



# Изучение мнемотропной и антидепрессантоподобной активности низкомолекулярного миметика фактора роста нервов дипептида ГК-2 в условиях экспериментального ишемического инсульта у крыс

© Поварнина П. Ю., Сазонова Н. М., Никифоров Д. М., Гудашева Т. А., Дорофеев В. Л.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,  
Москва, Российская Федерация

## Аннотация

**Актуальность.** Фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF), обладающий нейротропными и нейрорегенеративными свойствами, перспективен для разработки на его основе препаратов для лечения постинсультного состояния. ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» был сконструирован и синтезирован димерный дипептидный миметик NGF, получивший лабораторный шифр ГК-2, который в условиях экспериментальной церебральной ишемии выраженно снижал объем инфаркта мозга и стимулировал нейро- и синаптогенез.

**Цель.** Целью настоящего исследования стало изучение действия ГК-2 в отношении экспериментальной постинсультной деменции и депрессии.

**Методы.** Ишемический инсульт моделировали с помощью окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) на крысах Wistar. ГК-2 вводили в дозе 0,5 мг/кг, внутрибрюшинно, в течение 21 дня после ОСМА. Через 30–40 дней после ОСМА кратковременную и долговременную память животных оценивали в тесте распознавания нового объекта, депрессивноподобное состояние — в тесте вынужденного плавания и тесте предпочтения раствора сахара.

**Результаты.** У животных группы «ОСМА» по сравнению с ложнооперированными животными была статистически значимо ухудшена (на 80 %) кратковременная и долговременная память, а также наблюдались поведенческие признаки депрессивноподобного состояния (увеличение времени имобильности на 50 % и снижение предпочтения раствора сахара на 30 %). Дипептид ГК-2 полностью предотвращал развитие всех этих нарушений.

**Заключение.** Таким образом, дипептидный миметик NGF ГК-2 противодействует развитию когнитивных и психоэмоциональных нарушений в условиях экспериментального инсульта.

**Ключевые слова:** NGF; дипептидный миметик; ишемический инсульт; антидепрессантоподобная активность; мнемотропная активность

## Для цитирования:

Поварнина П. Ю., Сазонова Н. М., Никифоров Д. М., Гудашева Т. А., Дорофеев В. Л. Изучение мнемотропной и антидепрессантоподобной активности низкомолекулярного миметика фактора роста нервов дипептида ГК-2 в условиях экспериментального ишемического инсульта у крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(1):14–22. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-1-14-22>. EDN: LBOTWJ.

**Поступила:** 01.03.2024. **В доработанном виде:** 10.03.2024. **Принята к печати:** 24.03.2024. **Опубликована:** 31.03.2024.

## A study on the mnemotropic and antidepressant-like effects of the low-molecular-weight mimetic of nerve growth factor, dipeptide GK-2, in experimental ischemic stroke

© Polina Yu. Povarnina, Nellya M. Sazonova, Dmitriy M. Nikiforov, Tatiana A. Gudasheva, Vladimir L. Dorofeev

FSBSI "Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies", Moscow, Russian Federation

## Abstract

**Relevance.** The nerve growth factor (NGF), possessing neuroprotective and neuroregenerative properties, holds promise for the development of medications for the treatment of post-stroke conditions. At the Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, a dimeric dipeptide mimic of NGF with the laboratory code GK-2 was designed and synthesized. Under conditions of experimental cerebral ischemia, it significantly reduced the volume of brain infarction and stimulated neuro- and synaptogenesis.

**Objective.** The aim of this study was to investigate the effects of GK-2 on experimental post-stroke dementia and depression.

**Methods.** Ischemic stroke was induced by occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) in Wistar rats. GK-2 was administered intraperitoneally at a dose of 0.5 mg/kg for 21 days post MCAO. Short-term and long-term memory of the animals were assessed 30–40 days post MCAO using the novel object recognition test. Depressive-like state was evaluated through the forced swimming test and sucrose preference test.

**Results.** In animals subjected to MCAO, both short-term and long-term memory exhibited a statistically significant decline of 80 %, along with a depressive-like state characterized by a 50 % increase in total immobility time and a 30 % reduction in sucrose preference, when compared to the sham-lesioned group. Dipeptide GK-2 completely averted the onset of these impairments.

**Conclusion.** The dipeptide mimic of NGF, GK-2, mitigates the development of cognitive and psychomotorial impairments in the setting of experimental stroke.

**Keywords:** NGF; dipeptide mimetic; post-stroke depression; post-stroke dementia

## For citations:

Povarnina PYu, Sazonova NM, Nikiforov DM, Gudasheva TA, Dorofeev VL. A study on the mnemotropic and antidepressant-like effects of the low-molecular-weight mimetic of nerve growth factor, dipeptide GK-2, in experimental ischemic stroke. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(1):14–22. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-1-14-22>. EDN: LBOTWJ.

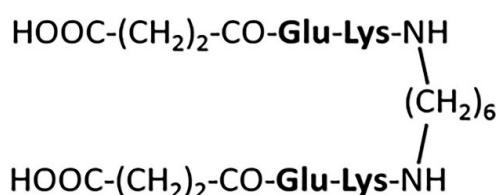
**Received:** 01.03.2024. **Revision received:** 10.03.2024. **Accepted:** 24.03.2024. **Published:** 31.03.2024.

## Введение / Introduction

Разработка новых стратегий лечения ишемического инсульта, сочетающих нейропротекцию и нейрорегенерацию, является одной из наиболее актуальных проблем фармакологии. Как перспективные объекты для разработки рассматриваются нейротрофины, эндогенные регуляторные белки, основные функции которых состоят в защите нервной ткани от повреждающих факторов и в стимуляции репаративных процессов в случае её повреждения. В условиях экспериментального ишемического инсульта нейротрофины оказывают нейропротекторное и нейрорегенеративное действие [1–3].

Полноразмерные нейротрофины имеют серьёзные ограничения для клинического применения в связи с их неудовлетворительными фармакокинетическими свойствами и риском развития побочных эффектов, обусловленных плейотропностью действия [4]. Преодолеть эти ограничения возможно с помощью низкомолекулярных системно-активных миметиков нейротрофинов, обладающих желательным набором фармакологических эффектов из спектра физиологической активности нативных белков и в то же время лишённых их побочных эффектов.

В ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» создан системно-активный димерный дипептидный миметик 4-й петли фактора роста нервов (nerve growth factor, NGF) гексаметилендиамид бис-(моносукцинил-L-глутамил-L-лизина), получивший лабораторный шифр ГК-2 (рис. 1) [Патент РФ №2410392, 2010; Патент ЕПВ EP 2397488, 2019; Патент КНР CN 102365294 B, 2016; Патент Индии 296506, 2018].



**Рис. 1.** Димерный дипептидный миметик 4-й петли NGF ГК-2

**Fig. 1.** Dimeric dipeptide mimetic of the NGF 4th loop compound GK-2

В экспериментах *in vitro* ГК-2 проявлял нейропротекторную активность в микро-наномолярных концентрациях [5]. С помощью Вестерн-блот анализа *in vitro* было установлено, что ГК-2 активирует специфические для полноразмерного фактора роста нервов тирозинкиназные TrkA рецепторы и их PI3K/Akt и PLC-γ пострецепторные пути трансдукции сигнала [6]. Селективность взаимодействия ГК-2 с TrkA рецепторами была подтверждена с помощью нокаутных по-

генам *trka* и *trkb* мышинных гиппокампальных клеток линии НТ-22 [7]. В экспериментах *in vivo* ГК-2 на ряде моделей фокальной и глобальной церебральной ишемии продемонстрировал выраженные нейропротекторные эффекты [8–11]. В условиях транзиторной окклюзии средней мозговой артерии ГК-2 снижал объём инфаркта мозга с эффективностью до 60 %, при этом сохранял активность даже при отставленном на 24 ч после моделирования ишемического инсульта старте введения [11], когда зона инфаркта практически сформирована, что позволило предположить нейрорегенеративные свойства дипептида. Действительно, было установлено, что ГК-2 в условиях экспериментального инсульта стимулирует нейро- и синаптогенез [12].

Поскольку хорошо известно, что когнитивные нарушения и депрессия являются распространёнными осложнениями после инсульта [13, 14], в настоящем исследовании в продолжение определения терапевтического потенциала ГК-2 мы изучили его влияние при хроническом внутрибрюшинном (в/б) введении на развитие экспериментальной постинсультной деменции и депрессии на модели окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) у крыс.

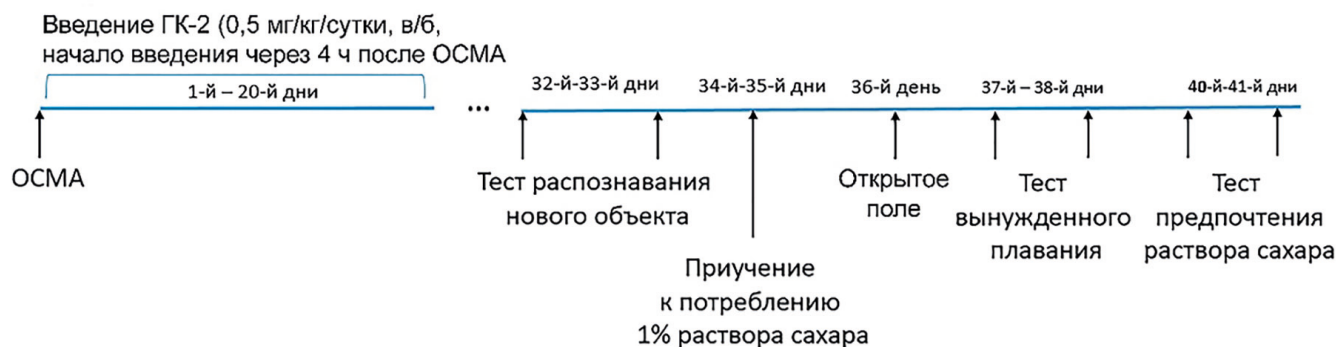
## Материалы и методы / Materials and methods

**Вещества.** ГК-2, гексаметилендиамид бис-(моносукцинил-L-глутамил-L-лизина), синтезирован в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», как описано ранее [15]. Хроматографическая чистота, по данным ОФ ВЭЖХ при  $\lambda$  220 нм, равна 97,4 %;  $[\alpha]^{22}_D = -47,0^\circ$  при  $c = 0,1$  % (m/v) в  $\text{H}_2\text{O}$ . Т.пл. = 120–128 °С.

Хлоральгидрат был приобретён у компании PanReac AppliChem (Дармштадт, Германия).

**Животные.** Эксперименты были проведены на 35 крысах-самцах линии Вистар массой 220–250 г на момент начала эксперимента. Животных содержали в условиях вивария при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному гранулированному корму и воде. Эксперименты с животными проводили в соответствии с «Руководством по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований» (ПРИЛОЖЕНИЕ к Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 года № 33). Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (Протокол №5 от 19.04.2022 г.).

**Моделирование ОСМА** проводили как описано [16]. Все манипуляции осуществляли с помощью титановых микрохирургических инструментов. Крыс вводили в наркоз 5 % раствором хлоральгидрата (350 мг/кг, в/б). Выполняли срединный разрез в области шеи, выделяли



**Рис. 2.** Схема эксперимента. ОСМА — окклюзия средней мозговой артерии  
**Fig. 2.** Experimental design. OCMA — middle cerebral artery occlusion

общую, наружную и внутреннюю сонные артерии. На общую сонную артерию на 1,5 см ниже её бифуркации накладывали микрохирургическую сосудистую клипсу. На внешнюю сонную артерию накладывали хлопчатобумажную нить, плотно затягивали. Крыло-нёбную артерию коагулировали электрокаутером. На внутреннюю сонную артерию накладывали викариловую нить, затягивали не плотно, после чего перерезали внешнюю сонную артерию проксимальнее наложения нити. Гепаринизированную нейлоновую нить диаметром 0,25 мм вводили через культю внешней сонной артерии во внутреннюю сонную артерию на глубину 19–21 мм (до перекрытия средней мозговой артерии) и фиксировали микрососудистой клипсой. Перекрытие кровотока осуществляли в течение 60 мин, после чего нить извлекали из сосуда, восстанавливая кровоснабжение в бассейне средней мозговой артерии. После извлечения нити культю внешней сонной артерии закрывали коагуляцией электрокаутером.

**Дизайн эксперимента.** Крыс случайным образом разделили на 3 группы: «ложная операция» ( $n = 10$ ), «ОСМА» ( $n = 13$ ) и «ОСМА+ГК-2» ( $n = 12$ ). В первые несколько суток после ОСМА погибли по 3 животных из групп «ОСМА» и «ОСМА+ГК-2», выжило, соответственно, 10 и 9 крыс. Дипептид ГК-2 в водном растворе вводили в/б в дозе 0,5 мг/кг в течение 21 дня после операции. Первое введение было через 4 ч после операции. Доза ГК-2 была выбрана как наиболее активная на основании предыдущих экспериментов [12, 17]. Поскольку хорошо известно, что когнитивные нарушения и депрессивноподобное поведение на животных моделях ишемии мозга развиваются примерно через месяц после повреждения [18–20], тестирование на эти нарушения в нашем эксперименте мы проводили на 32–33-й дни после операции в тесте распознавания нового объекта (память), на 36-й день в тесте Открытое поле (двигательная активность) и на 37–38-й дни в тесте вынужденного плавания (депрессивноподобное поведение). Кроме того, мы выявляли агедонию (один из основных симптомов депрессии)

на 40–41-й дни с использованием теста предпочтения раствора сахара. Крыс взвешивали каждые 3 дня на протяжении первых 3 недель после операции. Схема эксперимента представлена на рис. 2.

**Тест распознавания нового объекта** [21] проводили в клетках Т4, идентичных домашним клеткам, в которых содержали животных на протяжении исследования. В ходе теста в клетки помещали объекты трёх разных типов, которые отличались друг от друга цветом, формой и материалом и были близки по размеру — герметичные чёрные жестяные банки цилиндрической формы с жидкостью, бутылочки из бесцветного прозрачного стекла вытянутой формы с оранжевой жидкостью, ёмкости с водой в форме прямоугольного параллелепипеда из прозрачного бесцветного полипропилена с синей этикеткой. Крысу помещали в пустую клетку с опилками на 4 мин для адаптации. Затем в два ближайших угла клетки помещали два одинаковых объекта (фаза ознакомления). Через 4 мин крысу возвращали в домашнюю клетку. Через 1 и 24 ч проводили тестирование для регистрации соответственно кратковременной (Тест 1) и долговременной (Тест 2) памяти. Для этого крысу снова помещали в клетку Т4, в которой в тех же углах уже находилась пара объектов, один из которых был идентичен объектам, предъявлявшимся в фазу ознакомления, а второй был незнакомым. В течение 4 мин регистрировали время исследования объектов. В Тесте 1 и Тесте 2 использовались разные незнакомые объекты. Для исключения влияния предпочтения животными какого-либо из объектов, разным животным предъявляли разный тип объектов в качестве знакомых и незнакомых. Для исключения предпочтения места позиции знакомого и нового объектов (правый и левый угол клетки) меняли от животного к животному. Перед каждым тестом объекты протирали спиртом для уничтожения меток, оставленных предыдущим животным. Обработку видеоданных осуществляли с помощью программы RealTimer (ООО "НПК Открытая Наука", Москва, Россия). Регистрировали время исследования живот-

ными каждого из объектов. Исследованием считали обнюхивание, когда нос животного находился на расстоянии не более 2 см от объекта. В качестве критерия памяти использовали коэффициент дискриминации [22], который рассчитывали по формуле:

$$Кд = (Тнов - Тзн) / (Тнов + Тзн),$$

где Тнов — время исследования нового объекта; Тзн — время исследования знакомого объекта; значения Кд > 0 означают, что животное помнит объект, предъ-являвшийся в фазу ознакомления.

**Открытое поле** широко используется для регистрации двигательной и исследовательской активности [23]. Установка для проведения теста (ООО «НПК Открытая наука», Москва, Россия) представляла собой круглую арену из белого непрозрачного пластика. Диаметр арены 90 см, высота стенок 40 см. Пол арены расчерчен на 19 квадратов примерно одинаковой площади и имеет 13 небольших круглых отверстий. Животное помещали на пол в центре арены и на протяжении 4 мин регистрировали число пересечённых квадратов и вертикальных стоек, а также число актов обнюхивания отверстий.

**Тест вынужденного плавания** [24] проводили как описано [25]. В первый день крыс помещали в сосуды цилиндрической формы диаметром 20 см и высотой 60 см, заполненные на 2/3 водой температурой 24 °С на 10 мин. Через 24 ч проводили тестовую посадку — животных помещали в те же условия на 5 мин, поведение животных регистрировали при помощи видеокамеры. Обработку видеоданных осуществляли с помощью программы RealTimer (ООО «НПК Открытая Наука», Москва, Россия). Регистрировали суммарное время иммобильности.

**Тест предпочтения раствора сахара** широко используется для оценки агедонии (один из основных признаков депрессивно-подобного состояния) у грызунов [26]. Сначала животных приучали к потреблению раствора сахара. Для этого им предоставляли в течение 2 суток свободный доступ одновременно к двум бутылкам, одна из которых содержала 1 % раствор сахара, а другая — обычную воду. Тест проводили через 4 суток после приучения к раствору сахара, на 39–40-й дни после ОСМА. Крыс рассаживали индивидуально и предоставляли в течение 20 ч доступ к двум бутылкам — с водой и с раствором сахара. Потребление воды и раствора сахара оценивали путём взвешивания бутылок до и после теста. Предпочтение раствора сахара вычисляли по следующей формуле:

$$\frac{(\text{Мпотреблённого раствора сахара})}{(\text{Мпотреблённого раствора сахара} + \text{Мпотреблённой воды})} \cdot 100 \%,$$

где М — масса.

**Статистический анализ данных** проводили с помощью компьютерной программы GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Для проверки нор-

мальности распределения использовали W-критерий Шапиро–Уилка. Поскольку выборки имели нормальное распределение, статистическую значимость межгрупповых различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующими попарными межгрупповыми сравнениями с помощью теста Даннета либо двухфакторного дисперсионного анализа с последующими попарными межгрупповыми сравнениями с использованием теста Тьюки. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.

## Результаты исследования / Research results

### Динамика массы тела крыс после ОСМА

У крыс в первую неделю после операции выражено снизилась масса тела, со второй недели они начали набирать массу (рис. 3). Статистически значимая разница по массе тела наблюдалась только между группами «л.о.» и «ОСМА» на 18- и 21-й дни после операции. Хотя ГК-2 и не оказывал статистически значимого эффекта на массу тела крыс, из рис. 3 видно, что динамика массы в группе «ОСМА+ГК-2» более близка к таковой у ложнооперированных животных, чем у животных из группы «ОСМА».

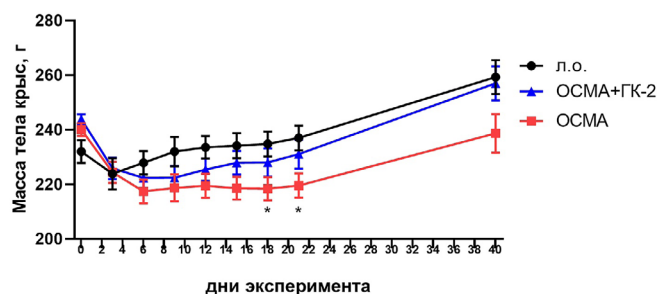


Рис. 3. Динамика массы тела крыс после ОСМА

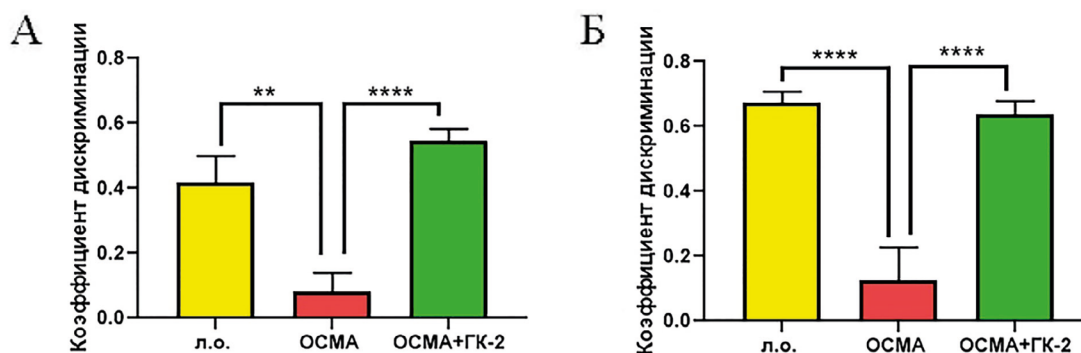
Fig. 3. Dynamics of body weight in rats after ОСМА

Примечание: \*  $p < 0,05$  по сравнению с группой «л.о.» (двухфакторный дисперсионный анализ, тест Тьюки).

Note: \*  $p < 0.05$  compared to the control group (two-way analysis of variance, Tukey's test).

### Дипентид ГК-2 корректирует нарушения памяти

В тесте распознавания нового объекта ложнооперированные животные хорошо помнили объект как через 1 ч (Тест 1, кратковременная память), так и через 24 ч (Тест 2, долговременная память) после ознакомления с ним. Кд в группе ложнооперированных животных составлял в среднем  $0,42 \pm 0,06$  и  $0,67 \pm 0,03$ , соответственно. У животных в группе «ОСМА» была ухудшена кратковременная и долговременная память по сравнению с ложнооперированными. Кд в группе «ОСМА» был снижен примерно на 80 % как в Тесте 1 (до  $0,08 \pm 0,06$ ;  $p = 0,0014$  по сравнению с группой



**Рис. 4.** Дипептид ГК-2 при хроническом в/б введении предотвращает развитие нарушений памяти, вызванных ОСМА, в тесте распознавания нового объекта. Тест проводили через 1 ч и 24 ч после ознакомления животных с объектами для регистрации, соответственно, кратковременной (А) и долговременной (Б) памяти

**Fig. 4.** Dipeptide GK-2 prevents the development of memory impairments induced by OCMA in the novel object recognition test following chronic ip administration. The test was conducted at 1 h and 24 h after the animals were exposed to the objects to respectively assess short-term (A) and long-term (B) memory

*Примечания:* Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  по сравнению с группой «ОСМА» (однофакторный дисперсионный анализ, тест Даннета).

*Notes:* Data are presented as means and standard errors of the mean. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  compared to the "OCMA" group (one-way analysis of variance, Dunnett's test).

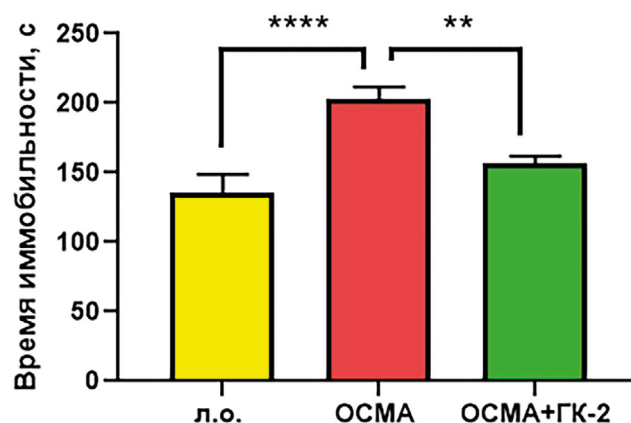
«л.о.»), так и в Тесте 2 (до  $0,13 \pm 0,1$ ;  $p < 0,0001$  по сравнению с группой «л.о.»). Дипептид ГК-2 полностью предотвращал ухудшение кратковременной памяти (Кд в группе «ОСМА+ГК-2» составил  $0,55 \pm 0,04$ ;  $p < 0,0001$  по сравнению с группой «ОСМА»), а также долговременной памяти (Кд в группе «ОСМА+ГК-2» составил  $0,64 \pm 0,04$ ;  $p < 0,0001$  по сравнению с группой «ОСМА») (рис. 4).

Таким образом, ГК-2 при хроническом введении предотвращал развитие нарушений как кратковременной, так и долговременной памяти у крыс после ОСМА.

#### **Дипептид ГК-2 предотвращает развитие депрессивноподобного поведения**

У ложнооперированных животных время иммобильности в тесте вынужденного плавания составило в среднем  $135,6 \pm 13,3$  с. В группе «ОСМА» время иммобильности было статистически значимо ( $p < 0,0001$ ) увеличено примерно на 50 % по сравнению с ложнооперированными животными до  $203,1 \pm 8,5$  с, что свидетельствует о депрессивноподобном состоянии. Дипептид ГК-2 статистически значимо ( $p = 0,005$ ) снижал время иммобильности до  $156,3 \pm 5,7$  с (рис. 5).

Для исключения артефактов в тесте вынужденного плавания (угнетающее действие «ОСМА» и стимулирующий эффект ГК-2) мы изучили двигательную активность животных в тесте «Открытое поле». В этом тесте не было выявлено межгрупповых различий ни по одному из изученных параметров (табл. 1), что позволяет считать интерпретацию результатов теста вынужденного плавания корректной.



**Рис. 5.** Дипептид ГК-2 при хроническом в/б введении предотвращает увеличение времени иммобильности в условиях ОСМА в тесте вынужденного плавания.

**Fig. 5.** Dipeptide GK-2 prevents the increase in immobility time under FST conditions in the forced swim test.

*Примечания:* Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  по сравнению с группой «ОСМА» (однофакторный дисперсионный анализ, тест Даннета).

*Notes:* Data are presented as means and standard errors of the mean. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  compared to the "FST" group (one-way analysis of variance, Dunnett's test).

Ещё один показатель депрессивноподобного состояния — агедония — мы оценивали в тесте предпочтения раствора сахара. Согласно данным литературы, критерием агедонии в данном тесте считают предпочтение раствора сахара  $< 65\%$  [26]. Агедонии

Таблица 1

Двигательная активность крыс в тесте «Открытое поле»

Table 1

Locomotor activity of rats in the "Open Field" test

| Группа    | Горизонтальная двигательная активность (количество пересечённых квадратов) | Вертикальная двигательная активность (количество стоек) | Количество обнюхиваний отверстий |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Л.о.      | 66,1±3,8                                                                   | 5,2±1,0                                                 | 10,8±1,9                         |
| ОСМА      | 69,1±8,0                                                                   | 5,6±3,7                                                 | 10,0±1,4                         |
| ОСМА+ГК-2 | 64,0±4,7                                                                   | 8,7±1,7                                                 | 8,2±1,5                          |

Примечание: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.  
Note: Data are presented as means and standard errors of the mean.

не наблюдалось в группе ложнооперированных животных и у животных, получавших ГК-2 (табл. 2), в обеих этих группах предпочтение раствора сахара составляло около 73 %. Лишь в группе «ОСМА» показатель потребления раствора сахара (около 50 %) соответствовал критериям агедонии ( $p = 0,064$  по сравнению с ложнооперированными животными). Эффект ГК-2 был статистически значимым ( $p = 0,046$  по сравнению с группой «ОСМА»).

Таблица 2

Результаты теста предпочтения раствора сахара

Table 2

Results of the sucrose preference test

| Группа    | Предпочтение раствора сахара, % |
|-----------|---------------------------------|
| Л.о.      | 73,1±6,3                        |
| ОСМА      | 50,3±8,3 #                      |
| ОСМА+ГК-2 | 73,5±4,2 *                      |

Примечания: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего; #  $p = 0,069$  по сравнению с группой «л.о.»; \*  $p < 0,05$  по сравнению с группой «ОСМА» (однофакторный дисперсионный анализ, тест Даннета).  
Notes: Data are presented as means and standard errors of the mean; #  $p = 0,069$  compared to the "control" group; \*  $p < 0,05$  compared to the "CMS" group (one-way analysis of variance, Dunnett's test).

Таким образом, ГК-2 предотвращал развитие депрессивноподобного поведения у крыс после ОСМА по показателям как агедонии, так и «поведенческого отчаяния».

## Обсуждение / Discussion

В настоящем исследовании установлено, что у крыс в условиях ОСМА в отдалённом периоде развивались нарушения кратковременной и долговременной памяти в тесте распознавания нового объекта

и депрессивноподобное состояние, выразившееся в увеличении времени иммобильности в тесте вынужденного плавания и агедонии в тесте предпочтения раствора сахара. Дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 при хроническом введении после моделирования инсульта полностью противодействовал развитию всех этих нарушений. Для ГК-2 ранее были выявлены мнемотропные эффекты в физиологических условиях [27] и в условиях фокальной ишемии, вызванной фототромбозом коры головного мозга [8]. Дипептид ГК-2 проявлял в физиологических условиях и слабую антидепрессантоподобную активность при субхроническом введении [28].

Корректирующее действие ГК-2 в отношении когнитивных и психоэмоциональных нарушений в условиях ОСМА согласуются с данными литературы об эффектах полноразмерного NGF. Так, на модели ОСМА у крыс было показано, что увеличение экспрессии NGF в головном мозге с помощью внесения псевдолентивирусного вектора, содержащего ген *ngf*, способствует практически полному восстановлению ухудшенной памяти в водном лабиринте Морриса [1]. Такой же эффект был получен при внесении лентивирусного вектора, содержащего ген *ngf*, в гиппокамп крыс после травмы мозга [29]. В клинических исследованиях было установлено, что низкий уровень NGF в плазме крови ассоциирован с высокой вероятностью развития постинсультной депрессии [30].

Предполагают [31], что одним из основных механизмов развития постинсультных когнитивных и психоэмоциональных нарушений является ухудшение нейропластичности гиппокампа, который является ключевой структурой, отвечающей за формирование памяти и эмоциональных состояний [32]. Посмертные исследования показали, что объём гиппокампа снижен у пациентов с постинсультной деменцией по сравнению с теми, у кого не наблюдалось нарушения когнитивных функций после инсульта [33]. В другом исследовании была установлена корреляция между снижением объёма гиппокампа (по данным МРТ), увеличением концентрации маркеров воспаления в плазме крови и когнитивным дефицитом через 6 и 12 месяцев после перенесённого инсульта [34]. Выявлена в посмертных исследованиях также взаимосвязь между снижением объёма гиппокампа и депрессией [35]. Вторичная нейродегенерация в гиппокампе после ишемического инсульта может быть обусловлена угнетением гиппокампального нейрогенеза вследствие воздействия глюкокортикоидов на фоне хронического стресса [36], а также нейровоспаления [37, 38]. Хорошо известно [39], что гиппокампальный нейрогенез играет важную роль как в процессах памяти, так и в поддержании эмоционального статуса.

Показано [40], что NGF участвует в регуляции гиппокампального нейрогенеза, способствуя поддержанию жизнеспособности нейробластов. Также установлено [41], что NGF вовлечён в регуляцию си-

наптической пластичности в гиппокампе, в частности он необходим для индукции долговременной потенциации, лежащей в основе формирования памяти. Нормализующие эффекты NGF в отношении постинсультной депрессии и деменции могут быть опосредованы не только его прямым действием на синаптическую пластичность и гиппокампальный нейрогенез, но и способностью стимулировать синтез мозгового нейротрофического фактора, одного из основных регуляторов нейропластичности гиппокампа [42, 43].

Нами ранее было показано, что в условиях ОСМА ГК-2 полностью восстанавливает угнетённый гиппокампальный нейрогенез (по маркеру пролиферации Ki-67) [12]. Этот эффект ГК-2 может лежать в основе нормализующего действия дипептида в отношении экспериментальной постинсультной депрессии и когнитивных нарушений.

Следует отметить, что в условиях ОСМА ГК-2 при хроническом введении не способствовал снижению

массы тела — динамика массы тела крыс, получавших ГК-2, не отличалась от таковой у ложнооперированных животных. В то же время катастрофическое снижение массы тела является одним из основных побочных эффектов полноразмерного NGF [44, 45]. Ранее нами было показано в физиологических условиях, что ГК-2 при хроническом введении не влияет на массу тела крыс [6].

### Заключение / Conclusion

Таким образом, димерный дипептидный миметик NGF ГК-2 при хроническом в/б введении после экспериментального инсульта полностью противодействует развитию нарушений памяти и депрессивноподобного поведения у крыс подобно полноразмерному нейротрофину, что расширяет возможности потенциального применения дипептида для лечения постинсультного состояния.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

### Конфликт интересов

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

### Участие авторов

*Поварнина П. Ю.* — дизайн эксперимента, выполнение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов, написание текста; *Сазонова Н. М.* — синтез дипептида ГК-2; *Никифоров Д. М.* — выполнение экспериментальной работы, статистический анализ данных; *Гудашева Т. А.* — постановка задачи, координация работы исследователей, редактирование текста; *Дорофеев В. Л.* — обсуждение результатов, редактирование текста.

## ADDITIONAL INFORMATION

### Conflict of interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.

### Authors' participation

*Povarnina PYu* — experimental design, execution of experimental work, analysis and interpretation of results, manuscript writing; *Sazonova NM* — synthesis of the dipeptide GK-2; *Nikiforov DM* — execution of experimental work, statistical analysis of data; *Gudasheva TA* — task formulation, coordination of researchers' work, manuscript editing; *Dorofeev VL* — discussion of results, manuscript editing.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

### Поварнина Полина Юрьевна

#### Автор, ответственный за переписку

к. б. н., в. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
e-mail: povarnina\_pyu@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>  
РИНЦ SPIN-код: 5498-6724

### Polina Yu. Povarnina

#### Corresponding author

PhD, Cand. Sci. (Biol.), Leading Research Scientist of the Laboratory of Peptide Bioregulators of the Medicinal Chemistry Department Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation  
e-mail: povarnina\_pyu@academpharm.ru  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>  
RSCI SPIN code: 5498-6724

**Сазонова Нелля Михайловна**

к. х. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7608-7419>

**Nellya M. Sazonova**

PhD, Cand. Sci. (Chemistry), Senior Research Scientist of the Laboratory of Peptide Bioregulators of the Medicinal Chemistry Department Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7608-7419>

**Никифоров Дмитрий Михайлович**

м. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8901-3101>  
РИНЦ SPIN-код: 7028-8335

**Dmitriy M. Nikiforov**

Junior Research Scientist of the Laboratory of Peptide Bioregulators of the Medicinal Chemistry Department Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8901-3101>  
RSCI SPIN code: 7028-8335

**Гудашева Татьяна Александровна**

д. б. н., профессор, член-корреспондент РАН, руководитель отдела химии лекарственных средств «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5185-4474>  
РИНЦ SPIN-код: 4970-0006

**Tatiana A. Gudasheva**

PhD, Dr. Sci. (Biology), Professor, RAS corresponding member, Head of medicinal chemistry department Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5185-4474>  
RSCI SPIN code: 4970-0006

**Дорофеев Владимир Львович**

д. фарм. н., профессор, и/о генерального директора «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-3584-3742>

**Vladimir L. Dorofeev**

PhD, Dr. Sci. (Pharm), Professor, Acting General Director of Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation  
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-3584-3742>

**Список литературы / References**

1. Cao JY, Lin Y, Han YF, et al. Expression of nerve growth factor carried by pseudotyped lentivirus improves neuron survival and cognitive functional recovery of post-ischemia in rats. *CNS Neurosci Ther.* 2018;24(6):508-518. doi: 10.1111/cns.12818.
2. Guan J, Tong W, Ding W, et al. Neuronal regeneration and protection by collagen-binding BDNF in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Biomaterials.* 2012;33(5):1386-1395. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.073.
3. Zhu W, Cheng S, Xu G, et al. Intranasal nerve growth factor enhances striatal neurogenesis in adult rats with focal cerebral ischemia. *Drug Deliv.* 2011;18(5):338-343. doi: 10.3109/10717544.2011.557785.
4. El Ouamari Y, Van den Bos J, Willekens B, et al. Neurotrophic Factors as Regenerative Therapy for Neurodegenerative Diseases: Current Status, Challenges and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 15;24(4):3866. doi: 10.3390/ijms24043866.
5. Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Исследование *in vitro* нейропротективных свойств нового оригинального миметика фактора роста нервов ГК-2. *Бюлл. эксп. биол. мед.* 2010;150(11):537-540. [Antipova TA, Gudasheva TA, Seredenin SB. *In vitro* study of neuroprotective properties of GK-2, a new original nerve growth factor mimetic. *Bull Exp Biol Med.* 2011;150(5):607-609. (In Russ.)]. doi: 10.1007/s10517-011-1202-6.
6. Gudasheva TA, Povarnina PY, Antipova TA, et al. Dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor Loop 4 and Loop 1 activate TRKA with

different patterns of intracellular signal transduction. *J Biomed Sci.* 2015;22:106. doi: 10.1186/s12929-015-0198-z.

7. Антипова Т.А., Деев И.Е., Гудашева Т.А. и др. Доказательство селективности взаимодействия дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 с TrkA-рецептором с использованием нокаутных по генам *trka* и *trkb* клеток линии НТ-22. *Химико-фармацевтический журнал.* 2022;56(12):18-22. [Antipova TA, Deev IE, Gudasheva TA, et al. Evidence of the selectivity of interaction of nerve growth factor dipeptide mimetic GK-2 with TrkA receptor using *TrkA* and *TrkB* knockout HT-22 cells. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2023;56:1568-1572. (In Russ.)]. doi: 10.1007/s11094-023-02828-x.
8. Середенин С.Б., Романова Г.А., Гудашева Т.А. и др. Нейропротективное и антиамнестическое действие дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 при экспериментальном ишемическом инфаркте коры головного мозга. *Бюлл. эксп. биол. мед.* 2010;150(10):406-409. [Seredenin SB, Romanova GA, Gudasheva TA, et al. Neuroprotective and antiamnestic effect of nerve growth factor dipeptide mimetic GK-2 in experimental ischemic infarction of brain cortex. *Bull Exp Biol Med.* 2011;150(4):432-435. (In Russ.)]. doi: 10.1007/s10517-011-1161-y.

9. Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А., Воронцова О.Н. и др. Нейропротекторные эффекты димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 на модели двусторонней необратимой перевязки сонных артерий у крыс. *Экспериментальная и Клиническая Фармакология.* 2012;75(9):15-20. [Povarnina PYu, Gudasheva TA, Vorontsova ON, et al. Neuroprotective effects of a dipeptide mimetic on the GK-2 nerve growth factor in model of permanent

common carotid artery occlusion in rats. *Exper Clin Pharmacol*. 2012;75(9):15-20. (In Russ.). doi: 10.30906/0869-2092-2012-75-9-15-20.

10. Зарзешский Ю.В., Аврущенко М.Ш., Мороз В.В., и др. Эффективность миметика фактора роста нервов ГК-2 для предупреждения постреанимационных изменений мозга. *Бюлл. экп. биол. мед.* 2015;159(4):442-445. [Zarzhetskiy YuV, Avruschenko MSh, Moroz VV, et al. Effectiveness of GK-2, a Nerve Growth Factor Mimetic, in Preventing Post-Resuscitation Changes in the Brain. *Bull Exp Biol Med*. 2015 Aug;159(4):453-455. (In Russ.).] doi: 10.1007/s10517-015-2989-3.

11. Середенин С.Б., Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А. Экспериментальная оценка терапевтического окна нейротропной активности препарата ГК-2, низкомолекулярного миметика фактора роста нервов. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2018;118(7):49-53. [Seredenin SB, Povarnina PYu, Gudasheva TA. An experimental evaluation of the therapeutic window of the neuroprotective activity of a low-molecular nerve growth factor mimetic GK-2. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2018;118(7):49-53. (In Russ.).] doi: 10.17116/jnevro20181187149.

12. Гудашева Т.А., Поварнина П.Ю., Волкова А.А. и др. Дипептидный миметик фактора роста нервов стимулирует нейрогенез и синаптогенез в гиппокампе и стриатуме взрослых крыс с фокальной церебральной ишемией. *Acta Naturae*. 2019;11(3):37-43. [Gudasheva TA, Povarnina PY, Volkova AA, et al. A Nerve Growth Factor Dipeptide Mimetic Stimulates Neurogenesis and Synaptogenesis in the Hippocampus and Striatum of Adult Rats with Focal Cerebral Ischemia. *Acta Naturae*. 2019 Jul-Sep;11(3):31-37. (In Russ.).] doi: 10.32607/20758251-2019-11-3-31-37.

13. Ayerle L, Ayis S, Wolfe CD, Rudd AG. Natural history, predictors and outcomes of depression after stroke: systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2013;202(1):14-21. doi: 10.1192/bjp.bp.111.107664.

14. Pendlebury ST, Rothwell PM. Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2009;8(11):1006-1018. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70236-4.

15. Сазонова Н.М., Тарасюк А.В., Курилов Д.В. и др. Синтез димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2, потенциального нейротропного препарата. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(7):10-19. [Sazonova NM, Tarasyuk AV, Kurilov DV, et al. Synthesis of two-dimensional dipeptide mimetic of nerve growth factor: new potential neuroprotective drug. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(7):10-19. (In Russ.).] doi: 10.1007/s11094-015-1301-1.

16. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20(1):84-91. doi: 10.1161/01.str.20.1.84.

17. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Создание фармакологически активной малой молекулы, обладающей свойствами фактора роста нервов. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2015;115(6):63-70. [Seredenin SB, Gudasheva TA. The development of a pharmacologically active low-molecular mimetic of the nerve growth factor. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2015;115(6):63-70. (In Russ.).] doi: 10.17116/jnevro20151156163-70.

18. Li W, Huang R, Shetty RA, et al. Transient focal cerebral ischemia induces long-term cognitive function deficit in an experimental ischemic stroke model. *Neurobiol Dis*. 2013;59:18-25. doi: 10.1016/j.nbd.2013.06.014.

19. Kuts R, Melamed I, Shiyntum HN, et al. A Middle Cerebral Artery Occlusion Technique for Inducing Post-stroke Depression in Rats. *J Vis Exp*. 2019 May 22;(147). doi: 10.3791/58875.

20. Ifergane G, Boyko M, Frank D, et al. Biological and Behavioral Patterns of Post-Stroke Depression in Rats. *Can J Neurol Sci*. 2018;45(4):451-461. doi: 10.1017/cjn.2017.302.

21. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 1988;31(1):47-59. doi: 10.1016/0166-4328(88)90157-x.

22. Beldjoud H, Barsegyan A, Roozendaal B. Noradrenergic activation of the basolateral amygdala enhances object recognition memory and induces chromatin remodeling in the insular cortex. *Front Behav Neurosci*. 2015;9:108. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00108.

23. Henry BL, Minassian A, Young JW, et al. Cross-species assessments of motor and exploratory behavior related to bipolar disorder. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010;34(8):1296-1306. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.04.002.

24. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*. 1978;47(4):379-391. doi: 10.1016/0014-2999(78)90118-8.

25. Kawai H, Kodaira N, Tanaka C, et al. Time of Administration of Acute or Chronic Doses of Imipramine Affects its Antidepressant Action in Rats. *J Circadian Rhythms*. 2018;16:5. doi: 10.5334/jcr.156.

26. Scheggi S, De Montis MG, Gambarana C. Making Sense of Rodent Models of Anhedonia. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2018 Nov 1;21(11):1049-1065. doi: 10.1093/ijnp/ryu083.

27. Волкова А.А., Поварнина П.Ю., Никифоров Д.М. и др. Сравнительное изучение мнемотропной активности димерных дипептидных миметиков отдельных петель NGF и BDNF в тесте распознавания нового объекта у крыс. *Химико-фармацевтический журн.* 2022;56(4):3-6 [Volkova AA, Povarnina PY, Nikiforov DM et al. Comparative study of the mnemotropic activity of dimeric dipeptide mimetics of individual NGF and BDNF loops using a new-object recognition test in rats. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;56:429-432. (In Russ.).] doi: 10.1007/s11094-022-02656-5.

28. Mezhlumyan AG, Tallerova AV, Povarnina PY, et al. Antidepressant-like Effects of BDNF and NGF Individual Loop Dipeptide Mimetics Depend on the Signal Transmission Patterns Associated with Trk. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(3):284. doi: 10.3390/ph15030284.

29. Lin Y, Wan JQ, Gao G, et al. Direct hippocampal injection of pseudo lentivirus-delivered nerve growth factor gene rescues the damaged cognitive function after traumatic brain injury in the rat. *Biomaterials*. 2015;69:148-157. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.010.

30. Meng G, Ma X, Li L, et al. Predictors of early-onset post-ischemic stroke depression: a cross-sectional study. *BMC Neurol*. 2017;17(1):199. doi: 10.1186/s12883-017-0980-5.

31. Шишкина Г.Т., Калинина Т.С., Гуляева Н.В. и др. Изменение экспрессии генов и нейровоспаление в гиппокампе после фокальной ишемии мозга: участие в индукции длительных когнитивных и психоэмоциональных нарушений. *Биохимия*. 2021; 86(6):805-815. doi: 10.31857/S032097252106004X. [Shishkina GT, Kalinina TS, Gulyaeva NV, et al. Changes in gene expression and neuroinflammation in the hippocampus after focal brain ischemia: involvement in the long-term cognitive and mental disorders. *Biochemistry*. 2021;86(6):657-666. (In Russ.).] doi: 10.1134/S0006297921060043.

32. Phelps EA. Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol*. 2004 Apr;14(2):198-202. doi: 10.1016/j.conb.2004.03.015.

33. Gemmell E, Bosomworth H, Allan L, et al. Hippocampal neuronal atrophy and cognitive function in delayed poststroke and aging-related dementias. *Stroke*. 2012 Mar;43(3):808-14. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.636498.

34. Kliper E, Bashat DB, Bornstein NM, et al. Cognitive decline after stroke: relation to inflammatory biomarkers and hippocampal volume. *Stroke*. 2013;44(5):1433-1435. DOI:10.1161/STROKEAHA.111.000536.

35. Cobb JA, Simpson J, Mahajan GJ, et al. Hippocampal volume and total cell numbers in major depressive disorder. *J Psychiatr Res*. 2013;47(3):299-306. doi: 10.1016/j.jpsychires.2012.10.020.

36. Odaka H, Adachi N, Numakawa T. Impact of glucocorticoid on neurogenesis. *Neural Regen Res*. 2017;12(7):1028-1035. doi: 10.4103/1673-5374.211174.

37. Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*. 2003;302(5651):1760-1765. doi: 10.1126/science.1088417.

38. Vasic V, Schmidt MHH. Resilience and Vulnerability to Pain and Inflammation in the Hippocampus. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4):739. doi: 10.3390/ijms18040739.

39. Anacker C, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility – linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci*. 2017;18(6):335-346. doi: 10.1038/nrn.2017.45.

40. Frielingsdorf H, Simpson DR, Thal LJ, Pizzo DP. Nerve growth factor promotes survival of new neurons in the adult hippocampus. *Neurobiol Dis*. 2007;26(1):47-55. doi: 10.1016/j.nbd.2006.11.015.

41. Conner JM, Franks KM, Titterness AK, et al. NGF is essential for hippocampal plasticity and learning. *J Neurosci*. 2009;29(35):10883-10889. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2594-09.2009.

42. Tirassa P. The nerve growth factor administered as eye drops activates mature and precursor cells in subventricular zone of adult rats. *Arch Ital Biol*. 2011;149(2):205-213. doi: 10.4449/aib.v149i1.1359.

43. Patz S, Wahle P. Neurotrophins induce short-term and long-term changes of cortical neurotrophin expression. *Eur J Neurosci*. 2004;20(3):701-708. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03519.x.

44. Eriksdotter Jönhagen M, Nordberg A, Amberla K, et al. Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 1998 Sep-Oct;9(5):246-57. doi: 10.1159/000017069.

45. Tagliatala G, Foreman PJ, Perez-Polo JR. Effect of a long-term nerve growth factor treatment on body weight, blood pressure, and serum corticosterone in rats. *Int J Dev Neurosci*. 1997;15(6):703-710. doi: 10.1016/s0736-5748(97)00032-4.