значительному снижению жизнеспособности этих клеток [33].

Зрелые клетки межмышечного и подслизистого нервных сплетений кишечника продолжают экспрессировать мРНК TrkC, что может указывать на то, что NT-3 необходим не только для нормального формирования и развития ЭНС, но и поддерживает её работу во взрослом организме [168].

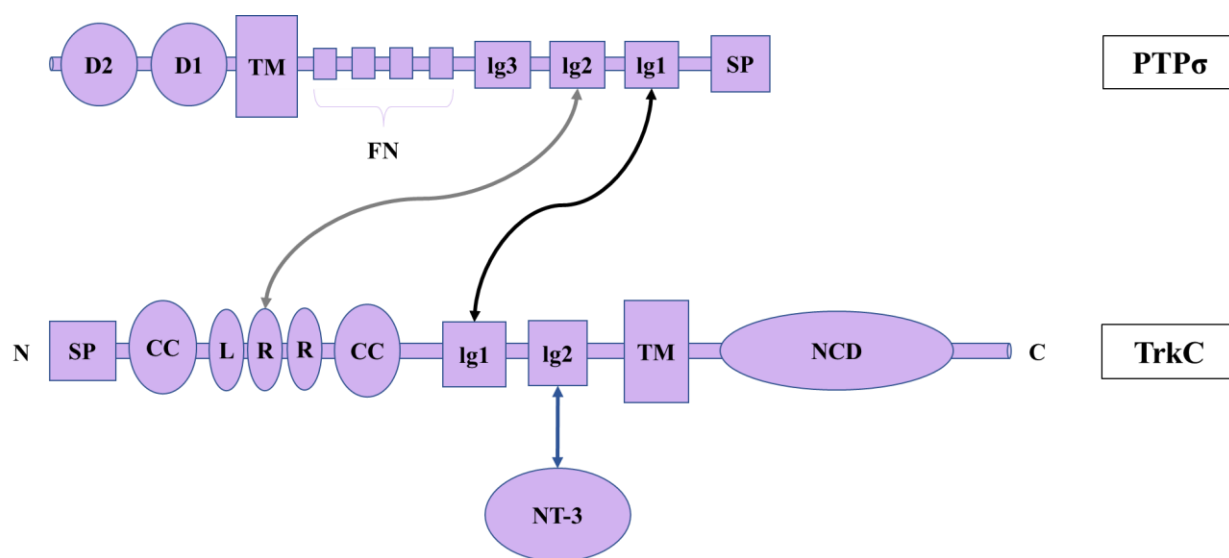
Кроме обеспечения нормального роста, развития и выживания нервных клеток на различных этапах формирования организма NT-3 наряду с мозговым нейротрофическим фактором (BDNF) участвует в регуляции структурной и функциональной пластичности нервной системы [77]. Результаты ряда экспериментов показали, что NT-3 способен стимулировать синаптическую передачу между нейронами, а также между нейронами и другими клетками, а именно гладкими мышечными клетками внутренних органов и поперечнополосатыми мышечными клетками скелетных мышц. Так, *in vitro* на клеточной культуре, содержащей в своём составе нервные и мышечные клетки лягушки *Xenopus*, было показано, что в зависимости от длительности своего воздействия экзогенный NT-3 может вызывать краткосрочное или длительное усиление синаптической передачи [185]. Внесение NT-3 в клеточную культуру вызывало усиление спонтанных синаптических токов, которое прекращалось сразу же после элиминации нейротрофина из клеточной культуры.

Предположительно, этот эффект NT-3 был связан с его влиянием на высвобождение нейромедиаторов. Длительная (в течение 2 дней) инкубация клеток с NT-3 приводила к более выраженному усилению спонтанных синаптических токов, которое сохранялось даже после элиминации нейротрофина. Это усиление сопровождалось увеличением количества и размера синаптических шипиков на аксонах и дендритах, а также увеличением количества синаптических белков, таких как синапсин I и синаптофизин [84, 185]. В другой работе было показано на той же клеточной культуре, что блокирование белкового синтеза анизомицином и циклогексимидином не влияет на индуцированное NT-3 кратковременное усиление синаптической передачи, что подтверждает предположение о том, что в основе краткосрочных и долговременных эффектов нейротрофина на синаптическую передачу лежат разные механизмы [34].

Показано [13, 34, 75, 84, 85, 192], что кратковременные и долговременные изменения синаптической передачи под действием NT-3 опосредованы активацией разных пострецепторных сигнальных каскадов. Так, на культуре клеток *Xenopus* было установлено с использованием фармакологического ингибиторного анализа, что активация MAPK/ERK и PI3K/Akt сигнальных путей необходима для формирования новых нервно-мышечных синапсов [84, 85], а кратковременное усиление синаптических токов опосредовано активацией PI3K и PLC- $\gamma$  каскадов и не требует активации MAPK/ERK [192]. Еще одним отличием долговременных изменений синаптической передачи является эндоцитоз комплекса NT-3/TrkC. Так, присоединение биотин-авидинового комплекса к молекуле NT-3 делало структуру NT-3/TrkC слишком большой (более 1 мкм (размерность) в диаметре) для попадания внутрь нейрона и предотвращало развитие долгосрочных изменений синаптической пластичности, включая морфологические изменения синаптических окончаний и синтез(а) белков, необходимых для усиления синаптической передачи [84].

Установлена вовлеченность TrkC рецепторов в гиппокампальный синаптогенез. Так, у нокаутных по TrkC мышам наблюдается значительное снижение количества мшистых волокон (аксоны гранулярных нейронов) гиппокампа [135].

Интересно отметить, что TrkC способен инициировать процесс формирования новых синаптических окончаний не только в результате образования комплекса с NT-3, но и путем связывания с пресинаптическим белком РТРσ, являющимся представителем подсемейства тирозинфосфатазных рецепторов IIa типа [170]. При этом предполагается, что предварительное связывание NT-3 с TrkC изменяет конформацию и облегчает связывание последнего с РТРσ через домены LRR (leucine-rich repeat) и Ig1 (immunoglobulin-like) [38] (Рисунок 3). Установлено, что способностью связываться с РТРσ обладает не только полноразмерный TrkC, но и его некаталитические формы, у которых отсутствуют внутриклеточные домены [170]. На культуре клеток почек человеческого эмбриона линии HEK293T, экспрессирующих TrkC, было установлено, что связывание этого рецептора с РТРσ в присутствии NT-3 приводило к значительному усилению кластеризации синапсина в пресинаптических окончаниях [73]. При этом в другой работе было установлено, что удаление в TrkC домена Ig2, отвечающего за связывание с NT-3, а также внутриклеточных доменов, не оказывало существенного эффекта на синаптогенную активность TrkC при его связывании с РТРσ [170]. Показано, что мутантные формы TrkC, у которых отсутствуют домены связывания с РТРσ, лишены способности стимулировать синаптогенез [73, 170]. Домены связывания некаталитической формы TrkC с NT-3 и РТРσ схематично представлены на рисунке 3.



Примечание: Домены TrkC LRR и Ig1 необходимы для связывания PTPσ, тогда как Ig2 отвечает за связывание NT-3. SP – сигнальный пептид; CC – цистеиновый кластер; TM – трансмембранный домен; NCD – некаталитический домен; FN – фибронектин типа III; D1 и D2 – домены с фосфатазной активностью

Рисунок 3 – Расположение доменов связывания некаталитической формы TrkC с NT-3 и PTPσ [13].

## 1.5 Вовлеченность NT-3 в патогенез психических заболеваний

### 1.5.1 NT-3 и депрессия

Депрессия является самым распространенным психическим заболеванием, приводящим к существенному снижению качества жизни больного и его социальной дезадаптации. На 2025 год по данным ВОЗ депрессией страдает около 5% взрослого населения во всем мире [45]. Однако, стоит принимать во внимание, что в это число входят только люди, обратившиеся за профессиональной медицинской помощью, в то время как сама специфика данного заболевания и большая вариабельность выраженности его симптомов способствуют тому, что огромное количество больных остается неучтенными и не получают необходимое им лечение. Прогнозируется, что к 2030 году депрессия станет главной причиной потери людьми трудоспособности. К симптомам депрессии относятся подавленное

состояние, агедония, раздражительность, трудности с концентрацией внимания, нарушения сна, аппетита, нарушения когнитивных процессов и склонность к суициду [130].

Депрессия ассоциирована с атрофией и гибелью нервных клеток в различных отделах головного мозга, в особенности в гиппокампе, миндалевидном теле, префронтальной и поясной коре, а также нарушениями нейро-, синаптогенеза и синаптической пластичности [101]. Поскольку нейротрофины, включая NT-3, являются одними из основных регуляторов вышеперечисленных процессов, нарушение сигналинга этих белков в настоящее время рассматривается как один из ключевых патофизиологических механизмов развития депрессивных расстройств [48].

В клинических исследованиях установлено, что содержание NT-3 в сыворотке крови снижено при депрессии, причем это снижение коррелирует с тяжестью заболевания [131]. Снижение уровня NT-3 было обнаружено и в периферических лейкоцитах людей с депрессией, при этом уровень NT-3 возвращался в норму во время ремиссии [136]. В посмертных исследованиях было выявлено значительное снижение содержания NT-3 в теменной коре людей, страдавших депрессией и не получавших лечения; при этом такого снижения не наблюдалось у тех, кто проходил лечение антидепрессантами [158]. У покончивших жизнь самоубийством и страдавших депрессией людей содержание NT-3 в гиппокампе было значительно снижено в сравнении с людьми, не имевшими данного диагноза и умершими по другим причинам [90]. Интересно отметить, что у людей старше 80 лет, страдающих депрессией, было отмечено увеличение уровня NT-3 в цереброспинальной жидкости по сравнению со здоровыми людьми, и это увеличение коррелировало с тяжестью заболевания [90], при этом длительное лечение этих людей антидепрессантами, блокирующими обратный захват норадреналина (но не антидепрессантами других групп), приводило к нормализации уровня NT-3. Предположительно, эти данные свидетельствуют о дисфункции NT-3-зависимой норадренергической системы у данной категории пациентов. В

этом аспекте увеличение содержания NT-3 может рассматриваться как компенсаторный механизм.

Снижение содержания NT-3 в головном мозге выявлено и на экспериментальных моделях депрессии. Так, на модели хронического непредсказуемого умеренного стресса у крыс наблюдалось значительное снижение уровня NT-3 и BDNF в разных зонах гиппокампа стрессированных животных, которое сопровождалось снижением содержания нейротрансмиттеров: серотонина, норадреналина и дофамина в сыворотке крови, подавлением нейрогенеза, дифференцировки и миграции нейронов в септо-темпоральной оси гиппокампа – нарушениями характерными для депрессивно-подобного состояния [175].

Установлено, что NT-3 способен увеличивать высвобождение серотонина и повышать уровень норадреналина в коре, базальных ганглиях и гиппокампе [157]. В экспериментах на крысах установлено, что NT-3 при внутримозговом введении предотвращает дегенерацию серотонинергических синапсов после их нейротоксического поражения [114]. Норадренергические нейроны зависят от трофической поддержки NT-3. Так, во время эмбрионального развития NT-3 регулирует экспрессию транспортера норадреналина и стимулирует дифференцировку норадренергических нейронов, а во взрослом организме поддерживает их выживаемость и фенотипическую стабильность [163]. Таким образом, NT-3 поддерживает функционирование моноаминергических нейронов, вовлеченных в регуляцию эмоционального состояния.

Также хорошо известно о вовлеченности NT-3 в гиппокампальный нейрогенез [160], ухудшение которого является одним из характерных патофизиологических признаков депрессии [51]. Антидепрессантоподобный потенциал NT-3 обусловлен также его способностью стимулировать синтез и высвобождение BDNF [29, 139] – другого нейротрофина, дефицит которого ассоциирован с депрессией [194]. Помимо TrkC рецепторов, NT-3 связывается (с более низкой аффинностью) со специфическими для BDNF TrkB

рецепторами, что вероятно может приводить к активации молекулярных механизмов, лежащих в основе антидепрессантоподобных эффектов BDNF.

Интересно отметить, что высокий уровень мРНК NT-3 был обнаружен у крыс в области вентральной покрышки, входящей в состав системы вознаграждения, нарушение функционирования которой ассоциировано с депрессией [26, 60].

В экспериментах *in vivo* NT-3 продемонстрировал антидепрессантоподобное действие в тесте вынужденного плавания и на модели выученной беспомощности при его введении крысам в гранулярный слой зубчатой извилины гиппокампа [142].

Таким образом, NT-3 вовлечен в патогенез депрессии и может рассматриваться как перспективная основа для разработки антидепрессантов с новым механизмом действия.

### 1.5.2 NT-3 и биполярное расстройство

Биполярное расстройство (БАР – биполярное аффективное расстройство) является сложным психическим заболеванием, во время которого маниакальные эпизоды сменяются депрессивными или бессимптомными фазами, также называемыми интермиссиями или интерфазами. По данным ВОЗ за 2024 г. БАР было зафиксировано у 40 миллионов людей по всему миру [23]. Первые признаки расстройства могут быть заметны ещё в детстве или подростковом возрасте и проявляются чаще всего в ухудшении внимания и запоминания новой информации, что негативно влияет на процесс обучения. Интересно отметить, что дети людей, страдающих БАР, находятся в группе риска, поскольку заболевание часто носит наследственный характер [46]. Посмертное изучение структур головного мозга людей, страдавших БАР, показало снижение количества и плотности нейронов и глиальных клеток в коре [133, 146]. Подобные

патологические изменения отражают ухудшение нейропластичности, которое может быть следствием нарушения нейротрофинового сигналинга [182].

В клинических исследованиях были выявлены разнонаправленные изменения содержания NT-3 в крови людей с БАП. Так, было показано, что содержание NT-3 в сыворотке крови при БАП значительно увеличено на фоне как депрессивных, так и маниакальных фаз независимо от того, получал ли человек медикаментозное лечение или нет [55, 182]. В другом исследовании было установлено, что уровень NT-3 во время депрессивной фазы повышен в сыворотке крови людей, страдавших БАП первого, но не второго типа, при котором отсутствует выраженная маниакальная фаза [105]. В этих исследованиях увеличение уровня NT-3 в крови было ассоциировано со снижением уровня BDNF, в связи с этим было сделано предположение [77], что увеличение экспрессии NT-3 при БАП отражает его компенсаторную роль по отношению к BDNF. В то же время описано и статистически значимое снижение уровня NT-3 в плазме крови пациентов с маниакальной фазой БАП [125]. В этом же исследовании была установлена ассоциация между полиморфизмом гена NT-3 и наличием когнитивных нарушений у пациентов с БАП.

Интересно, что у детей, родившихся в семьях, где один или оба родителя страдают БАП, и потому входящих в группу риска данного заболевания, было выявлено значительное снижение уровня NT-3 в плазме крови [37]. Данному снижению уровня NT-3 соответствуют значительно более низкие баллы, полученные этими детьми в тесте запоминания числовых последовательностей [198].

### *1.5.3 NT-3 и тревожные расстройства*

Тревожные расстройства широко распространены и включают в себя такие патологические состояния как генерализованное тревожное

расстройство, различные фобии, паническое расстройство, посттравматическое стрессовое расстройство, обсессивно-компульсивное расстройство и др. По данным ВОЗ за 2019 год, различные тревожные расстройства диагностированы у 301 миллиона людей по всему миру [16]. В основе многих тревожных расстройств лежит нарушение угасания контекстуального страха. Основная область мозга, вовлеченная в реакцию страха – миндалевидное тело, которое получает сигналы из гиппокампа с информацией о контексте и из префронтальной коры, обеспечивающей нисходящий контроль [96, 115, 164]. В миндалевидном теле присутствуют две отдельные, но взаимосвязанные популяции глутаматергических нейронов, одни из которых обеспечивают формирование реакции страха, а другие – ее угасание [72, 78, 156]. Формирование и угасание реакции страха связаны соответственно с процессами долговременной потенциации (LTP) и долговременной депрессии (LTD), которые считаются нейрофизиологической основой обучения и памяти. В связи с этим предполагается, что LTP и LTD в синапсах глутаматергических нейронов миндалевидного тела лежат в основе приобретения или исчезновения реакции страха в процессе консолидации и/или реконсолидации соответствующих воспоминаний [42, 95].

Как уже было сказано ранее, NT-3 и TrkC рецепторы экспрессируются в коре, гиппокампе и миндалевидном теле, где принимают участие в регуляции синаптической пластичности [12, 147, 160]. Было показано [118], что инкубация с NT-3 срезов мозга мышей с фенотипически сниженной способностью к угасанию реакции страха, приводила к снижению LTP в миндалевидном теле, лежащей в основе приобретения страха. С другой стороны, блокирование NT-3/TrkC сигналинга в срезах мозга мышей с нормальной способностью к угасанию реакции страха приводила к активации LTP в миндалевидном теле [118].

В литературе имеются данные об анксиолитической активности NT-3. Так, на трансгенных мышях TgNTRK3 (генетическая модель патологического страха) было установлено, что введение NT-3 в медиальную префронтальную

кору приводит к снижению времени фризинга в тесте формирования контекстно обусловленного страха [43]. В другой работе было показано, что NT-3 при введении в дорсальную амигдалу снижал проявления тревожного темперамента у макак-резус, который определяли на основании поведенческой заторможенности (фризинг и снижение вокализации) в ответ на контакт с потенциально опасным человеком [57]. В клинических исследованиях выявлена взаимосвязь между полиморфизмом гена *ntkr3*, кодирующего TrkC, и риском развития панического и обсессивно-компульсивного расстройства [18, 126].

#### *1.5.4 NT-3 и шизофрения*

Шизофрения является одним из наиболее распространенных и сложных, с точки зрения протекания и лечения, психических заболеваний. По данным ВОЗ за 2022 г. шизофренией страдает 24 миллиона людей по всему миру [162]. Шизофрения чаще всего ассоциирована с нарушениями формирования структур головного мозга в период онтогенеза [141]. NT-3 выступает одним из факторов, обеспечивающих нормальное протекание процессов развития нервной системы. Во взрослом организме NT-3 отвечает за поддержание фенотипической стабильности различных популяций нейронов, включая дофаминергические [108]. Как хорошо известно [59], дофаминергическая система вовлечена в формирование как положительной, так и отрицательной симптоматики при шизофрении.

В ряде исследований выявлено снижение уровня NT-3 в сыворотке крови и головном мозге при шизофрении. Так, в сыворотке крови людей, страдающих параноидальной шизофренией, уровень NT-3 оказался значительно снижен по сравнению со здоровыми людьми [180]. В посмертных исследованиях было выявлено значительное снижение содержания NT-3 в лобном и теменном отделах коры у больных шизофренией по сравнению с

людьми, не страдавшими этим заболеванием [49]. Интересно отметить, что у пациентов с шизофренией, одновременно имеющих симптомы депрессии, уровень NT-3 в сыворотке крови был выше, чем у людей с шизофренией, но без депрессивной симптоматики [188]. При этом повышение уровня NT-3 происходило на фоне снижения уровня BDNF, что может свидетельствовать о компенсаторной роли NT-3 по отношению к BDNF.

На вовлеченность нейротрофина в патогенез шизофрении указывает также корреляция между полиморфизмом гена NT-3 и риском возникновения данного заболевания. Так, было установлено, что миссенс-мутация Gly<sup>63</sup>→Glu<sup>63</sup> (GGG→GAG) повышает риск возникновения шизофрении в 2.595 раз [74]. В другом исследовании было показано, что у людей с шизофренией статистически значимо чаще присутствует аллель A3 гена NT-3 [129].

## 1.6 NT-3 и нейродегенеративные заболевания

Нейродегенеративные заболевания характеризуются прогрессирующей дисфункцией и гибелью определенных популяций нейронов, приводящей к возникновению экстрапирамидных и пирамидных двигательных расстройств, поведенческих и/или когнитивных нарушений, которые могут наблюдаться как по отдельности, так и в совокупности в зависимости от типа заболевания [100]. Нейродегенеративные заболевания могут быть классифицированы по первичным клиническим признакам (деменция, экстрапирамидные нарушения), анатомическому распределению нейродегенерации (лобно-височная, экстрапирамидная и др.) или по типу белковой аномалии, приводящей к нарушению нормальной жизнедеятельности нейронов и глиальных клеток (амилоидоз, таутопатия,  $\alpha$ -синуклеинопатия и протеинопатия TDP-43) [47]. Важно отметить, что белковые аномалии могут присутствовать в нервных тканях задолго до первого проявления клинических признаков заболевания.

К нейродегенеративным заболеваниям относят болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера, болезнь Пика, хроническую травматическую энцефалопатию и многие другие. Болезни Альцгеймера и Паркинсона являются наиболее распространенными среди всех заболеваний этой группы.

К группе риска в основном относятся люди старше 60 лет, поэтому с ростом продолжительности жизни число случаев возникновения этих заболеваний стремительно увеличивается. Всего в мире на 2025 год от нейродегенеративных заболеваний страдает более 50 миллионов человек [83], [47]. По оценкам GNPC (Global Neurodegeneration Proteomics Consortium), число случаев заболеваний нейродегенеративными расстройствами может увеличиться до 115 миллионов к 2050 году [83].

В настоящий момент возможно лишь симптоматическое лечение этих заболеваний; эффективных методов лечения или лекарственных препаратов с доказанной эффективностью, способных полностью остановить развитие патологии и восстановить нормальную работу нервных клеток, уже затронутых болезнью, не существует. Поскольку нейродегенеративные заболевания приводят к тяжелой инвалидизации и существенному снижению качества жизни больного, поиск эффективных способов их лечения является одной из приоритетных задач современной медицины и фармакологии.

Одно из предположений относительно этиологии нейродегенеративных заболеваний заключается в том, что их развитие связано с нарушениями в работе систем, опосредующих восстановление нормального функционирования нервных клеток после воздействия некоторого повреждающего фактора (процесса, возникшего в результате травмы или воздействия глюкокортикоидов, вызванного продолжительным стрессом) [137]. Нейротрофины играют важнейшую роль в обеспечении выживания и восстановления нейронов, и потому являются перспективными молекулярными мишенями для разработки лекарственных средств с нейропротекторными и нейрорегенеративными свойствами. Вовлеченность

NT-3 в патогенез нейродегенеративных заболеваний изучена в меньшей степени, чем NGF и BDNF. Однако имеются результаты исследований NT-3 на различных *in vivo* моделях, подтверждающие наличие у него нейропротекторной, нейрорегенеративной и мнемотропной активностей.

Так, на модели болезни Альцгеймера (введение фрагмента  $\beta$ -амилоида (A $\beta$ ) A $\beta$ 1–42 в желудочки мозга крыс), было продемонстрировано, что у животных, которым была произведена имплантация в гиппокамп мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, содержащих экспрессирующий NT-3 вирусный вектор, была значительно улучшена память в водном лабиринте Морриса, как по сравнению с животными, получавшими раствор PBS вместо стволовых клеток, так и с животными, которым имплантировали стволовые клетки без вирусного вектора [191].

В условиях экспериментальной болезни Паркинсона, вызванной односторонним введением 6-гидроксидофамина в структуры дофаминергической системы мозга крыс: вентральную область покрышки (ventral tegmental area) и медиальный пучок переднего мозга (medial forebrain bundle), и в область повреждения нейрональных стволовых клеток, экспрессирующих NT-3, предотвращало развитие апоморфин-индуцированных ротаций, а также нарушений памяти в водном лабиринте Морриса в сравнении с животными, которым вводили стволовые клетки, не несущие ген *nt-3* [63]. В другом исследовании была выявлена нейропротекторная активность NT-3 на модели болезни Паркинсона, вызванной внутрибрюшинным введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидроперидина (МФТП) рыбам Данио-рерио [139]. Внутримозговое введение NT-3 этим рыбам практически полностью противодействовало снижению количества дофаминергических нейронов базальных ганглиев и снижению двигательной активности [139].

В электрофизиологических исследованиях на срезах мозга мышей с экспериментальной болезнью Хантингтона, индуцированной внутрибрюшинным введением 3-нитропропионовой кислоты, было показано,

что NT-3 улучшает кортико-стриарную синаптическую передачу и восстанавливает долговременную депрессию в кортико-стриарных синапсах [61].

Известно, что рассеянный склероз сопровождается обширными нейровоспалительными процессами, приводящими к демиелинизации нейронов и, как следствие, нарушению передачи нервных импульсов, гибели аксонов и последующей атрофии нервной ткани головного мозга. В этих условиях активируется экспрессия нейротрофинов клетками иммунной системы, что предположительно рассматривается как эндогенный защитный механизм. Так, в клинических исследованиях было установлено [89], что концентрация NT-3 в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов, страдающих от рассеянного склероза, увеличена по сравнению со здоровыми людьми. При этом это увеличение находится в прямой корреляции с объемом паренхиматозной фракции мозга (количественный показатель совокупности функциональной нервной ткани в ЦНС) и площадью поперечного сечения мозолистого тела – основных показателей атрофии мозга, используемого при диагностировании и исследовании рассеянного склероза [89].

Нейропротекторная активность NT-3 была выявлена на модели инсульта (который можно отнести к острым нейродегенеративным заболеваниям), вызванного транзиторной окклюзией среднемозговой сонной артерии у крыс [200]: внутримозговое введение крысам с экспериментальным инсультом вирусного вектора, экспрессирующего NT-3, значительно снижало объем инфаркта мозга и улучшало неврологический статус по сравнению с нелечеными животными. У крыс, получавших вирусный вектор, содержащий ген NT-3, было также выявлено значительное снижение апоптоза в области пенумбры [200].

Нейрорегенеративная активность NT-3 была установлена на моделях повреждения спинного мозга. Так, на модели перерезки спинного мозга на крысах трансплантация мезенхимальных стволовых клеток, экспрессирующих

NT-3, в спинной мозг ниже области повреждения приводила к значительному улучшению двигательных функций задних конечностей по сравнению с активным контролем [169]. Интратекальное введение NT-3 крысам после травмы спинного мозга в район повреждения приводило к снижению апоптоза и аутофагии нервных клеток, а также стимулировало пролиферацию олигодендроцитов в зоне повреждения, при этом крысы, получавшие NT-3, демонстрировали более быстрое восстановление двигательных функций по сравнению с контрольными животными [39]. В другом исследовании было установлено, что интратекальное введение NT-3 крысам после травмы спинного мозга восстанавливает двигательную активность, снижает уровни маркеров окислительного стресса и апоптоза, воспалительных цитокинов, увеличивает содержание глутатиона и супероксиддисмутазы в сыворотке крови; при этом участки костного мозга, прилежащие к месту повреждения, у животных, получавших NT-3, характеризовались менее выраженными признаками отёков, кровотечений и некроза, чем у контрольных животных [207].

Нейродегенеративные повреждения могут быть вызваны не только травмами или другим патологическим процессом, но и напрямую воздействием среды. Так соли мышьяка арсениты, попадающие в человеческий организм в основном с загрязненной тяжелыми металлами водой, могут оказывать крайне негативное действие на работу ЦНС: нарушать нейрогенез и синаптическую пластичность, разрушать миелиновую оболочку нервных волокон, что приводит к существенному снижению когнитивных способностей, и даже рассматривается как один из возможных факторов, способствующих развитию нейродегенеративных заболеваний [193]. В исследовании [41] на мышах линии SPF-grade male C57BL/6N, получавших арсенит натрия с питьевой водой в течение 13 дней, было выявлено снижение количества нейронов в отделах CA1, CA3 и зубчатой извилине гиппокампа, что негативно сказывалось на способности животных к обучению в водном лабиринте Морриса по сравнению с контрольными животными. Эти

нарушения сопровождалось снижением уровней как белка NT-3, так и мРНК NT-3 в гиппокампе. В той же работе на культуре гиппокампальных клеток NT-22 было выявлено, что внесение *nt-3* в клетки в составе вирусного вектора приводило к снижению апоптоза, вызванного арсенитом натрия. Было показано, что этот нейропротекторный эффект NT-3 опосредован PI3K/Akt – сигнальным каскадом, поскольку снимался введением блокатора PI3K/Akt – соединения LY294002 [41].

### 1.7 Клинические исследования NT-3

NT-3 изучали на I фазе клинических исследований как средство лечения болезни Шарко-Мари-Тута (наследственная моторно-сенсорная нейропатия). Подкожное введение NT-3 отдельным пациентам (4 человека получали NT-3 и 4 человека плацебо) в дозе 150 мг/кг 3 раза в неделю в течение 24 недель вызывало увеличение количества миелинизированных волокон и шванновских клеток в икроножных нервах, снижало выраженность нейропатии (а именно улучшало чувствительность и рефлексы) [149]. Вместе с тем наблюдались побочные эффекты, основные из которых – раздражение в месте инъекции и диарея. Результаты этого исследования были опубликованы в 2005 году [149], и недавно был анонсирован новый этап клинических исследований NT-3, но в этот раз его доставка будет осуществляться за счёт AAV – аденоассоциированного вируса. В ходе фазы I/IIa клинических исследований предполагается одноразовая инъекция AAV-вектора scAAV1.tMCK.NTF3 в мышцы обеих ног 3 пациентам с СМТ1А – наиболее распространённой формой болезни Шарко-Мари-Тута, вызванной дупликацией гена PMP22, приводящей к избыточной продукции одноимённого белка и нарушению формирования миелиновой оболочки. Оценка безопасности и эффективности лечения будет производиться в течение 2 лет с момента инъекции с

использованием широкого спектра тестов сенсорных и моторных функций пациентов. Старт исследования запланирован на апрель 2027 года.

### 1.8 Низкомолекулярные миметики NT-3

Клиническое применение NT-3, как и в случае других нейротрофинов, ограничено низкой биодоступностью – быстрой ферментативной деградацией, плохим распределением в тканях, низкой способностью проникать через гематотканевые барьеры [142]. Кроме того, нейротрофины в связи с их плейотропностью, могут вызывать серьезные побочные эффекты. Так, для NT-3 установлено, что он, как и NGF, может индуцировать гиперальгезию [67, 88, 113]. Как оптимальная стратегия преодоления этих ограничений NT-3 рассматривается создание его низкомолекулярных системно-активных миметиков, которые бы обладали терапевтическими свойствами полноразмерного нейротрофина и были лишены его нежелательных эффектов. Низкомолекулярные миметики NT-3 разрабатываются рядом исследовательских групп за рубежом. В отличие от миметиков NGF и BDNF, которым посвящено большое количество литературы, начиная с начала 1990-х годов прошлого века, существует лишь небольшое количество публикаций, в которых описываются миметики NT-3.

Первый низкомолекулярный миметик NT-3 (соединение 2b, Рисунок 4), созданный исследовательской группой под руководством Burgess K. and Saragovi U.H. на основе бета поворотного скэффолда, был описан в 2002 году [138]. Соединение 2b представляло собой макроциклический бета-поворотный пептидомиметик, содержащий в структуре дипептидный фрагмент Lys-Ser NT-3.

Было установлено, что 2b в концентрациях 0.4–50 мкМ потенцирует выживаемость экспрессирующих TrkC клеток линии NIH-3T3 при инкубации в бессывороточной среде в присутствии NT-3 в субоптимальных

концентрациях (0,1 нМ). Методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией было показано прямое связывание соединения 2b с TrkC рецепторами в концентрации 20 мкМ, а методом Вестерн-блот анализа показано, что 2b в концентрации 50 мкМ вызывает фосфорилирование TrkC.

В дальнейшем этой же научной группой были созданы другие низкомолекулярные миметики NT-3 на основе азот-, серо- и кислородсодержащих бета-поворотных темплетов с внедренной дипептидной последовательностью  $\beta$ -изгибов нейротрофина. Из них ряд соединений связывались с TrkC рецепторами, что было показано методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией. Наиболее интересным соединением оказался миметик NT-3 - 1Aa (Рисунок 4), который активировал специфичный для нейротрофина рецептор TrkC, не активируя при этом TrkA. Для пептидомиметика 1Aa была показана активность на *in vitro* модели нейросенсорной тугоухости [93], характерная для полноразмерного NT-3 [183]. В концентрации 400 нМ 1Aa усиливал рост нейритов в культуре нейронов спирального ганглия, а также в культуре эксплантатов кортиева органа, защищал ленточные синапсы (ribbon synapses) внутренних волосковых клеток и способствовал их регенерации после повреждения циановой кислотой.

Кроме того, был сконструирован ряд симметричных и смешанных бивалентных миметиков NT-3, в структуре которых содержалось по два дипептидных фрагмента  $\beta$ -изгиба, связанных линкером. Конформация  $\beta$ -изгиба воспроизведена с помощью триазольного темплета [35]. Методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией было показано прямое связывание бивалентных миметиков (в концентрации 50 мкМ) с TrkA и TrkC рецепторами. С помощью Вестерн-блот анализа выявлена активация TrkA и TrkC и сигнальных путей Akt- и MAPK. В экспериментах *in vitro* некоторые миметики обладали только нейропротекторной, а другие – только дифференцирующей активностью. Так, симметричный бивалентный миметик

6C (Рисунок 4) в концентрации 20 мкМ обладал собственной нейропротекторной активностью, а также потенцировал нейропротекторные эффекты NT-3 и NGF в их субоптимальных концентрациях. Миметик 6C не обладал дифференцирующей активностью, тогда как его несимметричный аналог 6F, в структуре которого воспроизведены боковые радикалы аминокислотных остатков (а.о.) Tyr, Trp, Leu и Lys, демонстрировал нейритогенный эффект, но не проявлял нейропротекторного эффекта.

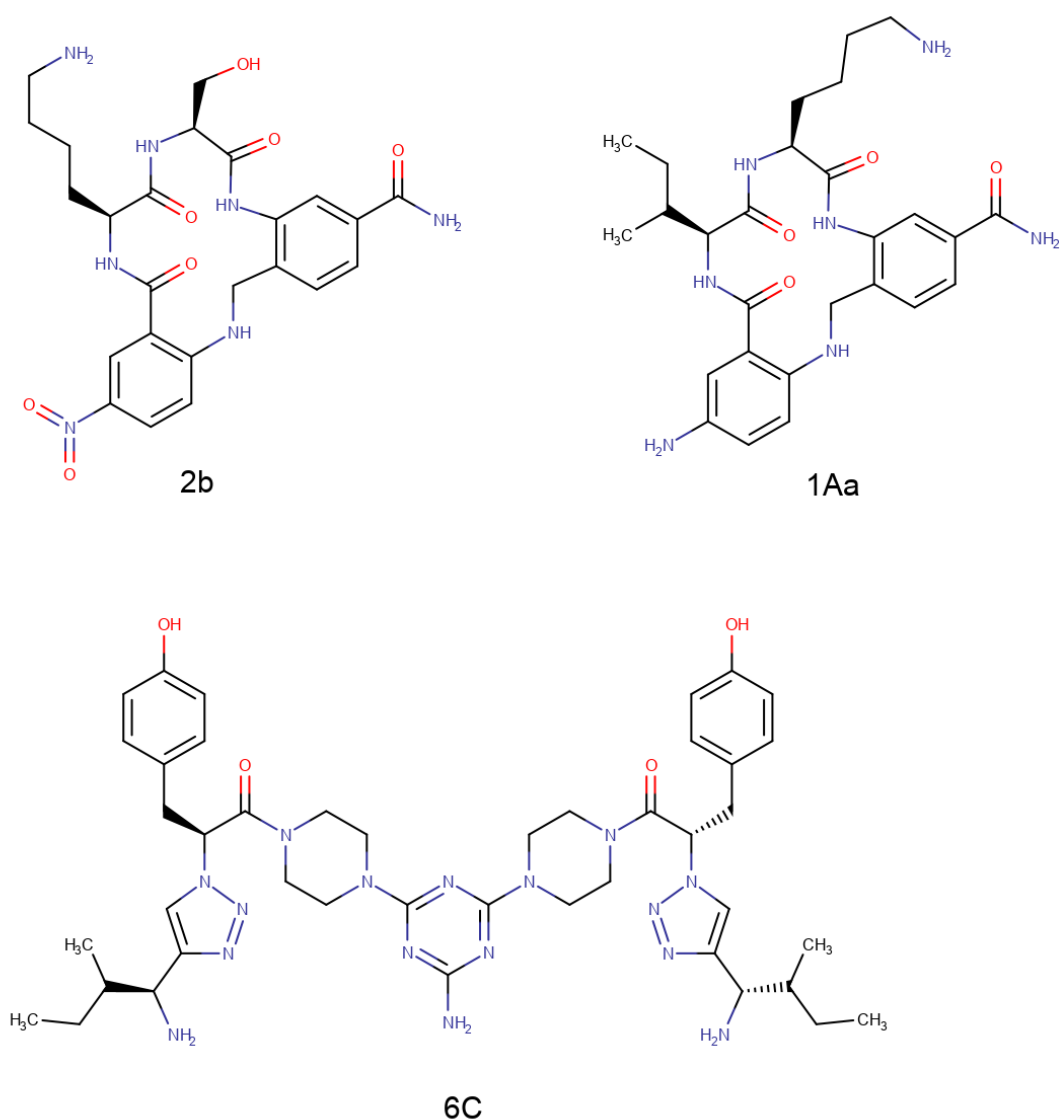


Рисунок 4 – Моновалентные (2b, 1Aa) и бивалентный (6C) миметики NT-3, содержащие в структуре его дипептидные последовательности [35, 138, 197]

Научной группой из Катанийского университета (Катания, Италия) под руководством Enrico Rizzarelli был синтезирован пептид, содержащий 13

аминокислотных остатков (1–13) N-концевого участка NT-3 [128]. В экспериментах *in vitro* на клетках нейробластомы человека линии SH-SY5Y было показано, что пептид, подобно полноразмерному нейротрофину, стимулирует дифференцировку нейронов и рост нейритов, причем эти эффекты ингибировались при блокировании Trk рецепторов, а также вызывает фосфорилирование CREB. В комплексе с ионами меди пептид проявлял более выраженную активность, что предположительно можно объяснить улучшением интернализации пептида [121].

Позднее этим же коллективом был синтезирован циклический миметик, также состоящий из 13 аминокислотных остатков (1-13) N-концевого участка NT-3, остаток гистидина в составе которого обеспечивал образование комплекса с атомом меди [110]. В экспериментах *in vitro* на культуре клеток SH-SY5Y было показано, что полученный пептид не оказывал токсического действия, стимулировал дифференцировку нейронов и рост нейритов, значительно усиливал экспрессию рецепторов TrkA и TrkB, а также рецепторов фактора роста эндотелия сосудов VEGFR1 и VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor receptor). Кроме того, пептид значительно увеличивал экспрессию самого фактора роста эндотелия сосудов, а также BDNF в клеточной культуре SH-SY5Y как в комплексе с медью, так и без неё. Все выявленные эффекты циклического миметика NT-3, по всей видимости, опосредуются путём стимуляции экспрессии транскрипционного фактора CREB, увеличение фосфорилированных форм которого наряду с pTrkC были обнаружены в клетках.

Следует отметить, что в доступной литературе не описаны *in vivo* эффекты низкомолекулярных миметиков NT-3.

В ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» был использован оригинальный подход для конструирования низкомолекулярных миметиков нейротрофинов, основанный на предположении, что основными

фармакофорами при взаимодействии с Trk рецепторами являются наиболее экспонированные, чаще всего центральные, дипептидные фрагменты  $\beta$ -изгибов шпилькообразных петель нейротрофинов [1]. Этот подход позволил получить наименьшие из возможных дипептидные миметики. Преимуществом коротких пептидов, в основном ди-трипептидов, по сравнению с олигопептидами является их способность проникать через биологические барьеры как за счет пассивного, так и активного транспорта [69]. Коротким пептидам, особенно дипептидам, присуща повышенная энзиматическая стабильность, дающая возможность перорального использования. В основу конструирования дипептидных миметиков нейротрофинов также легла гипотеза [66] о возможности селективной активации путей трансдукции сигнала Trk рецепторов с помощью миметиков отдельных петель нейротрофинов. В результате могут быть реализованы отдельные физиологические функции, опосредованные Trk рецепторами, и среди миметиков нейротрофинов могут быть получены соединения с определенной фармакологической активностью, свободные от побочных эффектов, характерных для нативных полноразмерных нейротрофинов, таких как избыточная нейритогенная активность, гиперальгезия, катастрофическая потеря веса, стимуляция канцерогенеза.

Димерные дипептидные миметики отдельных петель NGF и BDNF разрабатываются в лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств более 10 лет. Сконструированы и синтезированы миметики 1-й, 3-й и 4-й петель NGF, 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF [RU Patent 2410392, 2010; U.S. Patent US 9,683,014 B2, 2017; EPO Patent EP 2397488, 2019; Chinese Patent CN 102365294 B, 2016; Indian Patent 296506, 2018]. Соединения конструировались по единому плану – сохранялся наиболее экспонированный дипептидный участок бета-изгиба, предшествующий а.о. заменялся на его биоизостер, димеризацию проводили по С-концам с помощью олигометилендиаминового спейсера.

Дипептидные миметики отдельных петель NGF и BDNF были активны

*in vivo* при системном введении, включая пероральное, в дозах 0,1–5 мг/кг и обладали разными наборами фармакологических эффектов (нейропротекторный, антидепрессантоподобный, мнемотропный, антидиабетический, про- или антиноцицептивный) из спектра биологических функций соответствующего нативного нейротрофина [67].

Для наиболее фармакологически активных и интересных соединений, миметика NGF ГК-2 и миметика BDNF ГСБ-106, было показано, что они не обладают основными нежелательными побочными эффектами, характерными для полноразмерных нейротрофинов, а именно не вызывают увеличения болевой чувствительности, не способствуют снижению массы тела, не обладают просудорожной и канцерогенной активностью. Фармакокинетические исследования показали, что ГК-2 и ГСБ-106 при системном введении проникают через ГЭБ и определяются в головном мозге [97, 204].

В продолжение этих исследований были сконструированы и синтезированы димерные дипептидные миметики NT-3. Дизайн миметиков основывался на кристаллической структуре нейротрофина. Наиболее экспонированной и, следовательно, доступной для взаимодействия с рецептором является 4-я петля NT-3, фрагмент которой - Ser<sup>91</sup>-Glu<sup>92</sup>-Asn<sup>93</sup>-Asn<sup>94</sup>-Lys<sup>95</sup>-, содержащий в своей структуре поворотные участки, предположительно занимает геометрически наиболее выгодное для взаимодействия с рецептором положение. При конструировании дипептида ГТС-301 сохраняли дипептидный фрагмент -Asn<sup>93</sup>-Asn<sup>94</sup>-, как центральный фрагмент бета-поворот-подобного участка, предшествующий а.о. Glu<sup>92</sup> заменяли на его биоизоостер – остаток янтарной кислоты. Дипептид ГТС-302 конструировали на основе фрагмента -Glu<sup>92</sup>-Asn<sup>93</sup>-, а дипептид ГТС-305 на основе фрагмента -Asn<sup>94</sup>-Lys<sup>95</sup>-, сдвинутых соответственно на один а.о. влево и вправо относительно -Asn<sup>93</sup>-Asn<sup>94</sup>- (Рисунок 5). Предшествующие а.о. остатки, Ser<sup>91</sup> и Asn<sup>93</sup>, заменяли на их биоизоостеры, соответственно остаток гамма-оксимасляной кислоты и моноамид янтарной кислоты. Димерную

структуру нейротрофина воспроизводили с помощью гексаметилендиаминового спейсера по С-концу.

Таким образом, были сконструированы димерные 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, приоритет 05.04.2022) [3, 171].

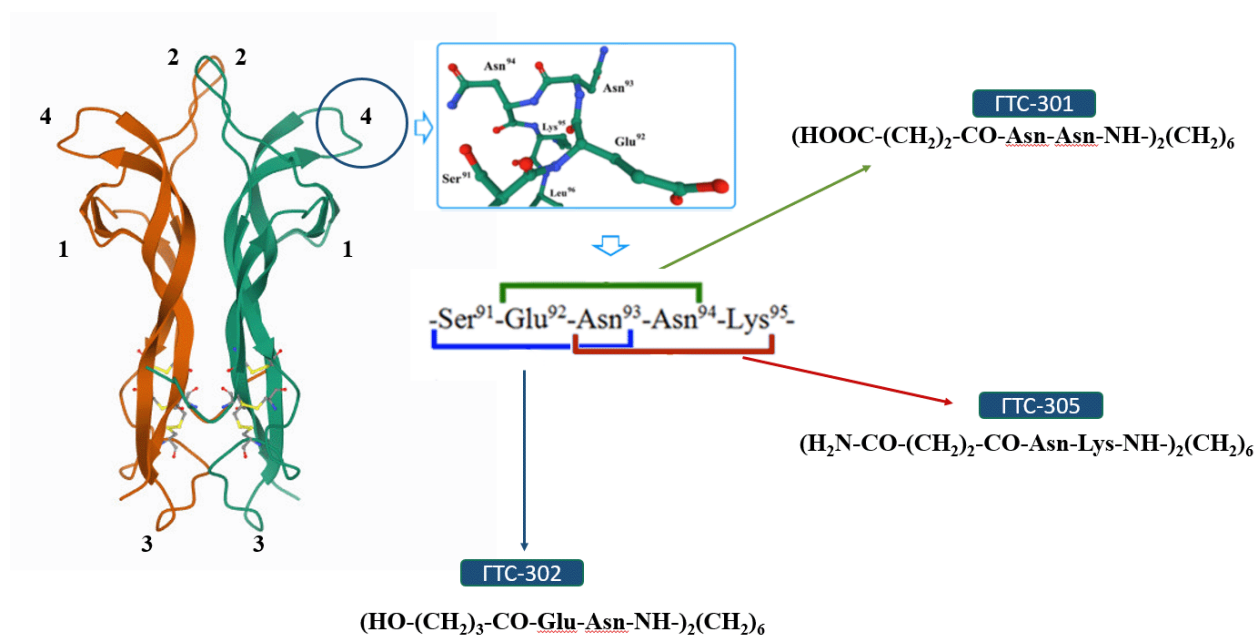


Рисунок 5 – Конструирование дипептидных миметиков 4-й петли NT-3

Также были сконструированы 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.

Все миметики были синтезированы методами классического пептидного синтеза в растворе с использованием Z/tBu-стратегии защитных групп с использованием активированных пентафторфениловых и сукцинимидных эфиров, пептидную цепь наращивали с С-конца [171].

На примере дипептидов ГТС-301 и ГТС-302 в экспериментах *in vitro* с помощью Вестерн-блот анализа было показано, что они активируют подобно

полноразмерному NT-3 TrkC и в меньшей степени TrkB рецепторы, но, в отличие от нативного нейротрофина, не активируют TrkA [3, 171]. Интересно отметить, что для ГТС-301 и ГТС-302 выявлена разная картина активации пострецепторных сигнальных каскадов: в то время как ГТС-302 активировал PI3K/Akt, MAPK/ERK и PLC- $\gamma$  каскады, ГТС-301 активировал только MAPK/ERK и PLC- $\gamma$  [4].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Реактивы

Димерные дипептидные миметики ГТС-301 (и его LD, DL и DD стереоизомеры), ГТС-302, ГТС-305, ГТС-303 и ГТС-321 были получены в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», как описано в патенте РФ № 2800369 С1. (приоритет 05.04.2022 г.). **ГТС-301** (гексаметилендиамид бис-(N-моно-сукцинил-L-аспарагинил-L-аспарагина)): м.м. = 772.77;  $[\alpha]^{22D} = -20,2^\circ$  (c=1, DMSO), т.пл. = 214 - 229°C; **ГТС-302** (гексаметилендиамид бис(N-γ-оксибутирил-L-глутамил-L-аспарагина)): м.м. = 774.81;  $[\alpha]^{22D} = -7,76^\circ$  (c=1, DMSO), т.пл. = 173 - 178°C; **ГТС-305** (гексаметилендиамид бис-(N-моносукциниламид-L-аспарагинил – L-лизина)): м.м.= 798.94;  $[\alpha]^{25D} = -21,74^\circ$  (c=1, DMSO); **ГТС-303** (гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-лизил-L-гистидина)): м.м. = 1088.05;  $[\alpha]^{23D} = -21,6^\circ$  (c=1, H<sub>2</sub>O); **ГТС-321** (гексаметилендиамид бис-(N-оксибутирил-глицил-L-аспарагина)): м.м. = 630.7;  $[\alpha]^{24D} = -9,6^\circ$  (c=1, DMSO).

Дипептиды ГТС-302 и ГТС-303 растворяли в дистиллированной воде. Дипептиды ГТС-301, ГТС-305 и ГТС-321 ввиду их плохой растворимости в воде суспензировали в 1% растворе Tween-80. В качестве контроля использовали соответственно дистиллированную воду или 1% раствор Tween-80.

При изучении антидепрессантоподобной активности в качестве препарата сравнения использовали амитриптилин (раствор для внутривенного и внутримышечного введения, Московский эндокринный завод, Россия), который разводили дистиллированной водой и вводили в/б или перорально в дозе 10 мг/кг.

При изучении мнемотропной активности в качестве препарата сравнения использовали пирацетам (фармацевтическая субстанция, Олайнфарм, Латвия), который растворяли в дистиллированной воде и вводили в/б в дозе 200 мг/кг.

Для введения крыс в наркоз использовали хлоралгидрат (PanReac Applichem, США), который растворяли в физ. растворе и вводили в/б в дозе 350 мг/кг.

Объемы введения составляли 2 мл на 1 кг веса крыс (кроме раствора хлоралгидрата, который вводили в объеме 7 мл на 1 кг массы тела крыс), 10 мл на 1 кг веса мышей при в/б введении, 5 мл на 1 кг веса мышей при пероральном введении.

Для проведения Вестерн-блот анализа использовались следующие реактивы: лизирующие буферы: цитоплазматический (10 мМ HEPES pH 7.6, 60 мМ KCL, 1мМ ЭДТА, 0,075% NP-40, 1 мМ дитиотреитол; 1 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1мМ AEBSF, 60 мкг/мл апротинин, 10 мкг/мл леупептин, 1мкг/мл пепстатин А); ядерный (50 мМ Tris-HCl pH 7.8, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА) 1% тритон X-100, 0,5% Na дезоксихолат, 0,1% SDS, 10% глицерин, 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1мМ AEBSF, 60 мкг/мл апротинин, 10 мкг/мл леупептин, 1мкг/мл пепстатин А), содержащий смесь протеаз: пепстатин, бестатин, лейпептин и апротинин (Sigma-Aldrich, США); буферный раствор (50 мМ трис-HCl, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 1 мМ ДТТ, 1% тритон X-100, 0,5% Na-деоксихолат, 0,1 % СДС, 10% глицерол, 1 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; pH = 7,8); буфер для пробоподготовки белков (sample buffer) (0,25 М Tris-HCl pH 6.8, 40% глицерол, 8% SDS, 30 мМ дитиотреитол, 0,02% Bromphenol blue); первичные антитела к синаптофизину (BD bioscience, США ), бета-актину (Abcam, США), CREB (Cell Signaling, США), PSD-95 (ELK biotech, США) и BDNF (Invitrogen, США); вторичные козы антитела против IgG кролика (Abcam, Великобритания) и вторичные козы антитела против IgG мыши (BD bioscience, США), конъюгированные с пероксидазой хрена (BD bioscience,

США); трис-буфер, содержащий 1% твина 20 (TBST); реагенты-усилители хемилюминесценции (ECL-реагент, Thermo, США); реактив Фолина.

## 2.2 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 Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств», межгосударственными стандартами серии «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33216-2014 (Приложение А к Европейской конвенции о защите Позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS N 123)). Проведение экспериментов было одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

В экспериментальные группы отбирались только здоровые животные без признаков отклонений внешнего вида. Группы формировались методом случайного отбора с использованием массы тела в качестве ведущего признака.

Число животных в группе определялось как необходимое и достаточное для достижения статистической мощности на основе предыдущих исследований с использованием соответствующих линий и популяций животных, тестов и моделей. В большинстве экспериментов группы формировались из 9-11 животных. В исследованиях с моделированием ишемического инсульта в связи с гибелью 10-30% животных (в зависимости от популяции и исходной массы) группы формировались из 10-15 животных.

## 2.3 Поведенческие тесты

### 2.3.1 Тест вынужденного плавания

Данный тест [143] является наиболее распространенным для выявления соединений с антидепрессантоподобной активностью, поскольку чувствителен к действию антидепрессантов с разным механизмом действия и обладает высокой прогностической валидностью [195]. В основе метода лежит наблюдение, что мышь, помещенная в ситуацию неизбежного плавания, в конце концов перестает совершать попытки выбраться и принимает характерную позу иммобильности (отказ от активно-оборонительного и исследовательского поведения), что интерпретируется как отчаяние [144].

Тест проводили на мышах BALB/c по модифицированной методике с двумя сессиями плавания [14]. Для проведения теста использовали установку в стандартной конфигурации (ООО «НПК Открытая наука» Россия), представляющую собой 5 цилиндров, выполненных из прозрачного пластика, высотой 30 см и диаметром 10 см, между которыми установлены непрозрачные перегородки из черного пластика. Позади цилиндров в качестве фона была установлена черная пластиковая панель.

Цилиндры заполняли водой температурой 22-23°C на 2/3 высоты – уровень, при котором животные не имеют возможности опираться на дно

цилиндра лапами или хвостом. Животных помещали в цилиндры с водой на 10 мин. Через 24 ч проводили тестовую посадку – животных повторно помещали в те же условия на 5 мин. Миметики NT-3 вводили в/б или перорально однократно, через 1 ч после первой сессии плавания, или в течение 7 дней, и через 24 ч после последнего введения проводили первую сессию плавания. В качестве препарата сравнения использовали классический антидепрессант amitriptilin, который вводили по той же схеме в дозе 10 мг/кг, в/б или перорально. Доза amitriptilina выбрана на основании литературных данных [9]. Контрольные животные получали дистиллированную воду. Поведение животных в тестовую посадку регистрировали при помощи видеокамеры. Обработку видеоданных осуществляли с помощью программы RealTimer (ООО «НПК Открытая наука», Москва, Россия). Регистрировали суммарное время сохранения животными позы иммобильности. Снижение суммарного времени иммобильности рассматривалось как показатель антидепрессивной активности.

### *2.3.2 Тест на двигательную активность*

Для исключения стимулирующей активности исследуемых соединений, которая может снижать время иммобильности у животных в тесте вынужденного плавания, было изучено их влияние на двигательную активность. Тест проводили на мышах-самцах линии BALB/c. Двигательную активность животных оценивали в инфракрасном актиметре Panlab (Испания) с программным обеспечением ActiTrack. Мышей по двое помещали в противоположные секторы актиметра и на протяжении 5 мин регистрировали их двигательную активность в условных единицах (у.е.)

Миметики NT-3 вводили в/б остро за 24 ч до теста в дозах, при которых они проявляли наиболее выраженный эффект в тесте вынужденного плавания

при остром или субхроническом режимах введения. Животные из контрольной группы получали дистиллированную воду в/б.

### *2.3.3 Тест на предпочтение раствора сахарозы*

Данный тест [76] использовали для оценки агедонии, одного из основных симптомов депрессивно-подобного состояния. Известно, что формирование депрессивно-подобного состояния у грызунов сопровождается снижением их предпочтения раствора сахарозы в воде [40, 76, 153]. Введение антидепрессантов способствует восстановлению интереса животных к раствору сахарозы [202]. Тестирование проводили на мышах-самцах линии С57В1/6. Мышей рассаживали индивидуально и предоставляли им в течение 18 ч свободный доступ к двум поилкам одновременно, одна из которых содержала 1%-й раствор сахара, а другая — обычную воду (тест 1). Затем мышей подвергали пищевой и питьевой депривации на 4 ч, после чего мышам снова предоставляли на 18 ч доступ к двум поилкам с водой и раствором сахара, меняя их местами (тест 2). Потребление воды и раствора сахара оценивали путем взвешивания поилок до и после теста. Предпочтение раствора сахара вычисляли по следующей формуле:

Предпочтение =  $M_{\text{потреблённого р-ра сахарозы}} / (M_{\text{потреблённого р-ра сахарозы}} + M_{\text{потреблённой воды}}) \times 100\%$ , где М – масса.

### *2.3.4 Тест распознавания нового объекта*

Тест распознавания объекта основан на естественном стремлении грызунов исследовать новые объекты [53] и широко используется для оценки кратковременной и долговременной памяти у животных [15].

Тест проводили на крысах-самцах линии Wistar. Тестирование проводилось в клетках Т4 с настилом из древесных опилок, аналогичных клеткам, в которых животные содержались на протяжении эксперимента. В ходе теста в клетки помещали объекты трех разных типов, отличавшиеся друг от друга цветом, формой и материалом, но обладавшие приблизительно одинаковым размером: емкости с водой в форме прямоугольного параллелепипеда из прозрачного бесцветного полипропилена с бело-синей этикеткой и зеленой пластиковой крышечкой (высота 18 см, основание 5×6 см), бутылочки из бесцветного прозрачного стекла вытянутой формы с оранжевой жидкостью (высота 16.5 см, диаметр 6 см в нижней части) и герметичные сине-серебристые жестяные банки цилиндрической формы с жидкостью (высота 12 см, диаметр 6.5 см).

Эксперимент был разделен на 4 фазы: адаптация, ознакомление, тест на кратковременную память и тест на долговременную память.

Для адаптации животных помещали в установку на 4 мин. Сразу после этого в ближайшие два угла установки помещали два одинаковых объекта и давали животным 4 мин на их изучение (фаза ознакомления). После ознакомления с объектами животных возвращали в домашние клетки.

Тесты на кратковременную (Тест 1) и долговременную (Тест 2) память проводили соответственно через 1 ч и 24 ч после фазы ознакомления. Для этого животных вновь помещали в установку, где в тех же углах уже находились два разных объекта: знакомый, использовавшийся в фазу ознакомления, и новый. Для исключения влияния предпочтения животными какого-либо из объектов разным крысам предъявляли разные типы объектов в качестве знакомых и незнакомых. Позиции знакомого и нового объектов (правый и левый угол) меняли от животного к животному. Перед каждым тестом объекты протирали спиртом для уничтожения меток, оставленных предыдущим животным.

Схематично тест представлен на рисунке 6.

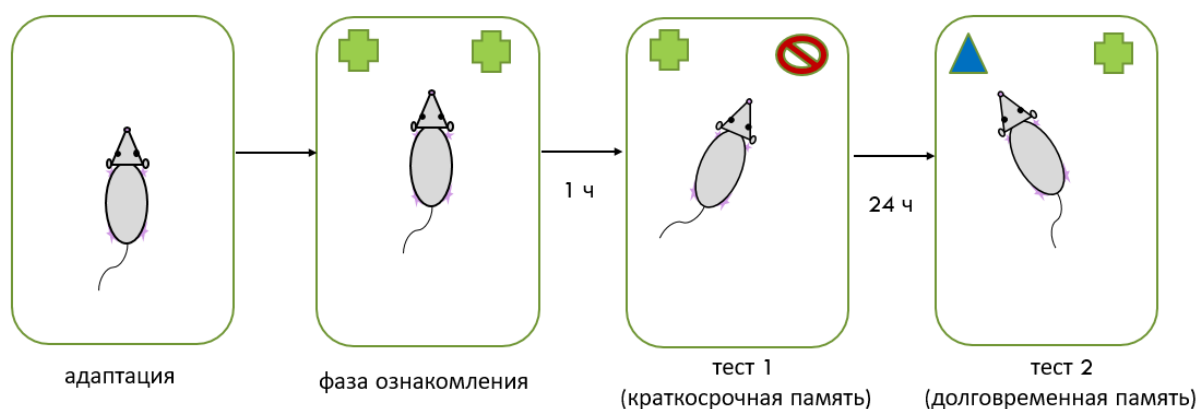


Рисунок 6 – Тест распознавания нового объекта

Исследуемые дипептиды вводили однократно в/б, за 24 ч до ознакомления крыс с объектами. В качестве препарата сравнения использовали классический ноотроп пирацетам, который вводили в дозе 200 мг/кг [53]. Контрольные животные получали дистиллированную воду в/б за 24 ч до теста.

В ходе проведения эксперимента поведение животных фиксировалось с помощью видеокамеры. Обработку видеоданных проводили с помощью программы RealTimer (ООО «НПК Открытая наука», Москва, Россия). Регистрировали время исследования животными каждого из объектов. Исследованием считали обнюхивание, когда нос животного находился на расстоянии не более 2 см от объекта. Животные, которые исследовали объекты на этапе ознакомления или на этапе тестирования менее 10 секунд, исключались из эксперимента.

В качестве показателей кратковременной и долговременной памяти использовали коэффициенты дискриминации – КД [15], которые рассчитывали по формуле:

$$\text{КД} = (T_{\text{нов}} - T_{\text{зн}}) / (T_{\text{нов}} + T_{\text{зн}}), \text{ где}$$

$T_{\text{нов}}$  – время исследования нового объекта,  $T_{\text{зн}}$  – время исследования знакомого объекта. Значения  $\text{КД} > 0$  означают, что животное помнит знакомый объект.

### 2.3.5 Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Данный тест основан на врожденном предпочтении грызунами закрытых пространств открытым и на конфликте исследовательского поведения и страха в условиях незнакомой обстановки, что способствует подавлению их активности на открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) [103, 140]. Тест проводили на мышах-самцах BALB/c. Использовали стандартную конфигурацию ПКЛ: длина открытых и закрытых рукавов составляла 30 см, ширина – 5 см, высота стенок закрытых рукавов – 15 см, высота бортиков открытых рукавов – 0,25 см. Площадь центральной арены составляла 5 × 5 см. Лабиринт располагался на высоте 50 см от пола. Пол и стенки лабиринта были выполнены из серого непрозрачного ПВХ. Миметики NT-3 вводили в/б за 30 мин до теста. Контрольные животные получали в том же режиме дистиллированную воду. Мышь аккуратно помещали в центр установки носом в произвольном направлении и в течение 4 мин проводили видеорегистрацию поведения. Обработку видеоданных осуществляли с помощью программы RealTimer (ООО «НПК Открытая наука», Москва, Россия). Показатели «время в открытых рукавах» и «число заходов в открытые рукава», сравнивали помимо абсолютных значений в относительных единицах (в %), которые рассчитывали по формулам:

$$t_{\text{о.р.}, \%} = t_{\text{о.р.}} / (t_{\text{о.р.}} + t_{\text{з.р.}}) \times 100\%,$$

где  $t_{\text{о.р.}, \%}$  - относительное время в открытых рукавах, %;

$t_{\text{о.р.}}$  - время в открытых рукавах, с;

$t_{\text{з.р.}}$  - время в закрытых рукавах, с;

$$n_{\text{о.р.}, \%} = n_{\text{о.р.}} / (n_{\text{о.р.}} + n_{\text{з.р.}}) \times 100\%,$$

где  $n_{\text{о.р.}, \%}$  - относительное число заходов в открытые рукава, %;

$n_{\text{о.р.}}$  – число заходов в открытые рукава;

$n_{\text{з.р.}}$  – число заходов в закрытые рукава;

### *2.3.6 Тест нормобарической гипоксии с гиперкапнией*

Исследования проводили на мышах-самцах линии BALB/c согласно Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [8]. Данный тест [151] является наиболее простым методом выявления противогипоксической активности исследуемых соединений. Мышей помещали поодиночке в герметически закрывающиеся банки объемом 250 см<sup>3</sup>. Регистрировали время выживания животных в условиях гипоксии.

Дипептиды ГТС-301 и ГТС-302 вводили мышам в/б за 24 ч до теста. Контрольные животные получали в том же режиме дистиллированную воду.

## **2.4 Экспериментальные модели**

### *2.4.1 Модель ишемического инсульта, индуцированного окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА)*

#### 2.4.1.1 Моделирование ОСМА

Моделирование ишемического инсульта осуществляли путем внутрисосудистого перекрытия средней мозговой артерии при помощи монофиламента [123]. Выбор данной модели обусловлен тем, что она является широко изученной, валидированной и хорошо воспроизводимой [109]. Кроме того, этиологически и патогенетически она наиболее близка к самому распространенному в клинике типу инсульта, вызываемого тромбозом бассейна средней мозговой артерии.

Все хирургические манипуляции осуществлялись с помощью титановых микрохирургических инструментов. Животных вводили в наркоз с помощью

5%-го раствора хлоралгидрата в физ. растворе (350 мг/кг, в/б). Производили срединный разрез в вентральной области шеи и выделяли с правой стороны сонный треугольник, образованный сверху двубрюшной мышцей, латерально – грудино-ключично-сосцевидной мышцей и медиально – грудино-подъязычной мышцей. Затем грудино-подъязычную и грудино-подъязычно-сосцевидную мышцы рассекали, для того чтобы открыть доступ к общей сонной артерии. Осторожно отделяли от сонной артерии блуждающий нерв и временно накладывали микрохирургическую сосудистую клипсу на 1,5 см ниже ее бифуркации. Далее аккуратно выделяли из тканевых спаек внешнюю и внутреннюю сонные артерии. Внешнюю сонную артерию необратимо перекрывали при помощи хлопчатобумажной нити на расстоянии 0,5 см от бифуркации. Затем изолировали крылонебную артерию от сопутствующих тканей и коагулировали ее электрокаутером для предотвращения чрезмерного кровотечения. На внутреннюю сонную артерию временно накладывали викриловую нить и неплотно затягивали, после чего перерезали внешнюю сонную артерию проксимальнее наложения хлопчатобумажной нити. Через образовавшуюся после разреза культю проводили монофиламент, представлявший собой нейлоновую нить диаметром 0,25 мм, которая на 2/3 длины была покрыта силиконом. Ослабляли узел викриловой нити на внутренней сонной артерии и продвигали монофиламент по сосуду на расстояние 19-21 мм от бифуркации до перекрытия средней мозговой артерии, после чего фиксировали его микрососудистой клипсой. Время перекрытия средней мозговой артерии составляло 60 мин, по истечению которых монофиламент аккуратно медленно извлекали из сосуда, разрез внешней сонной артерии закрывали путем коагуляции электрокаутером до полной герметичности. Внутреннюю сонную артерию освобождали от викриловой нити, а ствол общей сонной артерии – от микрососудистого зажима, что приводило к полной реперфузии.

Ложнооперированные животные подвергались тем же хирургическим манипуляциям, за исключением перерезания внешней сонной артерии и

введения монофиламента. Срединный разрез шеи зашивали хлопчатобумажной нитью и обрабатывали стрептоцидом. Температуру тела животных во время операции и до выхода из наркоза поддерживали на уровне 37°C при помощи согревающего коврика.

#### 2.4.1.2 Регистрация неврологического дефицита

Неврологический статус животных оценивали при помощи модифицированного теста стимулирования конечностей [87]. Данный тест состоит из серии испытаний, заключающихся в оценке ответа передних и задних конечностей крысы на тактильную и проприоцептивную стимуляцию:

1) Крысу держали на весу так, чтобы только ее передние лапы опирались о край стола, после чего каждую из лап поочередно сталкивали с края стола. В норме животное должно вернуть лапу в исходное положение.

2) Крысу держали на весу так, чтобы только ее передние лапы опирались о край стола, при этом ее голову приподнимали за подбородок вверх, чтобы исключить для неё возможность видеть край стола и передние лапы, а также исключить контакт между её вибриссами и столом, после чего каждую из лап поочередно сталкивали со стола.

3) Крысу помещали боком на край стола и сталкивали с него поочередно сначала переднюю, а затем заднюю лапу. В норме животное должно вернуть конечность в исходное положение. Затем данное испытание повторяли для второй стороны тела.

4) Крысу держали на весу за хвост и медленно и аккуратно опускали на горизонтальную поверхность. В норме животное должно вытянуть передние лапы, стремясь коснуться ими поверхности;

5) Крысу помещали на край стола мордой по направлению к краю и осторожно подталкивали сзади. В норме животное должно сопротивляться давлению и упираться обеими передними лапами.

Оценка прохождения испытаний животным проводилась следующим образом:

2 балла – крыса выполнила испытание полностью и без задержки;

1 балл – крыса выполнила испытание не полностью или с задержкой не более 2 с;

0 баллов – крыса не выполнила испытание.

#### 2.4.1.3 Определение объема ишемического повреждения

Объем ишемического повреждения оценивали с помощью морфометрии срезов мозга, окрашенных 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом (ТТХ). Животных вводили в глубокий наркоз при помощи в/б введения 5% раствора хлоралгидрата (350 мг/кг), после чего декапитировали. Головной мозг извлекали при температуре 0 - 4°C и помещали на 1 мин в емкость с физраствором для того, чтобы отмыть от крови. Мозг помещали на 12 мин в морозильную камеру при -20°C. Затвердевший мозг затем помещали в специальную форму с пазами для микротомных лезвий, обеспечивающих точную нарезку образца, и разрезали на 5 фронтальных срезов толщиной 1,7 мм. Полученные срезы помещали в чашку Петри с 2% раствором ТТХ в фосфатно-солевом буфере и инкубировали при температуре 37°C в термостате в течение 15 мин, после чего переворачивали и инкубировали ещё 15 мин. Затем срезы извлекали из раствора ТТХ и помещали для фиксации в 10% раствор формалина на 30 мин. После фиксации срезы промокивали хлопчатобумажным полотенцем, чтобы избавиться от избытка раствора, и помещали на предметные стекла. Полученные препараты сканировали с двух сторон с помощью планшетного сканера в разрешении 2400 dpi в режиме

цветного изображения. Площадь инфаркта (неокрашенная область) измеряли с помощью свободно распространяемой программы «Image J» (National Institutes of Health, США).

Объем инфаркта рассчитывали по формуле:

$$V=d \times \Sigma A_i / 2,$$

где  $\Sigma A_i$  - сумма площадей области повреждения на срезах мозга с каждой из сторон,  $d$ - толщина среза.

Для исключения погрешностей измерения, связанных с отеком или атрофией ткани в ишемизированном полушарии, определяли также относительный объем инфаркта мозга по следующей формуле:

$$V = [(V_{in} \times (V_c / V_i)) / V_c] \times 100\%,$$

где  $V_{in}$  – объем инфаркта мозга,  $V_i$  – объем ипсилатерального полушария,  $V_c$  – объем контралатерального полушария.

#### *2.4.2 Модель депрессивно-подобного состояния, индуцированного социальным стрессом*

Выбор данной модели обусловлен тем, что она обладает высоким уровнем прогностической (то есть реакцией на терапию антидепрессантами) валидности, хорошо изучена, близка по своей патофизиологической природе к депрессивным расстройствам человека, поскольку большинство факторов риска развития депрессии у людей носят социальный характер [92]. В эксперименте использовали мышей-самцов линии C57BL/6.

Депрессивно-подобное состояние у мышей моделировали с помощью хронического социального стресса, вызванного многократным опытом поражений в ежедневных конфронтациях между самцами, как описано [81]. Животных помещали по две особи в пластиковые клетки размером 28×14×10 см, разделенные вдоль перфорированной перегородкой из прозрачного пластика, при этом у животных сохранялся зрительный и сенсорный контакт

при отсутствии возможности физического взаимодействия. На третьи сутки и далее ежедневно в одно и то же время на протяжении 10 дней перегородку убирала на 10 мин, обеспечивая возможность физического контакта между животными. В результате происходило распределение ролей «агрессора» и «жертвы» между грызунами. «Жертву» идентифицировали как обороняющегося, не нападающего самца, занимающего характерную «покорную» позу, и помечали ее. Каждые 2–3 дня производили ротацию «жертв», пересаживая их в клетки к незнакомым «агрессорам», тем самым усиливая влияние стрессового фактора. В случае чрезмерной агрессии по отношению к жертве (продолжающиеся укусы даже после того, как «жертва» продемонстрировала позу «покорности») перегородку возвращали на место до истечения 10 мин, тем самым прекращая конфронтацию. Поскольку не во всех парах мышей происходили активные конфронтации, не все мыши «жертвы» ежедневно подвергались атакам «агрессора», несмотря на ротацию «жертв». В эксперимент были включены только те «жертвы», которые подвергались ежедневному социальному стрессу.

Для регистрации депрессивно-подобного состояния и выявления эффектов дипептидных миметиков NT-3 использовали тест предпочтения раствора сахарозы. После окончания тестирования определяли с помощью Вестерн-блот анализа содержание синаптических маркеров (синаптофизин, PSD-95) и маркеров нейропластичности (CREB, BDNF) в гиппокампе мышей.

## **2.5 Вестерн-блот анализ**

Эвтаназию мышей осуществляли путем цервикальной дислокации, после чего производили декапитацию животного. Головной мозг извлекали при температуре 0 - 4°C и выделяли из обоих полушарий гиппокамп, который затем замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

После размораживания гиппокампы животных одной группы объединяли в пробы так, чтобы количество проб было не меньше трех. Затем пробы гомогенизировали при температуре 4°C в стеклянном гомогенизаторе с лизирующим буфером (50 mM трис- HCl, 5 mM ЭДТА, 1 mM дитиотреитола, 1% тритона X-100, pH 7,5), который добавляли в соотношении ткань: буфер = 1:5 (вес/буфер). Перед этим в лизирующий буфер добавляли коктейли ингибиторов протеаз и фосфатаз из расчета 10 мкл коктейля на 1 мл лизис-буфера. Полученную гомогенную жидкость аккуратно отбирали из гомогенизатора с помощью пипетки и переносили в эппендорф. Пробы центрифугировали 30 мин при 14000 об/мин и температуре 4°C. Полученный супернатант аккуратно отбирали из эппендорфов с помощью пипетки, стараясь не задеть осадок, который далее использовали для получения ядерной фракции. Для этого к осадку добавляли 250 мкл ядерного лизис-буфера (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА, 1% тритон X-100, 0,5% Na дезоксихолат, 0,1% SDS, 10% глицерин, 1 mM дитиотреитол, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM AEBSF, 60 мкг/мл апротинин, 10 мкг/мл леупептин, 1 мкг/мл пепстатин А), предварительно смешанного с коктейлями ингибиторов протеаз и фосфатаз из расчета 10 мкл коктейля на 1 мл лизис-буфера, и перемешивали на мешалке. Центрифугирование проводили в два этапа: сначала в течение 20 мин при 14000 об/мин и температуре 4°C, после чего эппендорфы извлекали из центрифуги для того, чтобы перемешать их содержимое при помощи мешалки. Затем продолжали центрифугировать еще 30 мин при тех же условиях. Полученный супернатант отбирали в чистые эппендорфы, стараясь не задеть осадок. Концентрацию белка в цитоплазматическом и ядерных супернатантах определяли по методу Фолина-Лоури [11]. Для подготовки проб для электрофореза полученные супернатанты разбавляли соответствующими лизис-буферами и смешивали с Sample buffer (SB) (50 mM Tris-HCl pH 6,8) в соотношении супернатант:буфер = 3:1. Полученные пробы инкубировали в термостате при температуре 95°C в течение 10 мин. Пробы, полученные из цитоплазматической фракции, использовали для определения

количества белков PSD-95, синаптофизина и BDNF. Для определения количества CREB и pCREB использовали пробы, полученные из ядерной фракции. В зависимости от определяемого белка пробы разделяли в 10%-м (для PSD-95) или 12%-м (для CREB; pCREB; BDNF) полиакриламидном геле и далее переносили на мембрану из поливинилиденфторида электроэлюцией. Мембраны дезактивировали 3% BSA (бычий альбумин) или 5% (вес/объем) обезжиренным молоком в трис-буфере, содержащим 1% твина 20 (TBST), в течение 1,5 ч. Затем мембраны в течение 10 ч при 4-5°C инкубировали с разведенными в 0,1% р-ре TBST первичными моноклональными антителами против CREB (разведение 1:500), первичными моноклональными антителами против синаптофизина (разведение 1:1000), первичными моноклональными антителами против PSD-95 (разведение 1:500), первичными моноклональными антителами против BDNF (разведение 1:1000). Избыток антител отмывали 0,1% раствором TBST, после чего мембраны инкубировали 2 ч при 4-5°C с моноклональными козьими антителами против IgG кролика (разведение в 0,05% р-ре TBST 1:1000), конъюгированными с пероксидазой хрена. Избыток антител удаляли промывкой мембран в 0,05% р-ре TBST 3 раза по 10 мин. Детектирование белков осуществляли после отмывки от вторых антител в буфере TBST в реакции с реагентами-усилителями хемилюминесценции (ECL-реагенты) с использованием геледокументирующей системы Alliance Q9. Денситометрию полученных изображений проводили с помощью программы GIMP2.

## 2.6 Статистические методы

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 обработки результатов Вестерн-блот анализа не зависимо 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  $p \leq 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Из литературы известно, что NT-3 обладает антидепрессантоподобными свойствами. Антидепрессантоподобная активность NT-3 была выявлена в тестах вынужденного плавания и выученной беспомощности у крыс при его введении в зубчатую извилину гиппокампа [161]. Полагают [124], что эти эффекты могут быть связаны со способностью NT-3 стимулировать моноаминовую нейротрансмиссию [117], а также с вовлеченностью нейротрофина в гиппокампальный нейро- и синаптогенез [141].

Возможную антидепрессантоподобную активность дипептидных миметиков NT-3 выявляли в тесте вынужденного плавания на мышах. Исследуемые соединения (ГТС-301, ГТС-302, ГТС-303, ГТС-305 и ГТС-321) вводили мышам в/б в дозах 1, 5 и 10 мг/кг за 24 ч до теста. Дозы соединений выбраны на основе выявленного ранее для дипептидных миметиков NGF и BDNF соответствия активных доз *in vitro* и *in vivo* [121]. В качестве препарата сравнения использовали классический антидепрессант амитриптилин, который вводили в дозе 10 мг/кг, в/б [9], в том же режиме.

При остром введении миметиков в данном диапазоне доз антидепрессантоподобную активность проявлял только миметик 4-й петли NT-3 дипептид ГТС-302, статистически значимо снижая время иммобильности мышей на 17-22% по сравнению с контролем (Таблица 1).

Соединения ГТС-301, ГТС-305 (миметики 4-й петли NT-3); ГТС-303 (миметик 3-й петли NT-3) и ГТС-321 (миметик 2-й петли NT-3) оказались неактивны в изученном (Таблица 1).

Антидепрессантоподобную активность дипептида ГТС-301 дополнительно выявляли в более низких (0,1 и 0,5 мг/кг) и более высокой (20 мг/кг) дозе. Это связано с тем, что ранее у ГТС-301 была выявлена фармакологическая активность *in vivo* в условиях экспериментального диабета в дозах 0,1 и 0,5 мг/кг [189]. Предполагалось, что антидепрессантоподобная активность ГТС-301 может проявляться в другом диапазоне доз, нежели 1-10 мг/кг. В этих дозах дипептид также оказался неактивным (Таблица 1).

Дополнительно было проведено исследование зависимости антидепрессантоподобного эффекта ГТС-302 в тех же условиях. Дипептид вводили в более низких – 0,1 и 0,5 мг/кг, а также в более высоких дозах – 20 и 50 мг/кг (Таблица 1).

Было установлено, что ГТС-302 в дозе 0,5 мг/кг статистически значимо снижал время иммобильности на 30% по сравнению с контрольной группой (Таблица 1). В дозе 0,1 мг/кг, а также в дозах 20 и 50 мг/кг соединение оказалось неактивным. Таким образом, была выявлена зависимость выраженности антидепрессантоподобного эффекта ГТС-302 от дозы, характерная для регуляторных пептидов (дозозависимый эффект) [91].

Амитриптилин статистически значимо снижал время иммобильности на 41%, что согласуется с литературными данными [144].

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	Количество мышей в группах	Время иммобильности, с	Время иммобильности, % <sup>1</sup>	Активность, % <sup>2</sup>
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	<b>183,6±6,8**</b>	<b>81**</b>	<b>19</b>
ГТС-302 (5 мг/кг)	10	<b>188,9±10,2*</b>	<b>83*</b>	<b>17</b>
ГТС-302 (10 мг/кг)	10	<b>177,8±10,3**</b>	<b>78**</b>	<b>22</b>
<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	<b>113,5±11,2*</b>	<b>70*</b>	<b>30</b>
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	<b>133,0±12,5****</b>	<b>59****</b>	<b>41</b>
<p>Примечание: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.</p> <p><sup>1</sup> Время иммобильности в процентах относительно контрольной группы рассчитывалось по формуле: <math>T_{им, \%} = T_{эксп} / T_{к} \times 100\%</math>, где <math>T_{к}</math> – время иммобильности в контроле, <math>T_{эксп}</math> – время иммобильности в группах мышей, получавших исследуемые соединения или амитриптилин.</p> <p><sup>2</sup> Активность рассчитывалась по формуле: <math>A\% = (T_{к} - T_{эксп}) / T_{к} \times 100\%</math>, где <math>T_{к}</math> – время иммобильности в контроле, <math>T_{эксп}</math> – время иммобильности в группах мышей, получавших исследуемые соединения или амитриптилин.</p> <p>* - <math>p &lt; 0,05</math>; ** - <math>p &lt; 0,01</math>; **** - <math>p &lt; 0,0001</math> по сравнению с контрольной группой (однофакторный ANOVA, тест Даннета).</p>				

Таким образом, было установлено, что в ряду димерных дипептидных миметиков отдельных петель NT-3 антидепрессантоподобной активностью в тесте вынужденного плавания на мышах BALB/c при остром в/б введении обладает только миметик 4-й петли дипептид ГТС-302.

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 [67], и 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 нейротрофина далее не изучались.

Антидепрессантоподобная активность миметиков 4-й петли NT-3 (ГТС-301, ГТС-302, ГТС-305) была изучена при их 7-дневном в/б введении. Дипептид ГТС-302, как и при остром режиме введения, оказался активен во всех исследованных дозах: 1, 5 и 10 мг/кг (Таблица 2), статистически значимо снижая время иммобильности у животных на 34%, 27% и 30% соответственно по сравнению с контрольной группой. Эффект ГТС-302 оказался более выраженным, чем при остром введении (снижение времени иммобильности на 17-22%).

Дипептид ГТС-301 также проявлял антидепрессантоподобную активность при субхроническом введении в дозах 10, 20 и 40 мг/кг, статистически значимо снижая время иммобильности на 22%, 26% и 27% соответственно по сравнению с контрольной группой (Таблица 2). В диапазоне доз 0,1-5 мг/кг ГТС-301 не оказывал статистически значимого влияния на время иммобильности у мышей. Соединение ГТС-305 оказалось неактивным.

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	Количество мышей в группах	Время иммобильности, с	Время иммобильности, % <sup>1</sup>	Активность, % <sup>2</sup>
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	<b>155,5±9,6*</b>	<b>78*</b>	<b>22</b>
<i>Эксперимент 2</i>				
Контроль	9	213,6±10,9	100	0
ГТС-301 (20 мг/кг)	10	<b>159,3±12,7**</b>	<b>74**</b>	<b>26</b>
ГТС-301 (40 мг/кг)	9	<b>156,4±9,0**</b>	<b>73**</b>	<b>27</b>
ГТС-302				
Контроль	11	184,9±6,8	100	0
ГТС-302 (1 мг/кг)	8	<b>122,8±7,0****</b>	<b>66****</b>	<b>34</b>
ГТС-302 (5 мг/кг)	10	<b>134,8±8,5****</b>	<b>73****</b>	<b>27</b>
ГТС-302 (10 мг/кг)	10	<b>129,2±5,2****</b>	<b>70****</b>	<b>30</b>
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	<b>108,5±6,1****</b>	<b>59****</b>	<b>41</b>
<p>Примечание: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.</p> <p><sup>1</sup> Время иммобильности в процентах относительно контрольной группы рассчитывалось по формуле: <math>T_{им, \%} = T_{эксп} / T_{к} \times 100\%</math>, где <math>T_{к}</math> – время иммобильности в контроле, <math>T_{эксп}</math> – время иммобильности в группах мышей, получавших исследуемые соединения или амитриптилин.</p> <p><sup>2</sup> Активность рассчитывалась по формуле: <math>A\% = T_{к} - T_{эксп} / T_{к} \times 100\%</math>, где <math>T_{к}</math> – время иммобильности в контроле, <math>T_{эксп}</math> – время иммобильности в группах мышей, получавших исследуемые соединения или амитриптилин.</p> <p>* - <math>p &lt; 0,05</math>; ** - <math>p &lt; 0,01</math>; **** - <math>p &lt; 0,0001</math> по сравнению с контрольной группой (однофакторный ANOVA, тест Даннета).</p>				

Таким образом, у димерных дипептидных миметиков 4-й петли NT-3 ГТС-301 и ГТС-302 была выявлена антидепрессантоподобная активность при субхроническом в/б введении в тесте вынужденного плавания на мышах в дозах 10, 20, 40 мг/кг и 1, 5, 10 мг/кг соответственно.

Суммируя полученные на данном этапе работы результаты, можно сделать заключение, что в ряду дипептидных миметиков отдельных петель NT-3 антидепрессантоподобную активность проявляли только миметики 4-й петли ГТС-301 и ГТС-302, из которых последний оказался более активным по дозам и был эффективен уже при остром введении. Можно предположить, что различие в активности этих двух соединений объясняется разной картиной активации основных путей трансдукции сигнала TrkC рецепторов, выявленной в экспериментах *in vitro* под руководством в.н.с. лаборатории молекулярной фармакологии Антиповой Т.А. [4]. Так, с помощью Вестерн-блот анализа было установлено, что ГТС-302 активирует все три основные пострецепторных сигнальных каскада TrkC рецепторов - PI3K/Akt,

MAPK/ERK и PLC- $\gamma$ 1, а ГТС-301 только MAPK/ERK и PLC- $\gamma$ 1 [4]. Ранее в результате скрининга по антидепрессантоподобной активности дипептидных миметиков NGF и BDNF, обладающих разной картиной активации пострецепторных сигнальных каскадов Trk рецепторов, было установлено, что для проявления этой активности при остром введении необходима активация всех трех основных каскадов, что было подтверждено фармакологическим ингибиторным анализом [123]. Полученные в настоящем исследовании результаты для дипептидных миметиков NT-3 согласуются с этими данными.

По результатам данного раздела опубликованы

статьи с соавторами:

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. **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;

3. 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;

4. **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;

тезисы с соавторами:

**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.

### 3.2 Изучение антидепрессантоподобной активности ГТС-302 при его пероральном введении

Антидепрессантоподобную активность ГТС-302 в тесте вынужденного плавания при его остром (за 24 ч до теста) пероральном введении изучали в диапазоне доз 0,5-10 мг/кг.

Было установлено, что ГТС-302 сохранял антидепрессантоподобную активность при пероральном режиме введения, статистически значимо снижая время иммобильности в дозах 0,5; 1; 2,5; 5 и 10 мг/кг на 30%, 23%, 28%, 26% и 33% соответственно по сравнению контрольными животными (Таблица 3). Амитриптилин при том же режиме введения снижал время иммобильности на 33-34% по сравнению с контролем.

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

Группа	Количество мышей в группах	Время иммобильности, с	Время иммобильности, % <sup>1</sup>	Активность, % <sup>2</sup>
<i>Эксперимент 1</i>				
Контроль	10	160,8±9,2	100	0

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

По результатам данного раздела опубликованы тезисы с соавторами:

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.

### 3.3 Изучение стереоспецифичности антидепрессантоподобного эффекта ГТС-301

Для дипептида ГТС-301 ранее в экспериментах *in vitro* в лаборатории молекулярной фармакологии под руководством к.б.н. Антиповой Т.А. была установлена стереоспецифичность нейропротекторного действия – активными оказались только LL- и LD- стереоизомеры [7].

В данной работе, для подтверждения стереоспецифичности фармакологической активности ГТС-301, была изучена антидепрессантоподобная активность его LD, DL и DD стереоизомеров при их субхроническом (в течении 7 дней) в/б введении в тесте вынужденного плавания на мышах.

LD-стереоизомер вводили в дозах 10, 20 и 40 мг/кг (в которых был активен ГТС-301 LL). Активными дозами оказались 10 и 20 мг/кг, в которых дипептид снижал время иммобильности мышей на 34% и 24% соответственно по сравнению с контрольной группой (Таблица 4). В дозе 40 мг/кг LD-стереоизомер вызывал выраженную тенденцию ( $p=0,061$ ) к снижению времени иммобильности. DL- и DD- стереоизомеры вводили в дозе 20 мг/кг на основании активных доз LD-стереоизомера. DL- и DD- стереоизомеры оказались неактивными.

Таблица 4 – Стереоспецифичность антидепрессантоподобной активности ГТС-301 при его субхроническом (в течение 7 дней) в/б введении в тесте вынужденного плавания на мышах

Группа	Число мышей в группах	Время иммобильности, с	Время иммобильности, % <sup>1</sup>	Активность, % <sup>2</sup>
<b>ГТС-301 LD</b>				
<i>Эксперимент 1</i>				
Контроль	11	197,7±6,6	100	0
ГТС-301 (LD)	10	<b>134,6±11,6***</b>	<b>68***</b>	<b>34</b>

(10 мг/кг)				
ГТС-301 (LD) (40 мг/кг)	10	<b>157,5±14,6</b>	<b>80</b>	<b>20</b>
<i>Эксперимент 2</i>				
Контроль	10	228,7±6,7	100	0
ГТС-301 (LD) (20 мг/кг)	10	<b>174,6±6,8**</b>	<b>76**</b>	<b>24</b>
Амитриптилин (10 мг/кг)	8	<b>132,7±12,6****</b>	<b>58****</b>	<b>42</b>
<b>ГТС-301 DL</b>				
Контроль	9	138,7±11,7	100	0
ГТС-301 (DL) (20 мг/кг)	10	166,5±6,2	120	-20
<b>ГТС-301 DD</b>				
Контроль	11	197,7±6,6	100	0
ГТС-301 (DD) (20 мг/кг)	9	193,8±13,3	98	2
<p>Примечание: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.  <sup>1</sup> Время иммобильности в процентах относительно контрольной группы рассчитывалось по формуле: <math>T_{им, \%} = T_{эксп} / T_{к} \times 100\%</math>, где <math>T_{к}</math> – время иммобильности в контроле, <math>T_{эксп}</math> – время иммобильности в группах мышей, получавших исследуемые соединения или амитриптилин.  <sup>2</sup> Активность рассчитывалась по формуле: <math>A\% = T_{к} - T_{эксп} / T_{к} \times 100\%</math>, где <math>T_{к}</math> – время иммобильности в контроле, <math>T_{эксп}</math> – время иммобильности в группах мышей, получавших исследуемые соединения или амитриптилин.  ** - <math>p &lt; 0,01</math>; *** - <math>p &lt; 0,001</math>; **** - <math>p &lt; 0,0001</math> по сравнению с контрольной группой (однофакторный ANOVA, тест Даннета).</p>				

Таким образом, было установлено, что антидепрессантоподобная активность ГТС-301 стереоспецифична по N-концевому аспарагину: была показана активность для L,L и L,D-стереоизомеров, при переходе к D,L и D,D-стереоизомерам активность исчезала, что демонстрирует ключевую роль этого аминокислотного остатка во взаимодействии с рецептором. Полученные данные согласуются с результатами исследования нейропротекторной активности стереоизомеров ГТС-301 *in vitro* [7].

По результатам данного раздела опубликованы  
статья с соавторами:

Сазонова, Н. М. Доказательство стереоспецифичности  
цитопротекторного и антидепрессантоподобного действия ГТС-301,

димерного дипептидного миметика 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;

тезисы с соавторами:

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.

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

Антидепрессантоподобная активность ГТС-302 как наиболее активного соединения была изучена на экспериментальной модели депрессии.

Исследование было выполнено на мышах-самцах C57Bl/6, которые выступали как в роли агрессоров, так и в роли жертв. Соединение ГТС-302 вводили в дозе 1 мг/кг, в/б в течение 10 дней стрессирования (группа «Стресс+ГТС-302»). Данная доза была выбрана как наиболее активная при хроническом в/б введении. Животные из группы «Стресс», также подвергавшиеся стрессированию в течение 10 дней, получали дистиллированную воду. Также было 2 группы мышей, не подвергавшихся стрессу, одна из которых получала ГТС-302, а вторая – дистиллированную воду. В группах «Стресс» и «Стресс+ГТС-302» к концу десятидневного периода оставалось по 7 мышей, включенных в эксперимент (против 10 в

группах «Контроль» и «ГТС-302»), поскольку по 3 мыши в каждой из этих групп не подвергались ежедневным атакам со стороны «агрессора» и были исключены из исследования.

После окончания стрессирования и введения ГТС-302 проводили тест предпочтения раствора сахара. Затем животных подвергали эвтаназии, декапитировали, извлекали головной мозг, из которого затем выделяли гиппокамп для дальнейшего определения с помощью Вестерн-блот анализа содержания синаптических белков синаптофизина и PSD-95, а также маркера нейропластичности нейротрофина BDNF, дефицит которого в этой структуре мозга рассматривается как релевантный показатель депрессивно-подобного состояния [28, 99, 223].

Схема эксперимента представлена на рисунке 7.

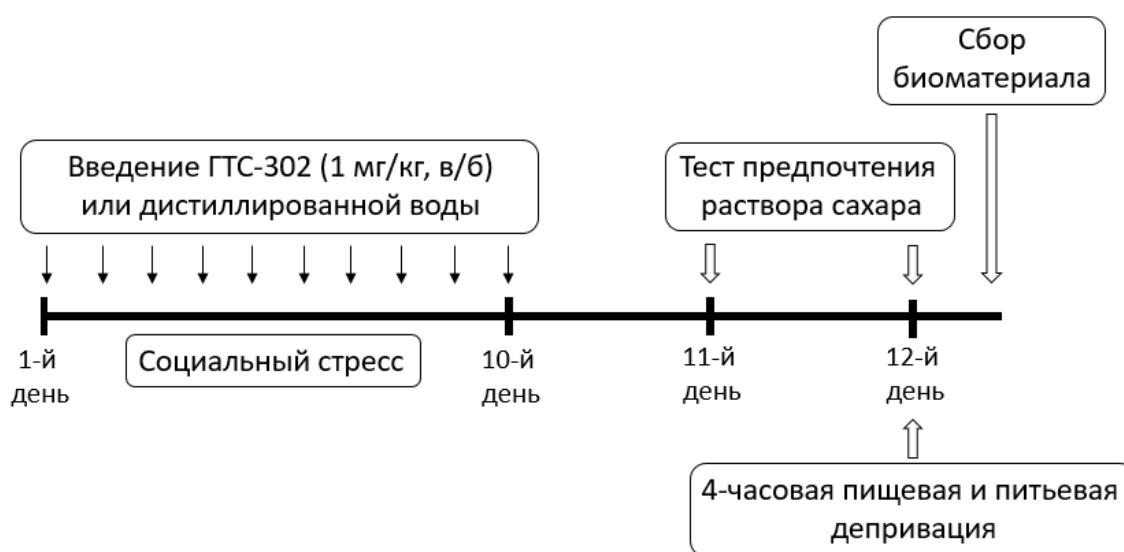


Рисунок 7 – Дизайн исследования антидепрессантоподобной активности ГТС-302 на модели депрессивно-подобного состояния, вызванного социальным стрессом, на мышах

В настоящем исследовании в качестве поведенческого показателя депрессивно-подобного состояния мышей использовалась агедония (снижение способности получать удовольствие), один из ключевых симптомов депрессии, которую выявляли в тесте предпочтения раствора

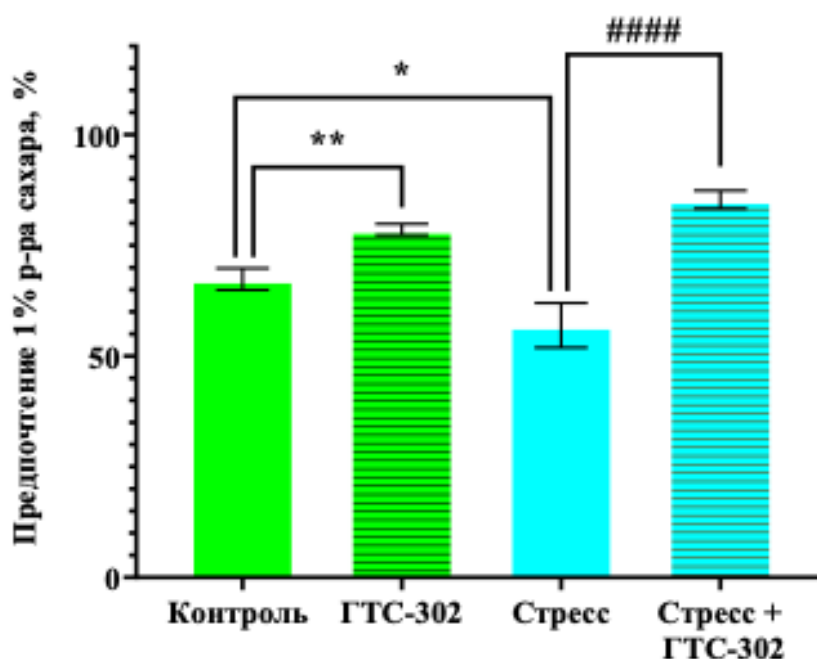
сахара. Критерием агедонии в данном тесте считается предпочтение раствора сахара <65% [153]. Тест проводили сначала без предварительного ознакомления мышей с раствором сахара. В этом случае во всех группах мышей потребление раствора сахара было низким и составляло 50-60% от всей потребленной жидкости (Таблица 10). Согласно литературным данным, такое низкое потребление сладкой жидкости может быть связано с неофобией, страхом животных перед незнакомой субстанцией [145]. В связи с этим тест предпочтения раствора был проведён повторно, первый же тест может рассматриваться как адаптация мышей к раствору сахара. Поскольку перед данным тестом для стимуляции пищевой мотивации [145] часто проводится пищевая и питьевая депривация, мыши были лишены еды и воды на 4 ч перед началом регистрации потребления раствора сахара. В данном случае предпочтение раствора сахара составляло 67,4% в группе контрольных мышей без стресса и было статистически значимо снижено до 56,9% у стрессированных мышей. На этом фоне дипептид ГТС-302 статистически значимо противодействовал развитию агедонии, увеличивая предпочтение раствора сахара до 85,3% (Рисунок 8).

Дипептид ГТС-302 статистически значимо увеличивал потребление раствора сахара и у мышей, не подвергавшихся стрессу. Из литературы известно, что уровень предпочтения раствора сахара отражает не только способность животных испытывать удовольствие, но и запоминание расположения поилки со сладкой водой [181]. Так, было показано, что в процессе длительного доступа мышей к поилкам с водой и раствором сахара количество подходов к поилке со сладкой водой увеличивалось за счет снижения количества «неправильных» выборов [187]. В другом исследовании было установлено, что оптогенетическое ингибирование активности нейронов медиальной префронтальной коры снижает предпочтение раствора сахара у мышей за счет нарушения обучения [181]. Для ГТС-302 ранее было показано стимулирующее влияние как на краткосрочную, так и долговременную память крыс в физиологических условиях. Можно предположить, что увеличение

предпочтения раствора сахара под влиянием ГТС-302 у мышей, не подвергавшихся стрессу, связано с мнемотропными свойствами дипептида. Интересно отметить, что ранее было установлено, что димерный дипептидный миметик BDNF (ГСБ-106) при однократном введении (0,1 мг/кг, перорально) после 10-дневного социального стресса также полностью восстанавливает сниженное предпочтение раствора сахара у мышей, однако не влияет на этот параметр у мышей, не подвергавшихся стрессу. При этом ГСБ-106, в отличие от ГТС-302, не проявлял мнемотропную активность при остром введении в тесте распознавания нового объекта в физиологических условиях.

Предпочтение раствора сахара вычисляли по следующей формуле:

Предпочтение =  $M_{\text{потреблённого р-ра сахарозы}} / (M_{\text{потреблённого р-ра сахарозы}} + M_{\text{потреблённой воды}}) \times 100\%$ , где М – масса.



Примечание: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.

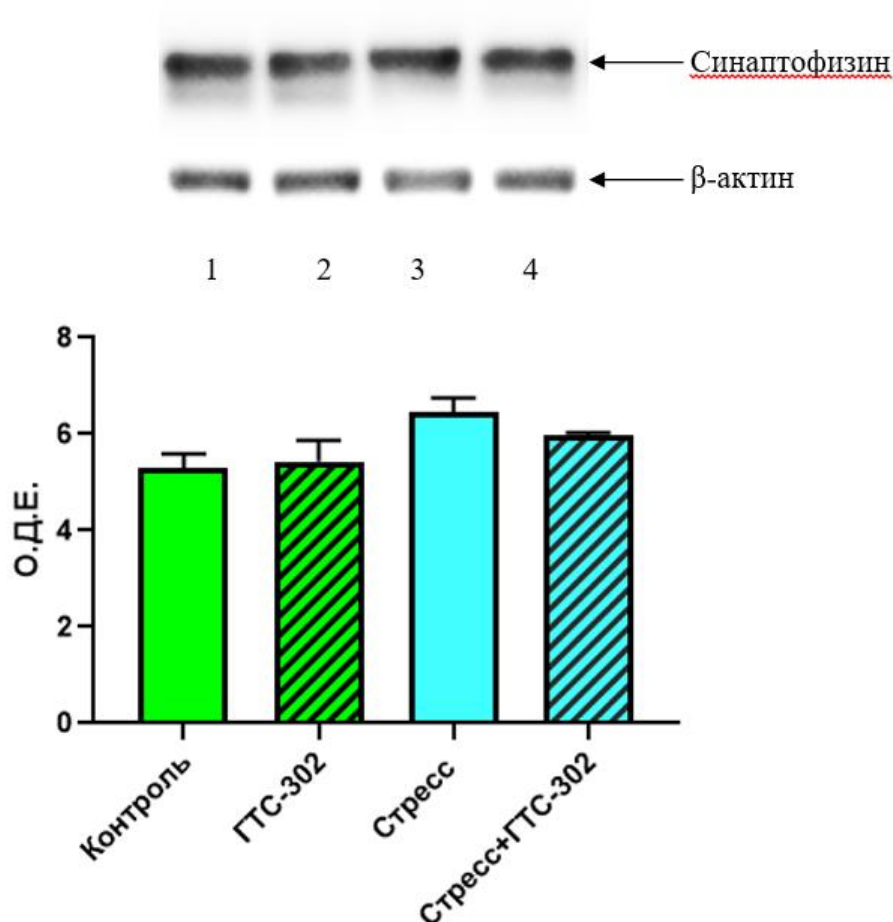
Предпочтение мышами 1% р-ра сахара рассчитывали по формуле:

Предпочтение, % =  $M_{\text{потреблённого р-ра сахара}} / (M_{\text{потреблённого р-ра сахара}} + M_{\text{потреблённой воды}}) \times 100\%$ .

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

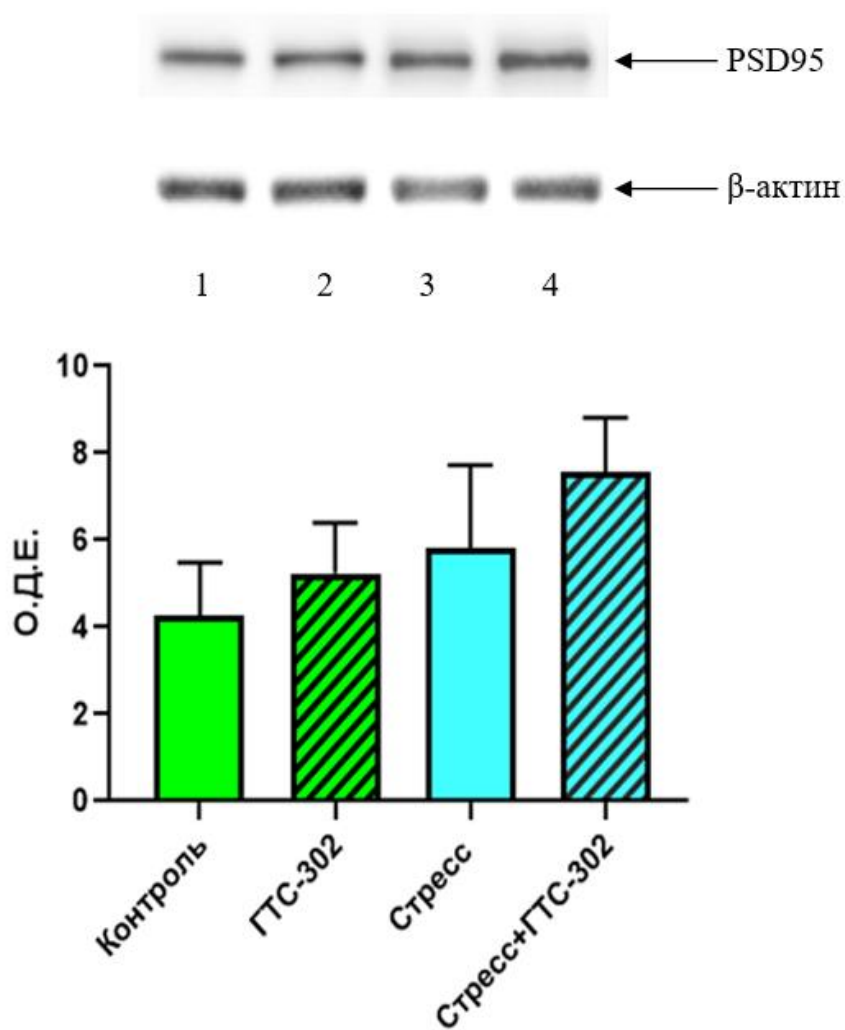
Рисунок 8 - Дипептид ГТС-302 полностью противодействует снижению предпочтения раствора сахара у мышей на модели хронического социального стресса.

Между группами мышей не было выявлено статистически значимых различий по содержанию в гиппокампе синаптических белков синаптофизина и PSD-95 (Рисунок 9, 10). В то же время содержание BDNF в гиппокампе стрессированных мышей было статистически значимо снижено на 18% по сравнению с животными из контрольной группы (Рисунок 11). У мышей, подвергавшихся стрессу и получавших ГТС-302, было статистически значимо увеличено содержание BDNF в гиппокампе по сравнению с группой «Стресс» практически до значений контрольной группы (Рисунок 11).



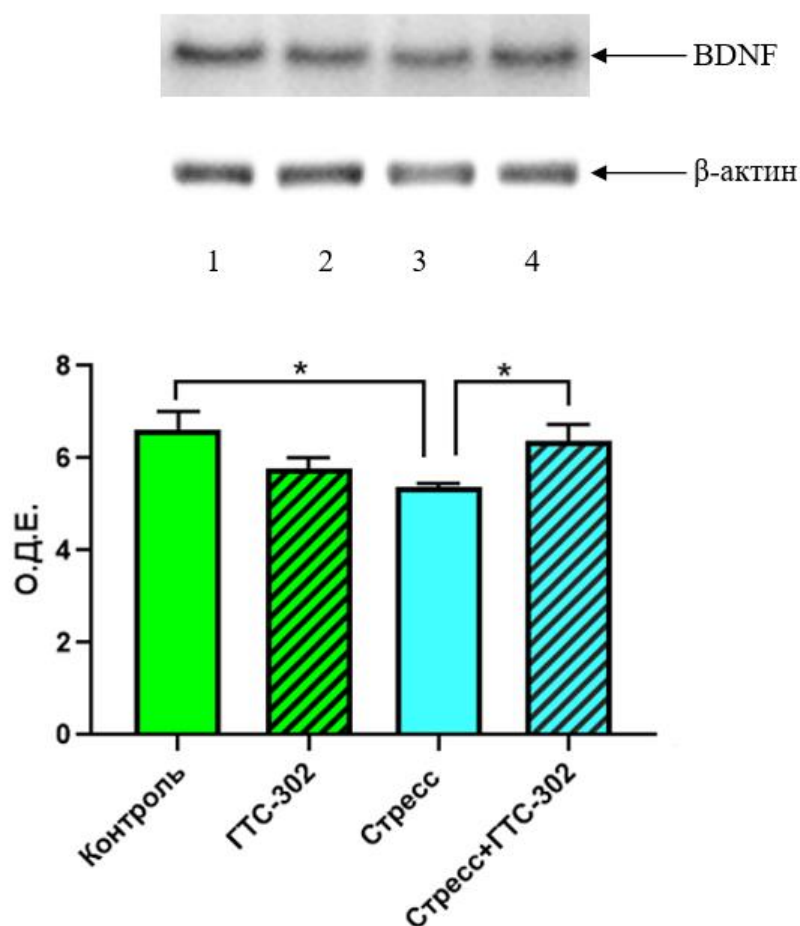
Примечание: Дорожки: 1 – контроль, 2 – ГТС-302, 3 – стресс, 4 – Стресс + ГТС-302.  
Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. О.Д.Е. – относительные денситометрические единицы

Рисунок 9 – Содержание синаптофизина в гиппокампе. Данные Вестерн-блот анализа



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 10 - Содержание PSD-95 в гиппокампе. Данные Вестерн-блот  
анализа



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. \* -  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Стресс» (U тест Манна-Уитни)

Рисунок 11 - Дипептид ГТС-302 предотвращает снижение иммунореактивности к BDNF в гиппокампе мышей, индуцированное хроническим социальным стрессом. Данные Вестерн-блот анализа

Экспериментальные и клинические данные свидетельствуют, что дегенеративные изменения в гиппокампе при депрессии связаны с ухудшением нейропластичности, ассоциированным с дефицитом BDNF, который играет важную роль в регуляции гиппокампального нейро- и синаптогенеза [119]. Снижение содержания BDNF в гиппокампе рассматривается как релевантный показатель депрессивно-подобного состояния [30, 86]. Таким образом, полученные в результате данного исследования биохимические данные согласуются с выявленным агедоническим поведением стрессированных мышей.

Миметик NT-3 ГТС-302 практически полностью противодействовал снижению иммунореактивности к BDNF в гиппокампе стрессированных мышей. Это соответствует литературным данным о том, что NT-3 стимулирует синтез и высвобождение BDNF [139]. Также этот эффект ГТС-302 может быть обусловлен тем, что дипептид, подобно полноразмерному NT-3 [13], стимулирует гиппокампальный нейрогенез, за счет чего противодействует нейродегенерации.

Таким образом, димерный дипептидный миметик NT-3 соединение ГТС-302 при системном введении мышам на фоне хронического социального стресса противодействует развитию проявлений депрессивно-подобного состояния как на поведенческом, так и на биохимическом уровнях.

По результатам данного раздела опубликована статья с соавторами:

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.

### **3.5 Выявление возможного влияния миметиков 4-й петли NT-3 ГТС-301 и ГТС-302 на двигательную активность животных**

Поскольку снижение времени иммобильности в тесте вынужденного плавания может быть связано не только с антидепрессантоподобной, но также и со стимулирующей активностью исследуемых соединений, было изучено возможное влияние соединений ГТС-301 и ГТС-302 на двигательную активность мышей BALB/c. ГТС-301 L,L и L,D, а также ГТС-302 вводили в тех дозах и в тех режимах, в которых они продемонстрировали наиболее выраженный эффект в тесте вынужденного плавания:

- ГТС-301 L,L исследовали при его субхроническом в/б введении в течение 7 дней в дозе 40 мг/кг;

- ГТС-301 L,D исследовали при его остром в/б введении в дозе 20 мг/кг;

- ГТС-302 исследовали при его остром в/б введении в дозе 10 мг/кг.

Влияние миметиков на двигательную активность оценивали в инфракрасном актиметре в течение 5 мин.

Было установлено, что двигательная активность мышей, получавших исследовавшиеся миметики, не отличалась от контрольной группы. Таким образом, сокращение времени иммобильности мышей в тесте вынужденного плавания под действием ГТС-301 и ГТС-302 не связано со стимулирующей активностью, и выводы об антидепрессантоподобных эффектах этих соединений корректны (Таблица 5).

Таблица 5 – Выявление возможного влияния дипептидных миметиков 4-й петли NT-3 на двигательную активность мышей в актиметре при их в/б введении

Группы	Режим введения	Число мышей в группах	Двигательная активность, у.е.
<b>ГТС-301 LL</b>			
Контроль	Субхроническое, 7 дней перед тестом	9	677,3±46,0
ГТС-301 (LL) (40 мг/кг)		9	784,9±64,2
<b>ГТС-301 LD</b>			
Контроль	Острое, за 24 ч до теста	10	1724,8±101,9
ГТС-301 (LD) (10 мг/кг)		10	1814,2±93,2
<b>ГТС-302</b>			
Контроль	Острое, за 24 ч до теста	10	1825,8±67,9
ГТС-302 (10 мг/кг)		10	1827,3±55,9
Примечание: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. Статистически значимой разницы между группами не выявлено ( $p > 0,05$ ) (U-тест Манна-Уитни).			

По результатам данного раздела опубликованы статьи с соавторами:

1. **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;
2. **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.

### **3.6 Выявление возможных мнемотропных эффектов миметиков 4-й петли NT-3**

Хорошо известны когнитотропные эффекты NT-3. Так, на модели болезни Альцгеймера, индуцированной введением  $\beta$ -амилоида в желудочки мозга крысам, NT-3 при внутримозговом введении противодействовал ухудшению памяти в водном лабиринте Морриса [191]. На модели инфекционного менингита у крыс стимуляция экспрессии NT-3 подкожным введением фрагмента 319-335 белка-предшественника  $\beta$ -амилоида пептида APP17p способствовала значительному улучшению памяти в водном лабиринте Морриса и в тесте условного рефлекса пассивного избегания, а также значимому снижению гибели нейронов головного мозга [104]. Когнитотропные свойства NT-3 связывают с его ролью в поддержании гиппокампальной нейропластичности [147, 160]. Так, у трансгенных мышей с делецией гена NT-3 в нервной системе было выявлено значительное ухудшение пространственной памяти в водном лабиринте Морриса, ассоциированное со снижением уровня гиппокампального нейрогенеза, а также с нарушением LTP в зубчатой извилине гиппокампа [181]. В другом исследовании было показано, что внутригиппокампальное введение NT-3

крысам индуцировало долговременное усиление синаптической передачи в проекции DG-CA3 (между зубчатой извилиной и областью CA3 гиппокампа) и стимулировало синаптогенез в гранулярной зоне зубчатой извилины [168]. Считается, что проекция DG-CA3 принимает критически важное значение в кодировании и сохранении пространственной памяти. Перечисленные эффекты введения (инфузия – большой объем) NT-3 блокировались ингибитором Trk-рецепторов K252a, что свидетельствует о вовлеченности в эти эффекты TrkC рецепторов [147].

На следующем этапе настоящего исследования выявляли возможную мнемотропную активность у дипептидов ГТС-301 и ГТС-302. Дополнительно также изучили возможную мнемотропную активность и миметика 4-й петли ГТС-305.

Для оценки эффектов миметиков NT-3 на память использовался тест распознавания нового объекта на крысах линии Wistar. Тесты на кратковременную и долговременную память проводили соответственно через 1 ч (тест 1) и 24 ч (тест 2) после ознакомления крыс с объектами. В качестве препарата сравнения использовался ноотропный препарат пирацетам. Соединения ГТС-301 и ГТС-302 вводили в ранее выявленных активных дозах – 1, 5 и 10 мг/кг, в/б, за 24 ч до ознакомления крыс с объектами. Соединение ГТС-305 вводили в том же режиме 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. Пирацетам вводили также за 24 ч до ознакомления крыс с объектами в дозе 200 мг/кг, в/б [52].

Чтобы оценить кратковременную и долговременную память у животных использовали коэффициент дискриминации (КД) [15], который рассчитывали по формуле:

$KД = (T_{нов} - T_{зн}) / (T_{нов} + T_{зн})$ , где

$T_{нов}$  – время исследования нового объекта,  $T_{зн}$  – время исследования знакомого объекта, Значения  $KД > 0$  означают, что животное помнит знакомый объект.

Соединение ГТС-301 продемонстрировало мнемотропную активность в дозе 1 мг/кг (Таблица 7), статистически значимо улучшая кратковременную (Тест 1) и долговременную (Тест 2) память животных (КД в тестах 1 и 2 были увеличены по сравнению с контрольной группой в 4 и 3,5 раза соответственно). В дозах 5 и 10 мг/кг дипептид ГТС-301 не оказывал статистически значимых эффектов.

Соединение ГТС-302 статистически значимо улучшало кратковременную память в дозах 1 и 5 мг/кг, увеличивая КД в тесте 1 соответственно в 2 и 2,4 раза по сравнению с контролем, и долговременную память в дозе 10 мг/кг, увеличивая КД в тесте 2 в 2,5 раза по сравнению с контролем (Таблица 6).

Соединение ГТС-305 оказалось неактивно в тесте распознавания нового объекта в изученных дозах.

Таблица 6 – 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 <sup>1</sup>	Время исследования знакомого объекта, с	Время исследования нового объекта, с	КД2 <sup>1</sup>
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	<b>0,41±0,1 3*</b>	10,7±2, 0	35,9±7, 3	<b>0,49±0,0 6*</b>
ГТС-301, 5 мг/кг	10	14,9±2, 8	20,2±3, 7	0,14±0,1 0	12,1±1, 8	24,4±3, 3	0,33±0,0 7
ГТС-301, 10 мг/кг	9	13,3±1, 7	22,7±5, 2	0,17±0,1 2	16,9±2, 8	22,8±3, 1	0,17±0,0 9
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±0,1 8
ГТС-302, 1 мг/кг	10	8,4±1,8	42,8±9, 7	<b>0,61±0,0 8*</b>	8,6±1,5	37,8±4, 4	0,60±0,0 9
ГТС-302, 5 мг/кг	10	8,5±1,1	51,6±1 0,4	<b>0,70±0,0 6**</b>	6,1±1,0	34,0±5, 7	0,65±0,0 6
ГТС-302, 10 мг/кг	10	9,2±1,5	36,0±5, 0	0,54±0,1 0	6,7±1,0	45,5±3, 5	<b>0,73±0,0 4##</b>
ГТС-305							
Контроль	10	9,07±2, 17	11,0±1, 9	0,18±0,0 8	11,3±2, 7	17,5±2, 8	0,25±0,0 7
ГТС-305, 10 мг/кг	10	9,17±1, 19	11,9±1, 5	0,12±0,0 7	13,0±2, 6	24,8±1, 9	0,35±0,0 9
ГТС-305, 25 мг/кг	10	9,11±2, 24	12,5±1, 6	0,23±0,1 2	13,3±1, 8	20,2±2, 0	0,22±0,0 5
ГТС-305, 50 мг/кг	10	9,28±2, 45	19,6±4, 1	0,35±0,1 1	13,4±2, 5	17,4±2, 3	0,16±0,0 4
Препарат сравнения / Положительный контроль							
Пирацета м, 200 мг/кг	9	10,5±2, 8	36,0±1 0,4	<b>0,51±0,0 8**</b>	14,4±1, 7	32,6±7, 4	0,33±0,0 8
Примечание: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. <sup>1</sup> КД – коэффициент дискриминации; рассчитывали по формуле: $K = (T_{нов} - T_{зн}) / (T_{нов} + T_{зн})$ , где $T_{нов}$ – время исследования нового объекта, $T_{зн}$ – 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).							

Пирацетам улучшал только кратковременную память, а его эффект по выраженности был сопоставим с эффектами ГТС-301 и ГТС-302.

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.

В дальнейшем проводили исследование фармакологической активности только соединений ГТС-301 и ГТС-302.

По результатам данного раздела опубликованы статьи с соавторами:

1. **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;

2. **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;

тезисы с соавторами:

**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.

### **3.7 Выявление возможного анксиолитического действия соединений ГТС-301 и ГТС-302**

В литературе имеются данные об анксиолитической активности NT-3. Так, на трансгенных мышах TgNTRK3 (генетическая модель патологического страха) было установлено, что введение NT-3 в медиальную префронтальную кору приводило к снижению времени фризинга в тесте формирования контекстно обусловленного страха [43]. NT-3 при введении в дорсальную амигдалу снижал проявления тревожного темперамента у макак-резус, который определяли на основании поведенческой заторможенности (фризинг

и снижение вокализации) в ответ на контакт с потенциально-опасным человеком [57].

Возможную анксиолитическую активность дипептидных миметиков NT-3 выявляли в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» на мышах. Соединения ГТС-301 и ГТС-302 вводили в дозах 1, 5 и 10 мг/кг в/б за 30 мин до теста. Установлено, что ГТС-302 проявлял анксиолитическую активность в дозах 1 и 5 мг/кг (Таблица 7). Наиболее выраженный эффект ГТС-302 демонстрировал в дозе 1 мг/кг, статистически значимо увеличивая время пребывания и число выходов в открытые рукава ПКЛ в абсолютных значениях в 6,8 и 5,1 раз по сравнению с контрольной группой соответственно. В дозе 5 мг/кг ГТС-302 в абсолютных значениях увеличивал в 4,7 и 3,7 раз соответственно время пребывания в открытых рукавах и число выходов в них. В относительных значениях время пребывания в открытых рукавах статистически значимо увеличивалось только в дозе 1 мг/кг (в 6,4 раза по сравнению с контрольной группой), а число выходов в открытые рукава - в дозах 1 и 5 мг/кг (в 5,3 и 3,9 раза по сравнению с контрольной группой соответственно). В дозе 0,5 мг/кг ГТС-302 увеличивал число выходов в открытые рукава в 3 раза по сравнению с контролем, но не оказывал влияния на продолжительность пребывания в открытых рукавах. В дозе 10 мг/кг ГТС-302 не проявлял анксиолитической активности. (Таблица 7).

Для исследования зависимости анксиолитического эффекта миметика ГТС-302 от дозы в отдельном эксперименте изучили его активность в тесте ПКЛ в меньшей дозе – 0,1 мг/кг. Было установлено, что в этой дозе миметик ГТС-302 не влиял на число выходов и время пребывания животных на открытых рукавах установки.

Дипептид ГТС-301 оказался неактивен в диапазоне изученных доз в данном тесте (Таблица 7).

Таблица 7 – 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	% <sup>1</sup>	ед.	% <sup>2</sup>	
<b>ГТС-301</b>						
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
<b>ГТС-302</b>						
<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	<b>2,1±0,4#</b>	19,6±4,1	8,6±0,7
ГТС-302, (1 мг/кг)	10	<b>51,1±9,4**</b>	<b>30,1±5,5**</b>	<b>3,6±0,5**</b>	<b>31,5±4,8**</b>	8,0±1,0
ГТС-302, (5 мг/кг)	10	<b>35,3±9,0*</b>	19,8±5,1	<b>2,6±0,5*</b>	<b>23,2±3,9*</b>	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
<p>Примечание: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.  <sup>1</sup>Время в открытых рукавах представлено в относительных единицах (в %), которые рассчитывали по формуле: <math>t_{o.p., \%} = t_{o.p.} / (t_{o.p.} + t_{z.p.}) \times 100\%</math>, где <math>t_{o.p., \%}</math> - относительное время в открытых рукавах, %; <math>t_{o.p.}</math> - время в открытых рукавах; <math>t_{z.p.}</math> - время в закрытых рукавах.  <sup>2</sup>Число выходов в открытые рукава представлено в относительных единицах (в %), которые рассчитывали по формуле: <math>n_{o.p., \%} = n_{o.p.} / (n_{o.p.} + n_{z.p.}) \times 100\%</math>, где <math>n_{o.p., \%}</math> - относительное число заходов в открытые рукава, %; <math>n_{o.p., c}</math> - число заходов в открытые рукава; <math>n_{z.p., c}</math> - число заходов в закрытые рукава. # - <math>p=0,06</math>; * - <math>p&lt;0,05</math>; *** - <math>p&lt;0,001</math> по сравнению с контрольной группой (однофакторный ANOVA, тест Даннета).</p>						

По результатам данного раздела опубликованы статьи с соавторами:

1. **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;

2. **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;

тезисы с соавторами:

**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.

### **3.8 Выявление возможной нейропротекторной активности миметиков 4-й петли NT-3 ГТС-301 и ГТС-302**

NT-3 продемонстрировал выраженное нейропротекторное действие в условиях гипоксии. Так, 3-дневное введение NT-3 в стриатум новорождённым крысам (7 день постнатального развития) приводило к снижению гибели средних шипиковых нейронов стриатума на 33% по сравнению с контролем в условиях ишемически-гипоксического повреждения, вызванного односторонней перевязкой сонной артерии с последующей гипоксией [60]. В другом исследовании введение гена NT-3 в составе ретровирусного вектора pLNC-5HRE-NT3, где HRE – hypoxia response element – элемент, запускающий экспрессию NT-3 в условиях гипоксии, в культуру клеток PC-12 приводило к

значительному снижению апоптоза по сравнению с контролем на модели гипоксического стресса, вызванного помещением культуры в газовую смесь с низким содержанием кислорода. Этот эффект NT-3 сопровождался подавлением активации p38 MAPK – стресс-активируемой киназы, запускающей каскады апоптических сигналов, и каспазы-3 – одного из эффекторов апоптоза, отвечающего за расщепление структурных и регуляторных белков клетки на финальных стадиях её гибели [201].

В связи с вышеизложенным представлялось целесообразным изучить нейропротекторную активность миметиков 4-й петли NT-3 соединений ГТС-301 и ГТС-302.

### *3.8.1 Изучение антигипоксической активности миметиков ГТС-301 и ГТС-302 на модели нормобарической гипоксии с гипоканнией*

Изучение нейропротекторной активности миметиков ГТС-301 и ГТС-302 было начато с проверки на антигипоксическую активность. С этой целью была использована модель нормобарической гипоксии с гиперкапнией, также называемая «баночной» гипоксией. Исследование проводилось на мышцах-самцах линии BALB/c. Соединения вводили в дозах, оказавшихся наиболее активными по результатам изучения их антидепрессантоподобной активности: 1, 5 и 10 мг/кг для ГТС-302, и 10, 20 и 40 мг/кг для ГТС-301.

Оба дипептида не оказывали статистически значимого влияния на время выживания мышей в изученных дозах. Однако ГТС-301 в дозе 40 мг/кг, в/б вызывал тенденцию к увеличению времени выживания мышей, увеличивая его по сравнению с контрольной группой на 10% (Таблица 8).

Таблица 8 – Выявление возможной антигипоксической активности ГТС-301 и ГТС-302 при их остром в/б введении в тесте нормобарической гипоксии с гиперкапнией на мышах

Вещество и доза	Количество мышей в группе	Среднее время выживания, мин	Время выживания, % <sup>1</sup>
Эксперимент с миметиком 4-й петли ГТС-301			
Контроль	10	30,5±0,89	100
ГТС-301, 10 мг/кг	10	33,4±0,75	109
ГТС-301, 20 мг/кг	10	32,6±1,04	106
ГТС-301, 40 мг/кг	10	33,6±1,09	<b>110<sup>#</sup></b>
Эксперимент с миметиком 4-й петли ГТС-302			
Контроль	10	32,9±0,91	100
ГТС-302, 1 мг/кг	10	31,4±0,55	95
ГТС-302, 5 мг/кг	10	32,7±1,28	99
ГТС-302, 10 мг/кг	10	31,6±0,88	96
Примечание: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. <sup>1</sup> Время выживания в процентах относительно контрольной группы рассчитывалось по формуле: $T\% = T_{\text{эксп}}/T_{\text{к}} \times 100$ , где $T_{\text{к}}$ – время выживания в контрольной группе, $T_{\text{эксп}}$ – время выживания в группах мышей, получавших исследуемые соединения. # - $p=0,069$ по сравнению с контрольной группой (U тест Манна-Уитни).			

Таким образом, соединения ГТС-301 и ГТС-302 не проявляли антигипоксической активности в тесте нормобарической гипоксии с гиперкапнией при остром в/б введении в дозах 10, 20 мг/кг и 1, 5 и 10 мг/кг соответственно. Миметик ГТС-301 в дозе 40 мг/кг показал тенденцию к увеличению времени выживания животных, однако различие с контролем не было статистически значимым.

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

Исследование нейропротекторной активности ГТС-302 проводили на модели транзиторной окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) у крыс. Дополнительно была изучена нейропротекторная активность дипептида ГТС-301.

Животные были разделены на четыре группы: «ЛО» (ложная операция), «ОСМА», «ОСМА + ГТС-301» и «ОСМА + ГТС-302». Соединения вводили в дозе 1 мг/кг, в/б, в течение 7 дней, первое введение было через 4 ч после операции. На 3-й и 6-й день после ОСМА неврологический дефицит оценивали в тесте стимулирования конечностей. На 7-й день после операции и через 24 ч после последнего введения исследуемых соединений животных из всех групп кроме группы «ЛО» подвергали эвтаназии, декапитировали, извлекали мозг, готовили 5 фронтальных срезов, которые затем окрашивали в 2% растворе ТТХ в фосфатно-солевом буфере. Измеряли объёмы ишемизированных участков, а также площади ишемизированного и интактного полушарий.

Объём инфаркта мозга рассчитывали по формуле:

$$V = d \times \Sigma A_i / 2,$$

где  $\Sigma A_i$  - сумма площадей области повреждения на срезах мозга с каждой из сторон,  $d$ - толщина среза.

Для исключения погрешностей измерения, связанных с отёком или атрофией ткани в ишемизированном полушарии, рассчитывали также относительный объём инфаркта по следующей 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 контралатерального полушария, позволяющий исключить возможное влияния отека или атрофии ткани в ишемизированном полушарии.

Схема эксперимента представлена на рисунке 12.

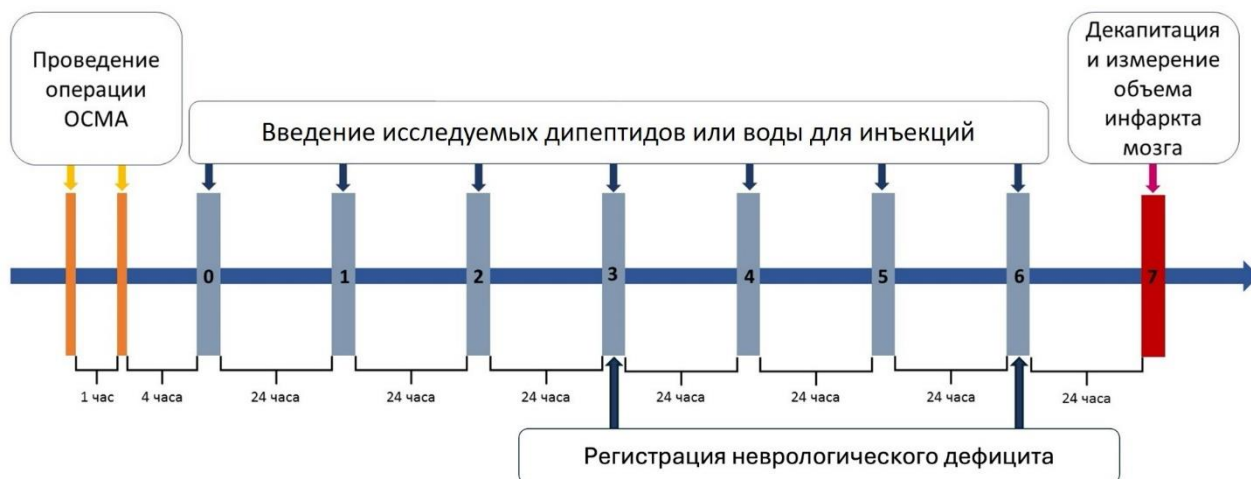
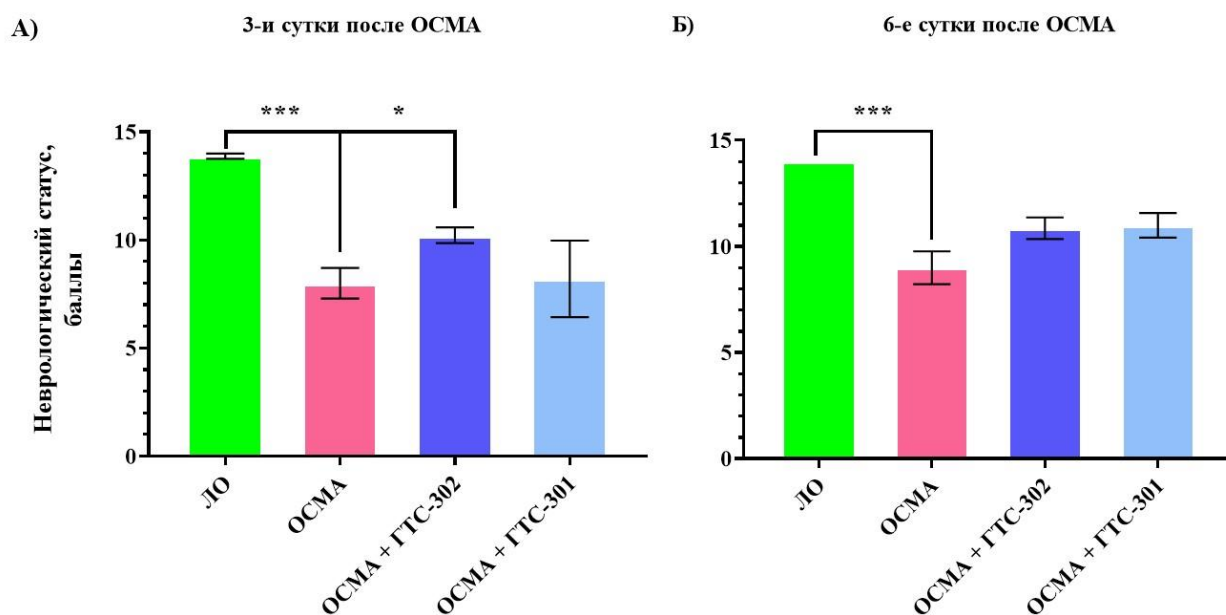


Рисунок 12 – Дизайн исследования нейропротекторной активности миметиков ГТС-301 и ГТС-302 на модели ишемического инсульта, вызванного ОСМА, у крыс

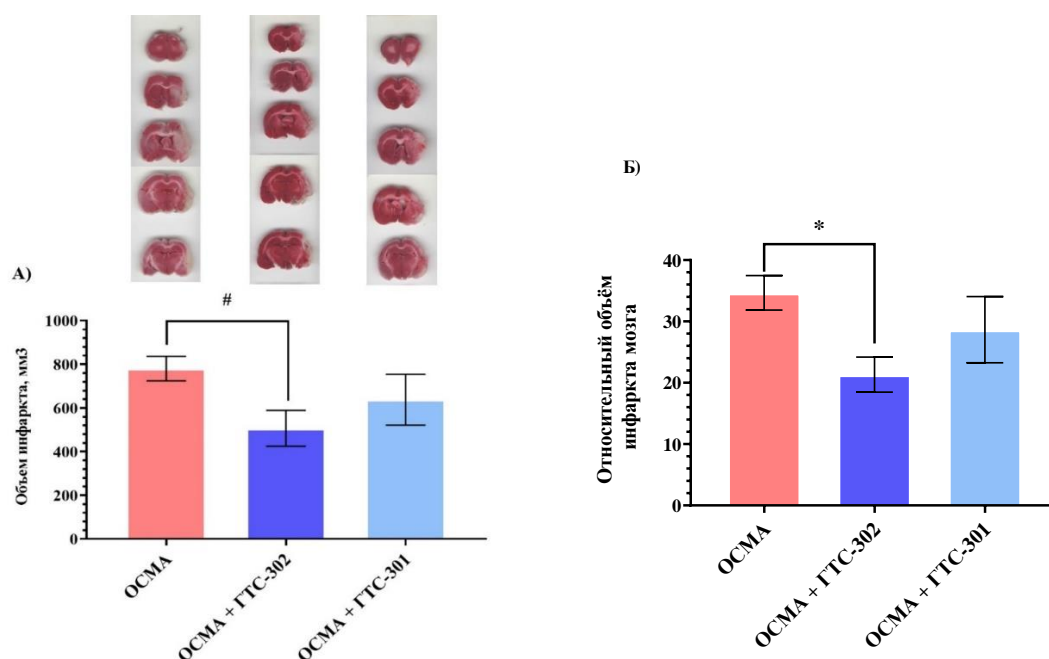
В тесте стимуляции конечностей у ложнооперированных животных не было выявлено неврологического дефицита. У всех групп животных с ОСМА количество баллов для левой (контралатеральной повреждению) стороны тела в данном тесте было статистически значимо снижено по сравнению с группой «ЛО» как на 3-и, так и на 6-е сутки после операции (Рисунок 13). Дипептид ГТС-302 статистически значимо улучшал неврологический статус на 3-и сутки после операции, а ГТС-301 был неактивен.



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 13 – 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 (Рисунок 14), объём которой составлял в среднем  $34,7 \pm 2,8\%$  относительно интактного полушария. Введение ГТС-302 приводило к статистически значимому ( $p = 0,0177$  по сравнению с группой «ОСМА») снижению объёма инфаркта мозга на 39% (до  $21,3 \pm 2,9\%$ ). Дипептид ГТС-301 не оказывал статистически значимого эффекта, объём инфаркта мозга в группе «ОСМА+ГТС-301» составлял  $28,7 \pm 5,4\%$  от интактного полушария мозга.



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 контралатерального полушария, позволяющей исключить погрешности измерения, связанные с отёком или атрофией ткани в ишемизированном полушарии. # -  $p=0,06$ ; \* -  $p=0,03$  по сравнению с группой «OSMA» (однофакторный ANOVA, тест Даннета).

Рисунок 14 – Исследование влияния ГТС-301 и ГТС-302 на объём инфаркта на модели ишемического инсульта, индуцированного окклюзией средней мозговой артерии.

Таким образом, было установлено, что дипептидный миметик 4-й петли NT-3 ГТС-302 обладает нейропротекторной активностью на модели транзиторной окклюзии средней мозговой артерии у крыс. У дипептида ГТС-301 нейропротекторной активности в тех же условиях выявлено не было.

Эти результаты можно предположительно объяснить разной картиной активации пострецепторных сигнальных каскадов, выявленной в экспериментах *in vitro* у ГТС-301 и ГТС-302 [4]. Ранее на примере дипептидных миметиков NGF и BDNF было показано, что нейропротекторной активностью на модели OSMA на крысах обладают только соединения, в картине пострецепторной активации которых присутствует PI3K/Akt сигнальный каскад [65]. Результаты настоящей работы согласуются с этими

данными – нейропротекторную активность на модели ОСМА проявлял ГТС-302, активирующий все три основные пострецепторные сигнальные каскады Trk рецепторов – PI3K/Akt, MAPK/ERK и PLC- $\gamma$ , в то же время ГТС-301, активирующий только MAPK/ERK и PLC- $\gamma$ , оказался неактивен.

В литературе содержится большое количество данных о нейропротекторных эффектах полноразмерного NT-3, выявленных на различных моделях ишемии [60, 200, 201], в том числе на модели ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии [200]. В условиях ОСМА генная терапия NT-3 приводила к снижению объема инфаркта мозга крыс на 36%, что было показано с помощью морфометрии срезов мозга, окрашенных ТТХ, а также к снижению выраженности апоптоза в ишемическом ядре и пенумбре, что было установлено методом TUNEL-анализа. Следует отметить, что в указанном исследовании вирусный вектор, экспрессировавший NT-3, вводился животным за 3 дня до операции, что указывает на профилактический характер данного метода лечения. ГТС-302 при субхроническом введении после ОСМА снижал объем инфаркта мозга на 39%, что сопоставимо с эффектом NT-3.

По результатам данного раздела опубликована статья с соавторами:

1. **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.

## 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 [106]. 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 [30, 86]. 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 [181].

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. [4]. В то время как ГТС-302 активировал все три основных сигнальных каскада Trk рецепторов – PI3K/Akt, MAPK/ERK и PLC- $\gamma$ , ГТС-301 активировал только MAPK/ERK и PLC- $\gamma$ . 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 [6]. 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 содинения-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 анксиолитической, нейропротекторной и мнемотропной, перспективен для дальнейшей разработки в качестве потенциального лекарственного препарата.

**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)
Crk	- CT10 regular of kinase (регулятор киназы CT-10)
Dok 5, 6	- tyrosine kinase/docking protein 5 and 6 (тирозинкиназа/стыковочные белки 5 и 6)
ERK	- extracellular signal-regulated kinase (киназа, регулируемая внеклеточными сигналами)
FRS 2,3	- fibroblast growth factor receptor substrate 2 and 3 (субстрат рецептора фактора роста фибробластов 2 и 3)
Gab1	- Grb2-associated binder 1 (Grb2-ассоциированный связывающий белок 1)
Grb2	- growth factor receptor-bound protein 2 (белок 2, связывающийся с рецептором фактора роста)
Ig1, 2	- immunoglobulin-like domain 1 and 2 (иммуноглобулин-подобный домен 1 и 2)
LRR	- leucine-rich repeat domain (домен, содержащий лейцин-обогащенную повторяющуюся последовательность)
LTD	- long-term depression (долговременная депрессия)
LTP	- long-term potentiation (долговременная потенция)
МАРК	- mitogen-activated protein kinase (митоген-активируемая протеинкиназа)
mTOR	- mammalian target of rapamycin (мишень рапамицина у млекопитающих)
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 $\gamma$	- phospholipase C gamma (фосфолипаза C гамма)
PTB	- phosphotyrosine-binding domain (домен, связывающий фосфотирозин)
PTP $\sigma$	- receptor type protein tyrosine phosphatase-sigma (рецепторная белковая тирозиновая фосфатаза сигма)
SH2	- Src-homology-2 domain (домен, гомологичный второму домену белка Src)
SHC1	- Src-homology 2 domain containing transforming protein (трансформирующий белок, содержащий домен, гомологичный второму домену белка Src)
TBST	- tris-bufferes saline with Tween 20 (трис-буферный солевой раствор с Твином 20)
Trk A, B, C	- tropomyosin-related kinases A, B and C (тирозинкиназные рецепторы A, B, C)
ВОЗ	- всемирная организация здравоохранения
ГЭБ	- гемато-энцефалический барьер
ОСМА	- окклюзия средней мозговой артерии
ПКЛ	- приподнятый крестообразный лабиринт
ТТХ	- хлорид 2,3,5-трифенилтетразолия
ЦНС	- центральная нервная система
ЭНС	- энтеральная нервная система

**БЛАГОДАРНОСТИ**

Выражаю искреннюю благодарность и глубокую признательность член-корреспонденту РАН, доктору биологических наук, профессору Гудашевой Т.А. за научное консультирование и помощь, и.о. генерального директора ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», доктору фармацевтических наук, профессору Дорофееву В.Л. за возможность работать по такой интересной теме; кандидату биологических наук Поварниной П.Ю. за руководство работой и помощь на всех этапах исследований; кандидату химических наук Сазоновой Н.М. за синтез миметиков NT-3; кандидату биологических наук Антиповой Т.А. за проведение совместных исследований; кандидату биологических наук Воронцовой О.Н. за помощь в экспериментальных исследованиях, доктору медицинских наук Цорину С.Б. за помощь в статистической обработке данных.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Гудашева, Т. А. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора /Т. А. Гудашева, А.В. Тарасюк, С. В. Помогайбо [и др.] // Биоорганическая химия. – 2012. – № 38. – С. 280.
2. Гудашева, Т. А. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов / Т. А. Гудашева, Т. А. Антипова, С. Б. Середенин // Доклады Академии наук. – 2010. – № 434 (4). – С. 549–552.
3. Гудашева, Т. А. Первый дипептидный миметик нейротрофина-3: дизайн и фармакологические свойства / Т.А. Гудашева, Н.М. Сазонова, А.В. Тарасюк [и др.] // Доклады Российской Академии Наук. Науки О Жизни. - 2022. – № 505 (1). – С. 303–309.
4. Колик, Л. Г. Низкомолекулярные миметики нейротрофина-3, отличающиеся паттерном активации пострецепторного сигналинга, по-разному ослабляют проявления синдрома отмены морфина у крыс / Л. Г. Колик, М. А. Константинопольский, С. В. Николаев [и др.]// Биохимия. – 2024. – № 89 (2). – Р. 1882–1892.
5. Межлумян, А. Г. Скрининговое изучение эффектов миметиков фактора роста нервов и мозгового нейротрофического фактора на экспериментальной модели депрессии / А. Г. Межлумян, А. В. Таллерова, П. Ю. Поварнина [и др.] // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2020. – № 1. – С. 11–17.
6. 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. - № 23 (2). - С. 87-99.
7. 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 др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2023. – № 57 (12). – С. 23-32.

8. Хабриев, Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев [и др.]. – М. : Медицина, 2005. – 832 с.

9. Abdelhamid, R. E. Depressive behavior in the forced swim test can be induced by TRPV1 receptor activity and is dependent on NMDA receptors / R. E. Abdelhamid, K. J. Kovács, M. G. Nunez [et al.] // Pharmacological Research. – 2014. – № 79. – P. 21–27.

10. Agostinho, F. R. Olanzapine plus fluoxetine treatment increases Nt-3 protein levels in the rat prefrontal cortex / F. R. Agostinho, G. Z. Réus, R. B. Stringari [et al.] // Neuroscience Letters. – 2011. – № 497 (2). – P. 99–103.

11. Alam, A. A model for formulation of protein assay / A. Alam // Analytical Biochemistry. – 1992. – № 203 (1). – P. 121–126.

12. Altar, C. A. Characterization and topography of high-affinity 125I-neurotrophin-3 binding to mammalian brain / C. A. Altar, M. R. Criden, R. M. Lindsay [et al.] // The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. – 1993. – № 13 (2). – P. 733–743.

13. Ammendrup-Johnsen, I. Neurotrophin-3 enhances the synaptic organizing function of TrkC–protein tyrosine phosphatase  $\sigma$  in rat hippocampal neurons / I. Ammendrup-Johnsen, Y. Naito, A. M. Craig [et al.] // The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. – 2015. – № 36 (35). – P. 12425–12431.

14. Angoa-Pérez, M. Mice genetically depleted of brain serotonin do not display a depression-like behavioral phenotype / M. Angoa-Pérez, M. J. Kane, D. I. Briggs [et al.] // ACS Chemical Neuroscience. – 2014. – № 5 (10). – P. 908–919.

15. Antunes, M. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications [Text] / M. Antunes, G. Biala // Cognitive Processing. – 2012. – № 13 (2). – P. 93–110.

16. Anxiety disorders [Электронный ресурс] // World Health Organization. – Режим доступа: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/anxiety-disorders>.
17. Arévalo, J. C. A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein / J. C. Arévalo, H. Yano, K. K. Teng [et al.] // *The EMBO Journal*. – 2004. – № 23 (12). – P. 2358–2368.
18. Armengol, L. 5' UTR-region SNP in the NTRK3 gene is associated with panic disorder / L. Armengol, M. Gratacòs, M. A. Pujana [et al.] // *Molecular Psychiatry*. – 2002. – № 7 (9). – P. 928–930.
19. Barbacid, M. Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors / M. Barbacid // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1995. – № 766 (1). – P. 442–458.
20. Barbacid, M. Neurotrophic factors and their receptors / M. Barbacid // *Current Opinion in Cell Biology*. – 1995. – № 7 (2). – P. 148–155.
21. Barford, K. The neurotrophin receptor signaling endosome: where trafficking meets signaling / K. Barford, C. Deppmann, B. Winckler // *Developmental Neurobiology*. – 2017. – № 77 (4). – P. 405–418.
22. Bertrand, T. Crystal structures of neurotrophin receptors kinase domain [Text] / T. Bertrand // *Vitamins and Hormones*. – 2017. – № 104. – P. 1–18.
23. Bipolar disorder [Электронный ресурс] // World Health Organization. – Режим доступа: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/bipolar-disorder>.
24. Bonni, A. Cell survival promoted by the Ras–MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms / A. Bonni, A. Brunet // *Science*. – 1999. – № 5443 (286). – P. 1358–1362.
25. Bothwell, M. NGF, BDNF, NT3, and NT4 / M. Bothwell // *Handbook of Experimental Pharmacology*. – 2014. – № 220. – P. 3–15.
26. Bracht, T. Link between structural connectivity of the medial forebrain bundle, functional connectivity of the ventral tegmental area, and anhedonia in

unipolar depression / T. Bracht, N. Mertse, S. Walther [et al.] // *NeuroImage: Clinical*. – 2022. – № 34. – Article 102961.

27. Brunet, A. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K–Akt signaling pathway / A. Brunet, S. R. Datta, M. E. Greenberg // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2001. – № 11 (3). – P. 297–305.

28. Butte, M. J. Crystal structure of neurotrophin-3 homodimer shows distinct regions are used to bind its receptors / M. J. Butte, P. K. Hwang, W. C. Mobley, R. J. Fletterick // *Biochemistry*. – 1998. – № 37 (48). – P. 16846–16852.

29. Canossa, M. Neurotrophin release by neurotrophins: implications for activity-dependent neuronal plasticity / M. Canossa, O. Griesbeck, B. Berninger [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – № 94 (24). – P. 13279–13286.

30. Castrén, E. Brain-derived neurotrophic factor signaling in depression and antidepressant action / E. Castrén, L. M. Monteggia // *Biological Psychiatry*. – 2021. – № 90 (2). – P. 128–136.

31. Chalazonitis, A. Neurotrophin-3 as an essential signal for the developing nervous system / A. Chalazonitis // *Molecular Neurobiology*. – 1996. – № 12 (1). – P. 39–53.

32. Chalazonitis, A. Neurotrophin-3 in the development of the enteric nervous system / A. Chalazonitis // *Progress in Brain Research*. – 2004. – № 146. – P. 243–263.

33. Chalazonitis, A. Neurotrophin-3 is required for the survival-differentiation of subsets of developing enteric neurons / A. Chalazonitis, T. D. Pham, T. P. Rothman [et al.] // *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. – 2001. – № 21 (15). – P. 5620–5636.

34. Chang, S. Long-range signaling within growing neurites mediated by neurotrophin-3 / S. Chang, S. V. Popov // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1999. – № 96 (7). – P. 4095–4100.

35. Chen, D. Bivalent peptidomimetic ligands of TrkC are biased agonists and selectively induce neuritogenesis or potentiate neurotrophin-3 trophic signals /

D. Chen, F. Brahim, Y. Angell, Y.-C. Li [et al.] // ACS Chemical Biology. – 2009. – № 4 (9). – P. 769–781.

36. Chen, J.-R. Transient versus sustained phosphorylation and nuclear accumulation of ERKs underlie anti- versus pro-apoptotic effects of estrogens / J.-R. Chen, L. I. Plotkin, J. I. Aguirre [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2005. – № 280 (6). – P. 4632–4638.

37. Çiçek Zekey, Ö. Neurotrophic factor levels and executive functions in children of parents with bipolar disorder: a case controlled study / Ö. Çiçek Zekey, H. N. Uçar, F. Akyürek [et al.] // Journal of Affective Disorders. – 2024. – № 359. – P. 327–332.

38. Coles, C. H. Structural basis for extracellular cis and trans RPTP $\sigma$  signal competition in synaptogenesis / C. H. Coles, N. Mitakidis, P. Zhang [et al.] // Nature Communications. – 2014. – № 5, Article 5209.

39. Cong, Y. NT-3 promotes oligodendrocyte proliferation and nerve function recovery after spinal cord injury by inhibiting autophagy pathway / Y. Cong, C. Wang, J. Wang [et al.] // Journal of Surgical Research. – 2020. – № 247. – P. 128–135.

40. Cooper, J. A. Anhedonia in depression: biological mechanisms and computational models / J. A. Cooper, A. R. Arulpragasam, M. T. Treadway // Current Opinion in Behavioral Sciences. – 2018. – № 22. – P. 128–135.

41. Cui, J. Downregulated NT-3 and PI3K/AKT signaling pathway mediates arsenic-induced apoptosis in hippocampal neurons in vivo and in vitro / J. Cui, Z. Guan, X. Ma [et al.] // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2025. – № 299. – P. 118372.

42. Dalton, G. L. Disruption of AMPA receptor endocytosis impairs the extinction, but not acquisition of learned fear / G. L. Dalton, Y. T. Wang, S. B. Floresco, A. G. Phillips // Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. – 2008. – № 33 (10). – P. 2416–2426.

43. D'Amico, D. Infralimbic neurotrophin-3 infusion rescues fear extinction impairment in a mouse model of pathological fear / D. D'Amico, T. Gener, M. Martínez de Lagrán [et al.] // *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. – 2017. – № 42 (2). – P. 462–472.
44. Dixon, S. J. Trk receptor binding and neurotrophin/fibroblast growth factor (FGF)-dependent activation of the FGF receptor substrate (FRS)-3 / S. J. Dixon, J. I. S. MacDonald, K. N. Robinson [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*. – 2006. – № 1763 (4). – P. 366–380.
45. Depression [Электронный ресурс] // World Health Organization. – Режим доступа: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>.
46. Duffy, A. Immunological and neurotrophic markers of risk status and illness development in high-risk youth: understanding the neurobiological underpinnings of bipolar disorder / A. Duffy, J. Horrocks, S. Doucette [et al.] // *International Journal of Bipolar Disorders*. – 2014. – № 2 (1). – Article 4.
47. Dugger, B. N. Pathology of neurodegenerative diseases / B. N. Dugger, D. W. Dickson // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2017. – № 9 (7). – a028035.
48. Duman, R. S. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists / R. S. Duman, N. Li // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2012. – № 367 (1601). – P. 2475–2484.
49. Durany, N. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 in schizophrenic psychoses / N. Durany, T. Michel, R. Zöchling [et al.] // *Schizophrenia Research*. – 2001. – № 52 (1–2). – P. 79–86.
50. Dwyer, J. M. Activation of mammalian target of rapamycin and synaptogenesis: role in the actions of rapid-acting antidepressants / J. M. Dwyer, R. S. Duman // *Biological Psychiatry*. – 2013. – № 73 (12). – P. 1189–1198.
51. Eisch, A. J. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? / A. J. Eisch, D. Petrik // *Science*. – 2012. – № 338 (6103). – P. 72–75.

52. Ennaceur, A. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I: Behavioral data / A. Ennaceur, J. Delacour // *Behavioural Brain Research*. – 1988. – № 31 (1). – P. 47–59.

53. Ennaceur, A. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. II: Effects of piracetam and pramiracetam / A. Ennaceur, A. Cavoy, J. C. Costa, J. Delacour // *Behavioural Brain Research*. – 1989. – № 33 (2). – P. 197–207.

54. Fariñas, I. Lack of neurotrophin-3 results in death of spinal sensory neurons and premature differentiation of their precursors / I. Fariñas, C. K. Yoshida, C. Backus, L. F. Reichardt // *Neuron*. – 1996. – № 17 (6). – P. 1065–1078.

55. Fernandes, B. S. Increased neurotrophin-3 in drug-free subjects with bipolar disorder during manic and depressive episodes / B. S. Fernandes, C. S. Gama, J. C. Walz [et al.] // *Journal of Psychiatric Research*. – 2010. – № 44 (9). – P. 561–565. Finkbeiner, S. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses [Text] / S. Finkbeiner, S.F. Tavazoie, A. Maloratsky, K.M. Jacobs, K.M. Harris, M.E. Greenberg // *Neuron*. – 1997. – Vol. 19, №5. – P. 1031–1047.

56. Fox, A. S. Dorsal amygdala neurotrophin-3 decreases anxious temperament in primates / A. S. Fox, T. Souaiaia, J. A. Oler [et al.] // *Biological Psychiatry*. – 2019. – № 86 (12). – P. 881–889.

57. Friedman, W. Growth factors / W. Friedman // In: Squire, L. R. (ed.) *Fundamental Neuroscience*. – 4th ed. – Elsevier, 2012. – P. 546–557.

58. Fukumitsu, H. BDNF and NT-3 modulate expression and threonine phosphorylation of microtubule-associated protein 2 analogues, and alter their distribution in the developing rat cerebral cortex / H. Fukumitsu, A. Ohashi, A. Nitta [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 1997. – № 238 (3). – P. 107–110.

59. Gall, C. M. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs are expressed in ventral midbrain regions containing dopaminergic neurons / C. M. Gall, S. J. Gold, P. J. Isackson, K. B. Seroogy // *Molecular and Cellular Neurosciences*. – 1992. – № 3 (1). – P. 56–63.

60. Galvin, K. A. Continuous low-dose treatment with brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin-3 protects striatal medium spiny neurons from mild neonatal hypoxia/ischemia: a stereological study / K. A. Galvin, D. E. Oorschot // *Neuroscience*. – 2003. – № 118 (4). – P. 1023–1032.

61. Gómez-Pineda, V. G. Neurotrophin-3 restores synaptic plasticity in the striatum of a mouse model of Huntington's disease / V. G. Gómez-Pineda, F. M. Torres-Cruz, C. I. Vivar-Cortés, E. Hernández-Echeagaray // *CNS Neuroscience and Therapeutics*. – 2018. – № 24 (4). – P. 353–363.

62. Grande, I. The role of BDNF as a mediator of neuroplasticity in bipolar disorder / I. Grande, G. R. Fries, M. Kunz, F. Kapczinski // *Psychiatry Investigation*. – 2010. – № 7 (4). – P. 243–250.

63. Gu, S. Combined treatment of neurotrophin-3 gene and neural stem cells is ameliorative to behavior recovery of Parkinson's disease rat model / S. Gu, H. Huang, J. Bi, Y. Yao, T. Wen // *Brain Research*. – 2009. – № 1257. – P. 1–9.

64. Gudasheva, T. A. Design and synthesis of dipeptide mimetics of the brain-derived neurotrophic factor / T. A. Gudasheva, A. V. Tarasiuk, S. V. Pomogaïbo [et al.] // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2012. – № 38 (3). – P. 243–252.

65. Gudasheva, T. A. Dimeric dipeptide mimetics of neurotrophins as molecular tools and potential neuroprotective drugs / T. A. Gudasheva, P. Yu. Povarnina, V. L. Dorofeev // *Explor Drug Sci*. – 2025. – №3. – P.1008100.

66. 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. Yu. Povarnina, T. A. Antipova [et al.] // *Journal of Biomedical Science*. – 2015. – № 22 (1). – P. 106.

67. Gudasheva, T. A. Low-molecular mimetics of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor: design and pharmacological properties / T. A. Gudasheva, P. Y. Povarnina, A. V. Tarasiuk, S. B. Seredenin // *Medicinal Research Reviews*. – 2021. – № 41 (5). – P. 2746–2774.

68. Gudasheva, T. A. Novel low-molecular-weight mimetics of the nerve growth factor / T. A. Gudasheva, T. A. Antipova, S. B. Seredenin // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2010. – № 434 (3). – P. 262–265.
69. Gudasheva, T. A. Novel technologies for dipeptide drugs design and their implantation / T. A. Gudasheva, R. U. Ostrovskaya, S. B. Seredenin // *Current Pharmaceutical Design*. – 2018. – № 24 (26). – P. 3020–3027.
70. Guiton, M. Naturally occurring tyrosine kinase inserts block high affinity binding of phospholipase C $\gamma$  and Shc to trkC and neurotrophin-3 signaling / M. Guiton, F. J. Gunn-Moore, D. J. Glass [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – № 270 (35). – P. 20384–20390.
71. Gunn-Moore, F. J. Analysis of mitogen-activated protein kinase activation by naturally occurring splice variants of TrkC, the receptor for neurotrophin-3 / F. J. Gunn-Moore, A. G. Williams, J. M. Tavar // *Biochemical Journal*. – 1997. – № 322 (1). – P. 193–198.
72. Hagihara, K. M. Intercalated amygdala clusters orchestrate a switch in fear state / K. M. Hagihara, O. Bukalo, M. Zeller [et al.] // *Nature*. – 2021. – № 594 (7863). – P. 403–407.
73. Han, K. A. Neurotrophin-3 regulates synapse development by modulating TrkC-PTP $\sigma$  synaptic adhesion and intracellular signaling pathways / K. A. Han, D. Woo, S. Kim [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2016. – № 36 (17). – P. 4816–4831.
74. Hattori, M. Association of neurotrophin-3 gene variant with severe forms of schizophrenia / M. Hattori, S. Nanko // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1995. – № 209 (2). – P. 513–518.
75. He, X. Intracellular Ca(2+) and Ca(2+)/calmodulin-dependent kinase II mediate acute potentiation of neurotransmitter release by neurotrophin-3 / X. He, F. Yang, Z. Xie, B. Lu // *Journal of Cell Biology*. – 2000. – № 149 (4). – P. 783–792.
76. Henriques-Alves, A. M. Ethological evaluation of the effects of social defeat stress in mice: beyond the social interaction ratio / A. M. Henriques-Alves, C. M. Queiroz // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. – 2015. – № 9 (2). – P. 364.

77. Hernández-Echeagaray, E. Neurotrophin-3 modulates synaptic transmission / E. Hernández-Echeagaray // *Vitamins and Hormones*. – 2020. – № 114. – P. 71–89.
78. Herry, C. Switching on and off fear by distinct neuronal circuits / C. Herry, S. Ciocchi, V. Senn [et al.] // *Nature*. – 2008. – № 454 (7204). – P. 600–606.
79. Hock, C. Increased cerebrospinal fluid levels of neurotrophin 3 (NT-3) in elderly patients with major depression / C. Hock, K. Heese, F. Müller-Spahn [et al.] // *Molecular Psychiatry*. – 2000. – № 5 (5). – P. 510–513.
80. 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. – № 344 (6264). – P. 339–341.
81. Hollis, F. Social defeat as an animal model for depression / F. Hollis, M. Kabbaj // *ILAR Journal*. – 2014. – № 55 (2). – P. 221–232.
82. Huang, E. J. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction / E. J. Huang, L. F. Reichardt // *Annual Review of Biochemistry*. – 2003. – № 72 (1). – P. 609–642.
83. Imam, F. The Global Neurodegeneration Proteomics Consortium: biomarker and drug target discovery for common neurodegenerative diseases and aging / F. Imam, R. Saloner, J. W. Vogel [et al.] // *Nature Medicine*. – 2025. – № 31 (8). – P. 2556–2566.
84. Je, H. S. Distinct mechanisms for neurotrophin-3-induced acute and long-term synaptic potentiation / H. S. Je, J. Zhou, F. Yang, B. Lu // *Journal of Neuroscience*. – 2005. – № 25 (50). – P. 11719–11729.
85. Je, H. S. Neurotrophin 3 induces structural and functional modification of synapses through distinct molecular mechanisms / H. S. Je, F. Yang, J. Zhou, B. Lu // *Journal of Cell Biology*. – 2006. – № 175 (6). – P. 1029–1042.
86. Ji, C.-H. Hippocampal MSK1 regulates the behavioral and biological responses of mice to chronic social defeat stress: Involving of the BDNF-CREB signaling and neurogenesis / C.-H. Ji, J.-H. Gu, Y. Liu [et al.] // *Biochemical Pharmacology*. – 2022. – № 195. – P. 114836.

87. Jolkkonen, J. Behavioral effects of the alpha(2)-adrenoceptor antagonist, atipamezole, after focal cerebral ischemia in rats / J. Jolkkonen, K. Puurunen, S. Rantakömi [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2000. – № 400 (2–3). – P. 211–219.

88. Jones, K. R. Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family / K. R. Jones, L. F. Reichardt // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1990. – № 87 (20). – P. 8060–8064.

89. Kalinowska-Lyszczarz, A. The role of neurotrophins in multiple sclerosis – pathological and clinical implications / A. Kalinowska-Lyszczarz, J. Losy // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2012. – № 13 (10). – P. 13713–13725.

90. Karege, F. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs / F. Karege, G. Vaudan, M. Schwald [et al.] // *Brain Research. Molecular Brain Research*. – 2005. – № 136 (1–2). – P. 29–37.

91. Kastin, A. J. Peptides and hormesis / A. J. Kastin, W. Pan // *Critical Reviews in Toxicology*. – 2008. – № 38 (7). – P. 629–631.

92. Kelly, J. A. Crystallization and preliminary structural studies of neurotrophin-3 / J. A. Kelly, E. Singer, T. D. Osslund, T. O. Yeates // *Protein Science*. – 1994. – № 3 (6). – P. 982–983.

93. Kempfle, J. S. A novel small molecule neurotrophin-3 analogue promotes inner ear neurite outgrowth and synaptogenesis in vitro / J. S. Kempfle, M. V. Duro, A. Zhang [et al.] // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2021. – № 15. – P. 666706.

94. Kim, E. K. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases / E. K. Kim, E.-J. Choi // *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease*. – 2010. – № 1802 (4). – P. 396–405.

95. Kim, J. Amygdala depotentiation and fear extinction / J. Kim, S. Lee, K. Park [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – № 104 (52). – P. 20955–20960.
96. Kim, W. B. Encoding of contextual fear memory in hippocampal-amygdala circuit / W. B. Kim, J.-H. Cho // *Nature Communications*. – 2020. – № 11 (1). – P. 1382.
97. Kravtsova, O. Yu. Pharmacokinetics of dimeric dipeptide mimetic of nerve growth factor GC-2 in rats. Part 1. Single and multiple intravascular and extravascular administration. Testing the hypothesis of linearity of pharmacokinetics / O. Yu. Kravtsova, O. G. Gribakina, G. B. Kolyvanov [et al.] // *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. – 2023. – № 3. – P. 12–18.
98. Kudryavtseva, N. An experimental approach for the study of psychotropic drug effects under simulated clinical conditions / N. Kudryavtseva, D. F. Avgustinovich, N. P. Bondar [et al.] // *Current Drug Metabolism*. – 2008. – № 9 (4). – P. 352–360.
99. Lamballe, F. TrkC encodes multiple neurotrophin-3 receptors with distinct biological properties and substrate specificities / F. Lamballe, P. Tapley, M. Barbacid // *The EMBO Journal*. – 1993. – № 12 (8). – P. 3083–3094.
100. Lamptey, R. N. L. A review of the common neurodegenerative disorders: current therapeutic approaches and the potential role of nanotherapeutics / R. N. L. Lamptey, B. Chaulagain, R. Trivedi [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – № 23 (3).
101. Levy, M. J. F. Neurotrophic factors and neuroplasticity pathways in the pathophysiology and treatment of depression / M. J. F. Levy, F. Boulle, H. W. Steinbusch [et al.] // *Psychopharmacology*. – 2018. – № 235 (8). – P. 2195–2220.
102. Li, W. Q. Downstream of tyrosine kinase/docking protein 6, as a novel substrate of tropomyosin-related kinase C receptor, is involved in neurotrophin-3-mediated neurite outgrowth in mouse cortex neurons / W. Q. Li, L. Shi, Y. G. You, Y. H. Gong [et al.] // *BMC Biology*. – 2010. – № 8. – Article 86.

103. Lister, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse / R. G. Lister // *Psychopharmacology*. – 1987. – № 92 (2). – P. 180–185.

104. Liu, D. B. Effect of NT-3 on infection-induced memory impairment of neonatal rats / D. B. Liu, J. Zhang, L. Li, X. Y. Zhu [et al.] // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. – 2019. – № 23 (5). – P. 2182–2187.

105. Loch, A. A. Elevated neurotrophin-3 and neurotrophin 4/5 levels in unmedicated bipolar depression and the effects of lithium / A. A. Loch, M. V. Zanetti, R. T. de Sousa [et al.] // *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. – 2015. – № 56. – P. 243–246.

106. Longa, E. Z. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats / E. Z. Longa, P. R. Weinstein, S. Carlson, R. Cummins // *Stroke*. – 1989. – № 20 (1). – P. 84–91.

107. Lonze, B. E. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system / B. E. Lonze, D. D. Ginty // *Neuron*. – 2002. – № 35 (4). – P. 605–623.

108. Loudes, C. Distinct populations of hypothalamic dopaminergic neurons exhibit differential responses to brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT-3) / C. Loudes, F. Petit, C. Kordon, A. Faivre-Bauman // *The European Journal of Neuroscience*. – 1999. – № 11 (2). – P. 617–624.

109. Macrae, I. Preclinical stroke research – advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia / I. Macrae // *British Journal of Pharmacology*. – 2011. – № 164 (4). – P. 1062–1078.

110. Magri, A. New BDNF and NT-3 cyclic mimetics concur with copper to activate trophic signaling pathways as potential molecular entities to protect old brains from neurodegeneration / A. Magri, B. Tomasello, I. Naletova [et al.] // *Biomolecules*. – 2024. – № 14 (9). – Article 1104.

111. Maisonpierre, P. C. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF / P. C. Maisonpierre, L. Belluscio, B. Friedman [et al.] // *Science*. – 1990. – № 247 (4949). – P. 1446–1451.

112. Maisonpierre, P. C. Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations / P. C. Maisonpierre, M. M. Le Beau, R. Espinosa [et al.] // *Genomics*. – 1991. – № 10 (3). – P. 558–568.

113. Malcangio, M. Nerve growth factor- and neurotrophin-3-induced changes in nociceptive threshold and the release of substance P from the rat isolated spinal cord / M. Malcangio, V. Lessmann, Y. A. Barde, S. P. Hunt // *The Journal of Neuroscience*. – 1997. – № 17 (21). – P. 8459–8467.

114. Mamounas, L. A. Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain / L. A. Mamounas, M. E. Blue, J. A. Siuciak, C. A. Altar // *The Journal of Neuroscience*. – 1995. – № 15 (12). – P. 7929–7939.

115. Marek, R. Excitatory connections between the prelimbic and infralimbic medial prefrontal cortex show a role for the prelimbic cortex in fear extinction / R. Marek, L. Xu, R. K. P. Sullivan, P. Sah // *Nature Neuroscience*. – 2018. – № 21 (5). – P. 654–658.

116. Marsh, H. N. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor activate multiple signal transduction events but are not survival factors for hippocampal pyramidal neurons / H. N. Marsh, H. C. Palfrey // *Journal of Neurochemistry*. – 2002. – № 67 (3). – P. 952–963.

117. Martin-Iverson, M. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 activate striatal dopamine and serotonin metabolism and related behaviors: interactions with amphetamine / M. Martin-Iverson, K. Todd, C. Altar // *The Journal of Neuroscience*. – 1994. – № 14 (3). – P. 1262–1270.

118. Masella, G. The amygdala NT3-TrkC pathway underlies inter-individual differences in fear extinction and related synaptic plasticity / G. Masella, F. Silva, E. Corti [et al.] // *Molecular Psychiatry*. – 2024. – № 29 (5). – P. 1322–1337.

119. Masi, G. The hippocampus, neurotrophic factors and depression / G. Masi, P. Brovedani // *CNS Drugs*. – 2011. – № 25 (11). – P. 913–931.

120. Ménard, M. The dependence receptor TrkC regulates the number of sensory neurons during DRG development / M. Ménard, C. Costechareyre, J. M. Coelho-Aguiar [et al.] // *Developmental Biology*. – 2018. – № 442 (2). – P. 249–261.

121. Mendola, D. La. Metal ion coordination in peptide fragments of neurotrophins: a crucial step for understanding the role and signaling of these proteins in the brain / D. La Mendola, G. Arena, A. Pietropaolo, C. Satriano // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2021. – № 435. – P. 213790.

122. Merlio, J. P. Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system / J. P. Merlio, P. Ernfors, M. Jaber, H. Persson // *Neuroscience*. – 1992. – № 51 (3). – P. 513–532.

123. 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 [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2022. – № 15 (3). – P. 284.

124. Miranda, A. S. de. Is neurotrophin-3 (NT-3) a potential therapeutic target for depression and anxiety? / A. S. de Miranda, J. L. V. M. de Barros, A. L. Teixeira // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. – 2020. – № 24 (12). – P. 1225–1238.

125. Monisha, M. Relationship of neurotrophin-3 gene polymorphism with cognitive impairment in bipolar disorder / M. Monisha, N. Keshri, H. Nandeesh, V. Menon // *Indian Journal of Psychological Medicine*. – 2025. – (in press).

126. Muiños-Gimeno, M. Allele variants in functional microRNA target sites of the neurotrophin-3 receptor gene (NTRK3) as susceptibility factors for anxiety disorders / M. Muiños-Gimeno, M. Guidi, B. Kagerbauer [et al.] // *Human Mutation*. – 2009. – № 30 (7). – P. 1062–1071.

127. Muragaki, Y. Expression of trk receptors in the developing and adult human central and peripheral nervous system / Y. Muragaki, N. Timothy, S. Leight [et al.] // *Journal of Comparative Neurology*. – 1995. – № 356 (3). – P. 387–397.

128. Naletova, I. Copper complexes of synthetic peptides mimicking neurotrophin-3 enhance neurite outgrowth and CREB phosphorylation / I. Naletova, G. I. Grasso, C. Satriano [et al.] // *Metallomics*. – 2019. – № 11 (9). – P. 1567–1578.

129. Nanko, S. Neurotrophin-3 gene polymorphism associated with schizophrenia / S. Nanko, M. Hattori, S. Kuwata [et al.] // *Acta Psychiatrica Scandinavica*. – 1994. – № 89 (6). – P. 390–392.

130. Nestler, E. J. Neurobiology of depression / E. J. Nestler, M. Barrot, R. J. DiLeone [et al.] // *Neuron*. – 2002. – № 34 (1). – P. 13–25.

131. Ogłodek, E. A. Melatonin and neurotrophins NT-3, BDNF, NGF in patients with varying levels of depression severity / E. A. Ogłodek, M. J. Just, A. R. Szromek, A. Araszkiwicz // *Pharmacological Reports: PR*. – 2016. – № 68 (5). – P. 945–951.

132. Omar, N. A. Neuroprotective effects of neurotrophin-3 in MPTP-induced zebrafish Parkinson's disease model / N. A. Omar, J. Kumar, S. L. Teoh // *Frontiers in Pharmacology*. – 2023. – № 14. – P. 1307447.

133. Öngür, D. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders / D. Öngür, W. C. Drevets, J. L. Price // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1998. – № 95 (22). – P. 13290–13295.

134. Ortega-Martínez, S. A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis / S. Ortega-Martínez // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2015. – № 8. – P. 46.

135. Otal, R. Lack of TrkB and TrkC signaling alters the synaptogenesis and maturation of mossy fiber terminals in the hippocampus / R. Otal, A. Martínez, E. Soriano // *Cell and Tissue Research*. – 2005. – № 319 (3). – P. 349–358.

136. Otsuki, K. Altered expression of neurotrophic factors in patients with major depression / K. Otsuki, S. Uchida, T. Watanuki [et al.] // *Journal of Psychiatric Research*. – 2008. – № 42 (14). – P. 1145–1153.

137. Ouaamari, Y. El. Neurotrophic factors as regenerative therapy for neurodegenerative diseases: current status, challenges and future perspectives / Y.

El Ouaamari, J. Van den Bos, B. Willekens [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – № 24 (4). – P. 3866.

138. Pattarawarapan, M. New templates for syntheses of ring-fused, C(10)  $\beta$ -turn peptidomimetics leading to the first reported small-molecule mimic of neurotrophin-3 / M. Pattarawarapan, M. C. Zaccaro, U. H. Saragovi, K. Burgess // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2002. – № 45 (20). – P. 4387–4390.

139. Patz, S. Neurotrophins induce short-term and long-term changes of cortical neurotrophin expression / S. Patz, P. Wahle // *The European Journal of Neuroscience*. – 2004. – № 20 (3). – P. 701–708.

140. Pellow, S. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat / S. Pellow, P. Chopin, S. E. File, M. Briley // *Journal of Neuroscience Methods*. – 1985. – № 14 (3). – P. 149–167.

141. Perrottelli, A. Advances in the understanding of the pathophysiology of schizophrenia and bipolar disorder through induced pluripotent stem cell models / A. Perrottelli, F. F. Marzocchi, E. Caporusso [et al.] // *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN*. – 2024. – № 49 (2). – P. E109–E125.

142. 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. – № 36 (2). – P. 280–286.

143. Porsolt, R. D. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments / R. D. Porsolt, G. Anton, N. Blavet, M. Jalfre // *European Journal of Pharmacology*. – 1978. – № 47 (4). – P. 379–391.

144. Porsolt, R. D. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments / R. D. Porsolt, M. Le Pichon, M. Jalfre // *Nature*. – 1977. – № 266 (5604). – P. 730–732.

145. Primo, M. J. Sucrose preference test: a systematic review of protocols for the assessment of anhedonia in rodents / M. J. Primo, D. Fonseca-Rodrigues, A. Almeida [et al.] // *European Neuropsychopharmacology*. – 2023. – № 77. – P. 80–92.

146. Rajkowska, G. Reductions in neuronal and glial density characterize the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder / G. Rajkowska, A. Halaris, L. D. Selemon // *Biological Psychiatry*. – 2001. – № 49 (9). – P. 741–752.

147. Ramos-Languren, L. E. Plasticity and metaplasticity of adult rat hippocampal mossy fibers induced by neurotrophin-3 / L. E. Ramos-Languren, M. L. Escobar // *The European Journal of Neuroscience*. – 2013. – № 37 (8). – P. 1248–1259.

148. Reichardt, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways / L. F. Reichardt // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2006. – № 361 (1473). – P. 1545–1564.

149. Sahenk, Z. NT-3 promotes nerve regeneration and sensory improvement in CMT1A mouse models and in patients / Z. Sahenk, H. N. Nagaraja, B. S. McCracken [et al.] // *Neurology*. – 2005. – № 65 (5). – P. 681–689.

150. Sakamoto, K. CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection / K. Sakamoto, K. Karelina, K. Obrietan // *Journal of Neurochemistry*. – 2011. – № 116 (1). – P. 1–9.

151. Salyha, N. Hypoxia modeling techniques: a review / N. Salyha, I. Oliynyk // *Heliyon*. – 2023. – № 9 (2). – P. e13238.

152. Sandell, J. H. The distribution of neurotrophin receptor TrkC-like immunoreactive fibers and varicosities in the rhesus monkey brain / J. H. Sandell, L. S. Baker, T. Davidov // *Neuroscience*. – 1998. – № 86 (4). – P. 1181–1194.

153. Scheggi, S. Making sense of rodent models of anhedonia / S. Scheggi, M. G. De Montis, C. Gambarana // *International Journal of Neuropsychopharmacology*. – 2018. – № 21 (11). – P. 1049–1065.

154. Schneider, R. A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors / R. Schneider, M. Schweiger // *Oncogene*. – 1991. – № 6 (10). – P. 1807–1811.

155. Seidaha, N. G. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT-3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases / N. G. Seidah, S. Benjannet, S. Pareek [et al.] // *FEBS Letters*. – 1996. – № 379 (3). – P. 247–250.

156. Senn, V. Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons / V. Senn, S. B. E. Wolff, C. Herry [et al.] // *Neuron*. – 2014. – № 81 (2). – P. 428–437.

157. Shatri, H. The role of neurotrophin 3 (NT-3) on neural plasticity in depression: a literature review / H. Shatri, M. Pranandi, Y. Ardani [et al.] // *Intisari Sains Medis*. – 2023. – № 14 (3). – P. 1103–1108.

158. Sheldrick, A. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin 3 (NT-3) levels in post-mortem brain tissue from patients with depression compared to healthy individuals: a proof of concept study / A. Sheldrick, S. Camara, M. Ilieva [et al.] // *European Psychiatry: The Journal of the Association of European Psychiatrists*. – 2017. – № 46. – P. 65–71.

159. Shi, L. Dok5 is substrate of TrkB and TrkC receptors and involved in neurotrophin-induced MAPK activation / L. Shi, J. Yue, Y. You [et al.] // *Cellular Signalling*. – 2006. – № 18 (11). – P. 1995–2003.

160. Shimazu, K. NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis / K. Shimazu, M. Zhao, K. Sakata [et al.] // *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*. – 2006. – № 13 (3). – P. 307–315.

161. Shirayama, Y. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression / Y. Shirayama, A. C.-H. Chen, S. Nakagawa [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2002. – № 22 (8). – P. 3251–3261.

162. Schizophrenia [Электронный ресурс] // World Health Organization. – Режим доступа: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>.

163. Sieber-Blum, M. Norepinephrine transporter expression and function in noradrenergic cell differentiation / M. Sieber-Blum, Z. Ren // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2000. – № 212 (1–2). – P. 61–70.

164. Sierra-Mercado, D. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear / D. Sierra-Mercado, N. Padilla-Coreano, G. J. Quirk // *Neuropsychopharmacology*. – 2011. – № 36 (2). – P. 529–538.

165. Silva, F. TrkC intracellular signalling in the brain fear network during the formation of a contextual fear memory / F. Silva, G. Masella, M. F. Madeira [et al.] // *Molecular Neurobiology*. – 2023. – № 60 (6). – P. 3507–3521.

166. Skaper, S. D. The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors / S. D. Skaper // *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*. – 2008. – № 7 (1). – P. 46–62.

167. Smith, M. A. Stress and antidepressants differentially regulate neurotrophin 3 mRNA expression in the locus coeruleus / M. A. Smith, S. Makino, M. Altemus [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1995. – № 92 (19). – P. 8788–8792.

168. Sternini, C. Evidence for a role of neurotrophin-3 in the adult digestive-system / C. Sternini, J. Arakawa, R. DeGiorgio, N. Brecha // *Gastroenterology*. – 1995. – № 108 (4). – P. 19103–2899.

169. Stewart, A. N. Transplantation of mesenchymal stem cells that overexpress NT-3 produce motor improvements without axonal regeneration following complete spinal cord transections in rats / A. N. Stewart, G. Kendzioriski, Z. M. Deak [et al.] // *Brain Research*. – 2018. – № 1699. – P. 19–33.

170. Takahashi, H. Postsynaptic TrkC and presynaptic PTP $\sigma$  function as a bidirectional excitatory synaptic organizing complex / H. Takahashi, P. Arstikaitis, T. Prasad [et al.] // *Neuron*. – 2011. – № 69 (2). – P. 287–303.

171. 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 [et al.] // *Mendeleev Communications*. – 2023. – № 33 (6). – P. 786–789.

172. Tauris, J. Proneurotrophin-3 may induce Sortilin-dependent death in inner ear neurons / J. Tauris, C. Gustafsen, E. I. Christensen [et al.] // *European Journal of Neuroscience*. – 2011. – № 33 (4). – P. 622–631.

173. Tessarollo, L. Targeted mutation in the neurotrophin-3 gene results in loss of muscle sensory neurons / L. Tessarollo [et al.] // *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America. – 1994. – № 91 (25). – P. 11844–11848.

174. Tessarollo, L. Targeted deletion of all isoforms of the *trkC* gene suggests the use of alternate receptors by its ligand neurotrophin-3 in neuronal development and implicates *trkC* in normal cardiogenesis / L. Tessarollo, K. S. Vogel, M. E. Palko [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – № 94 (26). – P. 14776–14781.

175. Tongtong, L. Luteolin promotes neuronogenesis in hippocampus of chronic unpredictable mild stress rats and primary hippocampus of fetal rats / T. Liu, X. Zhang, H. Yang [et al.] // *J Tradit Chin Med*. – 2024.

176. Tsoulfas, P. The rat *trkC* locus encodes multiple neurogenic receptors that exhibit differential response to neurotrophin-3 in PC12 cells / P. Tsoulfas, D. Soppet, E. Escandon [et al.] // *Neuron*. – 1993. – № 10 (5). – P. 975–990.

177. Urfer, R. The binding epitopes of neurotrophin-3 to its receptors *trkC* and *gp75* and the design of a multifunctional human neurotrophin / R. Urfer, P. Tsoulfas, D. Soppet [et al.] // *The EMBO Journal*. – 1994. – № 13 (24). – P. 5896–5909.

178. Urfer, R. Specificity determinants in neurotrophin-3 and design of nerve growth factor-based *trkC* agonists by changing central  $\beta$ -strand bundle residues to their neurotrophin-3 analogs / R. Urfer, P. Tsoulfas, L. O'Connell, L. G. Presta // *Biochemistry*. – 1997. – № 36 (16). – P. 4775–4781.

179. Valenzuela, D. M. Alternative forms of rat *TrkC* with different functional capabilities / D. M. Valenzuela, P. C. Maisonpierre, D. J. Glass [et al.] // *Neuron*. – 1993. – № 10 (5). – P. 963–974.

180. Vargas, H. E. Decreased serum neurotrophin 3 in chronically medicated schizophrenic males / H. E. Vargas, C. S. Gama, A. C. Andreazza [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2008. – № 440 (3). – P. 197–201.

181. Verharen, J. P. H. A computational analysis of mouse behavior in the sucrose preference test / J. P. H. Verharen, J. W. de Jong, Y. Zhu, S. Lammel // *Nature Communications*. – 2023. – № 14 (1). – P. 2419.

182. Walz, J. C. Serum neurotrophin-3 is increased during manic and depressive episodes in bipolar disorder / J. C. Walz, A. C. Andreazza, B. N. Frey [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2007. – № 415 (1). – P. 87–89.

183. Wan, G. Neurotrophin-3 regulates ribbon synapse density in the cochlea and induces synapse regeneration after acoustic trauma / G. Wan, M. E. Gómez-Casati, A. R. Gigliello [et al.] // *eLife*. – 2014. – № 2014-October. – P. 1–35.

184. Wang, H. The promotion of neural regeneration in a rat facial nerve crush injury model using collagen-binding NT-3 / H. Wang, H. Ni, S. Han [et al.] // *Annals of Clinical and Laboratory Science*. – 2016. – № 46 (6). – P. 578–585.

185. Wang, T. Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses / T. Wang, K. Xie, B. Lu // *The Journal of Neuroscience*. – 1995. – № 15 (7 Pt 1). – P. 4796–4805.

186. White, D. M. Contribution of neurotrophin-3 to the neuropeptide Y-induced increase in neurite outgrowth of rat dorsal root ganglion cells / D. M. White // *Neuroscience*. – 1998. – № 86 (1). – P. 257–263.

187. Wulff, A. B. How Sucrose Preference Is Gained and Lost: An In-Depth Analysis of Drinking Behavior during the Sucrose Preference Test in Mice / A. B. Wulff, P. Cooper, E. Kodjo [et al.] // *eNeuro*. – 2023. – № 9 (10). – P. ENEURO.0195-23.2023.

188. Wysokiński, A. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT-3) in depressed patients with schizophrenia / A. Wysokiński // *Nordic Journal of Psychiatry*. – 2016. – № 70 (4). – P. 267–271.

189. Yagubova, S. S. Antidiabetic effect of a new original NT-3 dipeptide mimetic / S. S. Yagubova, M. A. Chernyshevskaya, R. U. Ostrovskaya [et al.] // *Doklady Rossiyskoy Akademii Nauk. Nauki o Zhizni*. – 2023. – № 512 (1). – P. 417–421.

190. Yamamoto, M. Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, TrkA, TrkB, and TrkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues / M. Yamamoto,

G. Sobue, K. Yamamoto [et al.] // *Neurochemical Research*. – 1996. – № 21 (8). – P. 929–938.

191. Yan, Z. Neurotrophin-3 promotes the neuronal differentiation of BMSCs and improves cognitive function in a rat model of Alzheimer's disease / Z. Yan, X. Shi, H. Wang [et al.] // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2021. – № 15. – P. 629356.

192. Yang, F. PI-3 kinase and IP3 are both necessary and sufficient to mediate NT3-induced synaptic potentiation / F. Yang, X. He, L. Feng [et al.] // *Nature Neuroscience*. – 2001. – № 4 (1). – P. 19–28.

193. Yang, Y. W. Risk of Alzheimer's disease with metal concentrations in whole blood and urine: A case-control study using propensity score matching / Y. W. Yang, S. H. Liou, Y. M. Hsueh [et al.] // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2018. – № 356. – P. 8–14.

194. Yang, T. The role of BDNF on neural plasticity in depression / T. Yang, Z. Nie, H. Shu [et al.] // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2020. – № 14. – P. 82.

195. Yankelevitch-Yahav, R. The forced swim test as a model of depressive-like behavior / R. Yankelevitch-Yahav, M. Franko, A. Huly, R. Doron // *Journal of Visualized Experiments*. – 2015. – № 97.

196. Yano, H. Proneurotrophin-3 is a neuronal apoptotic ligand: Evidence for retrograde-directed cell killing / H. Yano, R. Torkin, L. Andrés Martín [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2009. – № 29 (47). – P. 14790–14802.

197. Zaccaro, M. C. Selective small molecule peptidomimetic ligands of TrkC and TrkA receptors afford discrete or complete neurotrophic activities / M. C. Zaccaro, H. B. Lee, M. Pattarawarapan [et al.] // *Chemistry and Biology*. – 2005. – № 12 (9). – P. 1015–1028.

198. Zangwill, O. L. Clinical tests of memory impairment / O. L. Zangwill // *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. – 1943. – № 36 (11). – P. 576–580.

199. 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 [et

al.] // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. – 2007. – № 55 (1). – P. 1–19.

200. Zhang, J. Neuroprotection of neurotrophin-3 against focal cerebral ischemia/reperfusion injury is regulated by hypoxia-responsive element in rats / J. Zhang, Q. Shi, P. Yang [et al.] // *Neuroscience*. – 2012. – № 222. – P. 1–9.

201. Zhang, J. Hypoxia-regulated neurotrophin-3 expression by multicopy hypoxia response elements reduces apoptosis in PC12 cells / J. Zhang, Q. Shi, X. Chen [et al.] // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2012. – № 30 (5). – P. 1173–1179.

202. Zhang, J. Comparison of ketamine, 7,8-dihydroxyflavone, and ANA-12 antidepressant effects in the social defeat stress model of depression / J. Zhang, W. Yao, C. Dong [et al.] // *Psychopharmacology*. – 2015. – № 232 (23). – P. 4325–4335.

203. Zhang, W. Effects of BDNF-ERK-CREB signaling pathways on cognitive function and neural plasticity in a rat model of depression / W. Zhang, X. Liu, W. Xu [et al.] // *Int J Clin Exp Med*. – 2019. – № 12 (6). – P. 6684–6694.

204. Zherdev, V. P. Pharmacokinetics of dipeptide mimetic BDNF GSB-106 in rats / V. P. Zherdev, G. B. Kolyvanov, A. A. Litvin [et al.] // *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. – 2019. – № 1. – P. 37–43.

205. Zhou, J. Crosstalk between MAPK/ERK and PI3K/AKT signal pathways during brain ischemia/reperfusion / J. Zhou, T. Du, B. Li [et al.] // *ASN Neuro*. – 2015. – № 7 (5).

206. Zhou, X. F. Localization of neurotrophin-3-like immunoreactivity in the rat central nervous system / X. F. Zhou, R. A. Rush // *Brain Research*. – 1994. – № 643 (1–2). – P. 162–172.

207. Zou, D. Repair effect of neurotrophic factor III (NT-3) on rats with spinal injury model and its mechanism / D. Zou, H. Wang, S. Hao, F. Chen // *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*. – 2024. – № 70 (1). – P. 56–61.