

ISSN 2587-7836 (print)
ISSN 2686-8830 (online)

ФАРМАКО КИНЕТИКА и ДИНАМИКА

Включен в перечень рецензируемых
научных журналов ВАК РФ



№3.2024



Главный редактор

Жердев Владимир Павлович

д. м. н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, Москва

Зам. главного редактора

Смирнов Валерий Валерьевич

д. фарм. н., Москва

Ответственный секретарь

Литвин Александр Алексеевич

д. б. н., Москва

Редакционная коллегия

Бондарева Ирина Борисовна
д. б. н., Москва

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

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

Дорофеев Владимир Львович
д. фарм. н., профессор, Москва

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

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

Колик Лариса Геннадьевна
д. б. н., профессор РАН, Москва

**Колыванов Геннадий
Борисович**, д. б. н., Москва

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

Мирошниченко Игорь Иванович
д. м. н., Москва

Рудакова Алла Всеволодовна
д. фарм. н., профессор,
Санкт-Петербург

**Раменская
Галина Владиславовна**
д. фарм. н., профессор, Москва

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

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

Сычёв Дмитрий Алексеевич
академик РАН, д. м. н.,
профессор, Москва

Тюрников Иван Николаевич
член-корр. РАН, д. м. н.,
профессор, Волгоград
д. б. н., профессор РАН, Москва

Хохлов Александр Леонидович
академик РАН, д. м. н.,
профессор, Ярославль

Выпускающая группа

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

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

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

Подписано в печать 30.09.2024 г. Тираж 400 экз.

Типография: ООО «Буки Веди», www.bukivedi.com
115093, г. Москва, Партийный переулок, д. 1, корп. 58, стр. 3, пом. 11

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

NEICON (лаборатория Elrub) — создание и поддержка сайта журнала www.
pharmacokinetics.ru на платформе Elrub.

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информацион-
ных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор) 04.02.2021 года свидетельство о
регистрации СМИ ПИ № ФС 77-80349. ISSN 2587-7836. Журнал включен в перечень ВАК.
Авторские материалы не обязательно отражают точку зрения редакции. Редакция не несет
ответственности за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах.

Сайты

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru
www.ClinVest.ru
www.MyRWD.ru
www.Patient-Oriented.ru
www.PharmacoGenetics-Pharmaco-
Genomics.ru

Журналы

Антибиотики и Химиотерапия
Качественная клиническая практика
Реальная клиническая практика: данные и доказательства
Пациентоориентированная медицина и фармация
Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru
www.izdat-oki.ru

Центр Фармакоэкономических Исследований
Издательство ОКИ

ОБЗОРЫ

Сенесенс. Сердце. Сенотерапия
Крыжановский С. А., Вититнова М. Б. 3

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА

Роль биотрансформации и химического строения
лекарственных средств в диагностике лекарственной
аллергии
Мясникова Т. Н., Смирнов В. В. 20

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Синтез и изучение антидепрессантоподобного эффекта
гексаметилендиамида бис-(N-моносукцинил-D-серил-
D-лизина), энантиомера дипептидного миметика
BDNF ГСБ-106
Сазонова Н. М., Тарасюк А. В., Филиппова М. Ю.,
Мельникова М. В., Никифоров Д. М., Поварнина П. Ю.,
Гудашева Т. А., Дорофеев В. Л. 25

Исследование влияния КАПАХ, мемантина и ривастигмина
на поведение и когнитивные функции крыс
Никитин Д. О., Семин И. И., Валеева Е. В.,
Никитина А. В., Хафизова А. З., Овчинникова А. Г. 38

Противоопухолевые эффекты антагониста
тирозинкиназных TrkA рецепторов соединения
ГК-1 у мышей с перевиваемой аденокарциномой
молочной железы Ca755
Коваленко Л. П., Поварнина П. Ю., Журиков Р. В.,
Алексеева С. В., Колик Л. Г., Гудашева Т. А.,
Дурнев А. Д., Дорофеев В. Л. 49

Влияние цикло-L-пролилглицина на пороги болевой
реакции и морфин-индуцированную анальгезию
у инбредных мышей линий BALB/c и C57Bl/6
Надорова А. В., Колясников К. Н., Чернякова И. В.,
Колик Л. Г. 57

НЕКРОЛОГ

ПАМЯТИ Островской Риты Ушеровны 67



Chief editor

Vladimir P. Zherdev

Ph.D., Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Moscow

Deputy chief editor

Valery V. Smirnov

Ph.D., Moscow

Executive secretary

Alexander A. Litvin

Ph.D., Moscow

EDITORIAL BOARD

Irina B. Bondareva

Ph.D., Moscow

Tatiana A. Voronina

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

Olga A. Gromova

Ph.D., Professor, Ivanovo

Vladimir L. Dorofeev

Ph.D., Professor, Moscow

Andrey D. Durnev

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

Georgiy I. Kovalev

Ph.D., Professor, Moscow

Larisa G. Colic

Ph.D., Professor, Moscow

Gennady B. Kolyvanov

Ph.D., Moscow

Ruben S. Mirzoyan

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

Igor I. Miroshnichenko

Ph.D., Moscow

Alla V. Rudakova

Ph.D., Professor, St. Petersburg

Galina V. Ramenskaya

Ph.D., Professor, Moscow

Alexander A. Spasov

Academician RAS, Ph.D.,
Professor, Moscow

Alex K. Starodubtsev

Ph.D., Professor, Moscow

Dmitry A. Sychev

Academician RAS,
Ph.D., Professor, Moscow

Ivan N. Tyurenkov

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

Alexander L. Khokhlov

Academician RAS, Ph.D.,
Professor, Yaroslavl

ISSUING GROUP

Dmitry Yu. Belousov

Managing Editor

+7 (910) 449-22-73

e-mail: clinvest@mail.ru

Elena V. Afanaseva

CEO in LLC «Publishing OKI»
subscription

+7(916)986-04-65

e-mail: eva88@list.ru

site: www.izdat-okl.ru

Elena V. Zhuk

Design and layout

e-mail: elenazuk70@mail.ru

Signed in print 30.09.2024. **Circulation** 400 copies.

Typography: LLC Buki Vedi, www.bukivedi.com

115093, Moscow, Partinnyj pereulok, 1/58, bld. 3, office 11

Editorial address: 125315, Moscow, ul. Baltiskay, 8 Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies

Tel./Fax: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

NEICON (Elpub Lab) — www.pharmacokinetica.ru creation and support on the Elpub Platform.

The journal was registered with the Federal Service for Supervision in the Sphere of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor) on 02/04/2021, the certificate of registration of the mass media PI No. FS 77-80349. ISSN 2587-7836. **The journal is included in the list of Higher Attestation Commission (HAC) of Russian Federation.** Copying material does not necessarily reflect the views of the publisher. We take no responsibility for the accuracy of the information contained in promotional materials.

Sites

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru

www.ClinVest.ru

www.MyRWD.ru

www.Patient-Oriented.ru

www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

Journals

Antibiotics and Chemotherapy

Good Clinical Practice

Real-World Data & Evidence

Patient-Oriented Medicine and Pharmacy

Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

www.HealthEconomics.ru

www.izdat-okl.ru

Center of Pharmacoeconomics Research

Publisher OKI

REVIEWS

Senesens. Heart. Senotherapy
Kryzhanovskii SA, Vititnova MB 3

CLINICAL PHARMACOKINETICS

The role of biotransformation and chemical structure
of drugs in the diagnosis of drug allergies
Myasnikova TN, Smirnov VV 20

PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

Synthesis and the antidepressant-like activity investigation
of bis-(N-monosuccinyl-D-tyrosyl-D-lysine)
hexamethylenediamide, the DD-enantiomer
of the BDNF dipeptide mimetic, compound GSB-106
Sazonova NM, Tarasiuk AV, Filippova MYu, Melnikova MV,
Nikiforov DM, Povarnina PYu, Gudasheva TA,
Dorofeev VL 25

Effects of CAPAH, memantine, and rivastigmine
on behavioral and cognitive functions of rats
Nikitin DO, Semina II, Valeeva EV, Nikitina AV,
Khafizova AZ, Ovchinnikova AG 38

Anticancer activity of tyrosine kinase TrkA receptors
antagonist GK-1 in experiment on mice with mammary
gland adenocarcinoma Ca755
Kovalenko LP, Povarnina PYu, Zhurikov RV, Alexeeva SV,
Kolik LG, Gudasheva TA, Durnev AD, Dorofeev VL 49

Effect of cyclo-L-prolylglycine on pain response thresholds
and morphine-induced analgesia in inbred BALB/c
and C57Bl/6 mice
Nadorova AV, Koliashnikova KN, Chernyakova IV, Kolik LG 57

OBITUARY

In Memory of Rita U. Ostrovskaya 67



Сенесенс. Сердце. Сенотерапия

Крыжановский С. А., Вититнова М. Б.

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

Аннотация

Сенесенс — клеточное старение — особая форма гибели клетки, характеризующаяся необратимой утратой клеткой её пролиферационного потенциала и развитием устойчивости к апоптозу. В основе сенесенса лежит истирание (укорочение) теломер, происходящее при каждом последующем делении клетки, что, в конечном итоге, приводит к устойчивому повреждению ДНК и последующей активации программы клеточного старения. Сенесцентным клеткам присущ уникальный так называемый сенесенс-ассоциированный секреторный фенотип (SASP), т. е. способность стареющих клеток секретировать во внеклеточную среду большое количество патогенных факторов, действующих паракринно на неповреждённые клетки и переводящих их в состояние сенесенса. В обзоре литературы рассматриваются известные механизмы, ответственные за формирование различных типов сенесенса, описываются особенности сенесенс-обусловленного поражения сердца и приводится подробная характеристика биологически активных соединений и лекарственных средств, обладающих сенолитической (активаторы апоптоза) и/или сеностатической (ингибиторы SASP) активностью..

Ключевые слова: клеточная гибель; теломеры; сенесенс; сенесенс-ассоциированный секреторный фенотип; сенолитики; сеностатики

Для цитирования:

Крыжановский С. А., Вититнова М. Б. Сенесенс. Сердце. Сенотерапия. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(3):3–19. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-3-3-19>. EDN: EZRHZW

Поступила: 03.08.2024. **В доработанном виде:** 05.09.2024. **Принята к печати:** 24.09.2024. **Опубликована:** 30.09.2024.

Senesens. Heart. Senotherapy

Sergey A. Kryzhanovskii, Marina B. Vititnova

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

Abstract

Senescence — cellular aging — is a special form of cell death, characterized by the cell's irreversible loss of its proliferation potential and the development of resistance to apoptosis. Senescence is based on the attrition (shortening) of telomeres that occurs with each subsequent cell division, which ultimately leads to sustained DNA damage and subsequent activation of the cellular aging program. Senescent cells have a unique so-called senescence-associated secretory phenotype (SASP), i.e. the ability of aging cells to secrete into the extracellular environment a large number of pathogenic factors that act paracrine on undamaged cells and transfer them to a state of senescence. The literature review examines the known mechanisms responsible for the formation of various types of senescence, describes the features of senescence-related cardiac damage, and provides a detailed description of biologically active compounds and drugs with senolytic (apoptosis activators) and/or senostatic (SASP inhibitors) activity.

Keywords: cell death; senescence telomeres; senescence-associated secretory phenotype; senolytics; senostatics

For citations:

Kryzhanovskii SA, Vititnova MB. Senesens. Heart. Senotherapy. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(3):3–19. (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-3-3-19>. EDN: EZRHZW

Received: 03.08.2024. **Revision received:** 05.09.2024. **Accepted:** 24.09.2024. **Published:** 30.09.2024.

Введение / Introduction

Впервые о возможности/наличии регулируемой клеточной гибели сообщил в 1841 году немецкий естествоиспытатель *Карл Фогт*, показавший присутствие в организме здоровых жаб отмирающих клеток [1]. Однако интерес к этой проблеме возник лишь в 1972 году, после публикации в журнале *Br. J. Cancer* результатов исследования *Д. Керра с соавт.*, которые показали, что так называемый «усадочный» (shrinkage) некроз может возникать в ответ на физиологические стимулы и, по-видимому, играет дополнительную, но противоположную митозу, роль в регуляции популя-

ций клеток животных и также может быть вовлечён как в физиологическую инволюцию, так и в атрофию различных тканей и органов [2]. *Kerr JF с соавт.* определили этот процесс как форму запрограммированной клеточной гибели (PCD) с морфологическими признаками, которые отличают её от некроза, и предложили назвать этот феномен в противоположность митозу апоптозом.

В отличие от случайной клеточной гибели (ACD) — мгновенной и катастрофической гибели клеток, подвергшихся экстремальным воздействиям физического (например, высокое давление, температура), химического (например, резкие колебания pH)

и/или механического (например, сдвигающие усилия) характера, — в основе PCD лежит тот или иной молекулярный механизм [3].

Ранние классификации PCD были основаны на визуальных, морфогистологических характеристиках изменений, выявляемых в отдельных отмирающих клетках, и включали в себя некроз, онкотический некроз, апоптоз, апопто-некроз [4–6].

Однако накопленный за последние десятилетия материал достаточно подробно раскрыл и охарактеризовал набор генетически закодированных внутриклеточных программ целенаправленного удаления избыточных, необратимо повреждённых и/или потенциально «токсичных» клеток [7, 8] и позволил выделить следующие формы PCD: ферроптоз, пироптоз, некроптоз, партанатоз, энто-тическую гибель клеток, нетотическую гибель клеток, аноикоз, некроз, управляемый МРТ, лизосомозависимую, аутофагозависимую и иммуногенную гибель клеток [9, 10].

Помимо PCD, выделяют особую форму гибели клетки — клеточное старение, сенесенс — характеризующуюся необратимой утратой клеткой её пролиферационного потенциала, т. е. постоянной остановкой клеточного цикла, при этом клетка становится устойчивой к апоптозу [11]. Фундаментальные изыскания в области патобиологии сенесенса, проведённые за последние два десятилетия, привели к появлению нового направления исследований — созданию нового класса препаратов — сенотерапевтических лекарственных средств, которые способны использовать различия между стареющими и нестареющими клетками для селективной индукции апоптоза в сенесцентных клетках и/или подавления их секреторного фенотипа [12–14]. Полагают, что наиболее перспективными в этом плане являются препараты, «нацеленные» на антиапоптотические пути, активирующиеся в сенесцентных клетках [15, 16].

Сенесенс. Общие положения / Senesens. General provisions

В 1891 году немецкий зоолог, один из основоположников эволюционного учения Фридрих Вейсман предположил, что «смерть организма наступает из-за того, что изношенная ткань не может вечно обновляться, и, следовательно, способность к увеличению продолжительности жизни посредством клеточного деления не вечна, а конечна» [17]. Через 80 лет, в 1961 году, американские геронтологи Хейфлик Л. и Мурхед П. предложили термин «senescence» или «cellular senescence» (SnCs или SNC), который подразумевал под собой клеточное старение, отличающийся по смыслу от термина «старение организма», обозначаемое словом «aging» [18]. Авторы показали, что после прохождения определённого количества делений (от 50 до 60 раз), нормальные человеческие диплоидные фибробласты перестают делиться и вступают в необратимое состояние — реплицирующее старение. Позднее число делений клеток, завершённых до достижения

конца их реплицирующей продолжительности жизни, было названо пределом Хейфлика. 10 лет спустя первое объяснение этому феномену дал отечественный биолог Оловников А.М., который показал, что лимит клеточных делений связан с постепенным укорочением концевых участков ДНК — теломер [19].

Теломеры представляют собой повторяющиеся последовательности ДНК, связанные с белковым комплексом, известным как шелтерин (комплекс, защищающий теломеры от механизмов репарации ДНК и регулирующий активность обратной транскриптазы — теломеразы) [20]. Шелтерин, в свою очередь, формирует так называемые лариате — «защитные Т-петли или колпачки, t-loops», обеспечивающие общий механизм защиты и репликации теломер [21]. Согласно современным представлениям, укорачивание теломер при каждом последующем делении клетки в конечном итоге разрушает защитный колпачок, приводя к устойчивому повреждению ДНК и последующей активации программы клеточного старения [21].

Сенесцентные клетки, в отличие от нормальных, плоские, увеличены в размерах и зачастую многоядерные [22]. Поскольку сенесцентные клетки характеризуются необратимой остановкой роста либо в G 1, либо в G 2 /м фазе клеточного цикла, они больше не могут делиться [23]. В цитоплазме сенесцентных клеток отсутствуют пролиферативные маркеры (например, маркер пролиферации MKI67, он же Ki67, и бромдезоксисуридин — BrdU), однако в большом количестве представлены супрессоры опухолевого роста и ингибиторы клеточного цикла (белки p15, p16^{INK4a}, p21^{CIP1/WAF1}, p27, p57, фактор рибозилирования аденозиндифосфата — ARF и белок ретинобластомы — Rb) [24]. Сенесцентные клетки содержат в своем составе измененный хроматин, так называемые сенесенс-ассоциированные гетерохроматиновые фокусы (SAHF). Эти изменения в хроматине связаны со стабильной репрессией генов-мишеней E2F, происходят только в сенесцентных клетках и отсутствуют в клетках, в которых остановка клеточного цикла обратима [24].

Выделяют три типа SnCs [15]:

- *физиологический сенесенс* или *реплицирующее старение* (RS). Теломеры — концевые участки хромосом — во время деления клетки реплицируются не полностью, что приводит к их истиранию. Длина теломеров прогрессивно сокращается при репликации ядерной ДНК во время митоза, и когда истирание (укорочение) теломеров превышает физиологический диапазон, оно распознается как повреждение ДНК и вызывает реплицирующее клеточное старение [23];

- *стресс-обусловленный сенесенс* или *вызванное стрессом преждевременное старение* (SIPS). Стресс-обусловленный сенесенс развивается вследствие как внешних патологических воздействий, например радиоактивного облучения, так и внутриклеточных стресс-активирующих процессов, например окислительного или метаболического стресса [25, 26].

• **онкоген-индуцированный сенесценс (OIS)** является мощным внутренним механизмом подавления роста опухолей, останавливающим прогрессирование клеточного цикла при геномных изменениях, активирующих онкоген.

Сенесцентные клетки содержат в своём составе измененный хроматин, так называемые сенесценс-ассоциированные гетерохроматиновые фокусы (SAHF). Эти изменения в хроматине связаны со стабильной репрессией генов-мишеней E2F, происходят только в сенесцентных клетках и отсутствуют в клетках, в которых остановка клеточного цикла обратима [24].

Сенесцентным клеткам присущ уникальный так называемый сенесценс-ассоциированный секреторный фенотип (*senescence-associated secretory phenotype* — SASP), т. е. способность стареющих клеток секретировать во внеклеточную среду большое количество патогенных факторов, действующих паракринно на неповреждённые клетки. К таковым относятся:

- воспалительные цитокины (интерлейкин IL-1, IL-1b, IL 6, IL-7, IL-13 и IL-15);
- хемокины [IL-8, рост-регулирующие онкогены (GRO-) — GRO- α , GRO- β и GRO- γ ; моноцитарный хемоаттрактантный белок (MCP), син. лиганд 2 хемокина (C-C мотив) (CCL2); воспалительные белки макрофагов (MIP) MIP-1 α или CCL3 и MIP-1 β или CCL4; бета-C-C-хемокин-4 человека (HCC-4); эотаксин-3; экспрессируемый тимусом хемокин, син. лиганд-25 хемокина мотива C-C (CCL-25); хемокин-5 мотива C-X-C (CXCL-5 или ENA78), лиганд 1 хемокина (мотив C-C) — CCL-1 или I-309; хемокин 11 мотива C-X-C — CXCL-11 или I-TAC];
- факторы роста и ангиогенеза — амфирегулин (AREG), ангиогенин (ANG), эпирегулин (EPR), нерегулин или фактор дифференцировки нейронов (NDF), эпидермальный фактор роста (EGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), инсулиноподобные белки, связывающие фактор роста — IGFBP (IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6 и IGFBP-7), фактор роста кератиноцитов (KGF), фактор роста нервов (NGF), фактор роста плаценты (PIGF), фактор стволовых клеток (SCF), фактор, происходящий из клеток стромы-1 (SDF-1), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF);
- матриксные металлопротеиназы — MMP (MMP-1, MMP-3, MMP-10, MMP-12, MMP-13, и MMP-14);
- ингибиторы металлопептидазы — TIMP (TIMP-1 и TIMP-2);
- ингибиторы активатора плазминогена — PAI (PAI-1 и PAI-2);
- тканевой активатор плазминогена (tPA),
- активатор плазминогена урокиназного типа (uPA);
- катепсин В;
- рецепторы/лиганды [рецептор эпидермального фактора роста — EGF, апоптозный антиген 1 (APO-1 или Fas — рецептор, молекулы межклеточной адгезии — ICAM (ICAM-1 и ICAM-3), остеопротегерин (OPG),

рецептор uPA, растворимый белок gp130 (SGP130), растворимые рецепторы фактора некроза опухоли — sTNFRs (sTNFR-I, sTNFR-II) и рецептор-приманка 1 (DCR-1 или TRAIL-R3)];

- оксид азота (NO);
- простагландин E2 (PGE2);
- активные формы кислорода (ROS);
- нерастворимые факторы (коллагены, фибронектин и ламинин) [22, 27, 28].

SASP-секретируемые элементы, в свою очередь, влияют на микроокружение близлежащих тканей, тем самым вызывая фенотипические изменения в соседних клетках, изначально не относящихся к сенесцентным, т. е. SASP-секретируемые элементы опосредуют своё патофизиологическое воздействие на неповреждённые ткани, инициируя их переход в состояние сенесценса. Этот феномен носит название *паракринный сенесценс* [29].

Впервые возможность приобретения стареющими клетками секреторного фенотипа (SASP) была продемонстрирована в 2008 году *Corpe JP с соавт.* [30]. Авторы этой работы показали, что стареющие фибробласты «превращаются в секретирующие провоспалительные клетки, обладающие способностью стимулировать прогрессирование опухоли». Компоненты SASP, например IL-6 и IL-12, MIP и интерферон гамма (IFN- γ), секретируются фибробластами как в состоянии RS, так и в состоянии SIPS, что позволяет говорить о том, что SASP может индуцироваться клетками как в состоянии RS, так и в состоянии SIPS [28, 30].

Важной особенностью сенесцентных клеток является их устойчивость к апоптозу [31]. Ряд исследователей полагает, что резистентность сенесцентных клеток в отношении апоптоза связана с активацией в них сигнальных каскадов, сопряжённых с белками p53 [32]. Не менее важно и то, что сенесцентные клетки поддерживают свою жизнедеятельность за счёт стимуляции воспалительной реакции в окружающей их среде, чем отличаются от апоптотических, которые фагоциты элиминируют, не вызывая воспаления [23]. Показано, что стареющие клетки сверхэкспрессируют антиапоптотические белки семейства BCL-2, которые и придают им устойчивость к апоптозу [33]. Почему стареющие клетки устойчивы к апоптозу, остаётся неясным, особенно учитывая тот факт, что активация белка-супрессора p53 является ключевым этапом для обоих процессов [34].

Одна из гипотез, объясняющих, почему с возрастом в организме накапливаются сенесцентные клетки, заключается в том, что в этих клетках белок p53 активируется лишь частично, но в достаточной степени для стимуляции транскрипции генов, связанных со старением, например гена, кодирующего белок-супрессор p21^{CIP1/WAF1}, но не в той степени, которая необходима для активации апоптоза [35]. Полагают, что содержание и активность белка p53 в сенесцентных клетках снижаются за счёт его секвестрации в очаге повреждения ДНК [36].

Как было отмечено выше, сенесцентные клетки теряют способность к делению. Этот процесс регулируется двумя основными белками-супрессорами: p53 (также известным как опухолевый белок P53, клеточный опухолевый антиген p53 — UniProt или связанный с трансформацией белок 53 — TRP53) и p16 (также известный как p16^{INK4a} или ингибитор циклинзависимой киназы 2A, CDKN2A) [34]. Активация сигнальных путей, сопряжённых с этими белками, подавляет циклинзависимые киназы CDK1, CDK2, CDK4 и CDK6, тем самым предотвращая фосфорилирование белка ретинобластомы (RB), которое необходимо для активации последним факторов транскрипции E2F, инициирующих экспрессию генов, связанных с фазовым переходом первой фазы клеточного цикла — G₁ в фазу клеточного цикла — S, в которой реплицируется ДНК, необходимая для формирования второй фазы клеточного цикла — G₂ [34, 37]. Старение и эпигенетическая дерепрессия локуса CDKN2A также приводит к транскрипции и активации ингибитора клеточного цикла — опухолевого супрессора ARF (также известного как аномальный щелочной белок ARF или атипичный белок p14ARF) [37].

В инициации сенесенса также участвуют другие внутриклеточные сигнальные пути. Например, длительная активация сигнального пути, сопряжённого с инсулиноподобным фактором роста 1 (IGF1) индуцирует клеточное старение p53-зависимым образом [38]. Помимо этого, стимуляция таких сенесенс-связанных белков, как p15, p21^{CIP1/WAF1} и p27, может быть обусловлена активацией митоген-активируемых протеинкиназ (MAPKs), сигнального пути, сопряжённого с протеинкиназой B (PKB или AKT), активацией системы трансформирующего фактора роста-β (TGFβ), а также активными формами кислорода [39]. В частности, активация сигнального пути MAPK/ERK (RAS–RAF–MEK–ERK), а также белка SMAD — основного передатчика сигналов для рецепторов TGF-β — стимулирует белок-супрессор, ингибирующий апоптоз p21 (также известный как WAF1, CIP1 или SD11) [40]. Кроме того, идентифицирована группа сенесенс-ассоциированных микроРНК (senescence-associated miRNAs; SA-miRNAs), к которым относят miR-17-3p, microRNA-34a miR-141/miR146b-5p [41–43].

Несмотря на то, что в основе RS и SIPS лежат разные механизмы, в обоих случаях вероятным триггером клеточного ответа является ДНК-связывающий белок p53, который активирует белок p21^{CIP1/WAF1} — ингибитор циклинзависимой протеинкиназы (CDK), подавление активности которой вызывает остановку клеточного цикла [23]. В дальнейшем происходит активация экспрессии белка p16^{INK4a} (ингибитор циклинзависимых киназ) и аномального щелочного белка ARF, что провоцирует синтез и накопление в клетке основного маркера сенесенса — сенесенс-ассоциированной β-галактозидазы (SA-β-Gal). Полагают, что

накопление SA-β-Gal в сенесцентных клетках связано с увеличением в них массы лизосомальных ферментов [44], при этом увеличение активности SA-β-GAL в сенесцентных клетках является результатом, а не причиной старения, поскольку её активация/накопление не подавляет клеточный цикл [45].

Сенесенс и сердце / Senescence and heart

Кардиомиоциты составляют 25–35 % клеток сердца взрослого человека [46], вместе с тем, они занимают 65–70 % объёма миокарда [47]. Исторически полагали, что кардиомиоциты завершают клеточный цикл на ранней постнатальной фазе и являются терминально дифференцированными и постмитотическими (PoMiCS). Поскольку у взрослых людей кардиомиоциты являются терминально дифференцированными, постмитотическими клетками (с годовой способностью к обновлению менее 1 % [48]), старение кардиомиоцитов сложно точно определить по сравнению с пролиферирующими клетками, однако в последнее время появились данные, свидетельствующие о том, что они в той или иной мере сохраняют пролиферативную способность. В процессе старения кардиомиоциты, в том числе и человека, приобретают сенесенс-подобный фенотип, характеризующийся стойким повреждением ДНК в участках теломер, которое может быть вызвано митохондриальной дисфункцией и, что особенно важно, может происходить независимо от деления клеток и длины теломер в кардиомиоцитах [49]. Независимое от длины повреждение теломер активирует классические сигнальные пути, индуцирующие сенесенс (p16^{INK4a} и p21^{CIP1/WAF1}), что приводит к формированию ассоциированного с сенесенсом неканонического секреторного фенотипа (SASP) и, как следствие этого, активации профиброзных и прогипертрофических внутриклеточных сигнальных каскадов [49].

Показано, что у мышей размер кардиомиоцитов, продукция ROS и экспрессия белков p16^{INK4a} и/или p53 увеличиваются с хронологическим возрастом вместе с истощением теломер [50], что, как полагают, является признаком сенесенса, а также характерно для стареющих пролиферирующих клеток [14].

Механизмы, которые лежат в основе старения PoMiCS, в частности и кардиомиоцитов, а также и вклад PoMiCS в дегенерацию тканей во время старения являются новой областью интересов, с каждым годом привлекающей к себе всё больше и больше исследователей [13, 14, 51].

Полагают, что постмитотическое старение кардиомиоцитов в той или иной мере связано с митохондриальной дисфункцией, развивающейся в результате ингибирования митофагии (митофагия — селективное разрушение митохондрий путём аутофагии), которое достигается посредством блокады белком-супрессором p53 фермента убиквитинлигазы E3 parkin, являющейся важнейшим регулятором митофагии [52].

Помимо этого, увеличивающиеся с возрастом мутации митохондриальной ДНК стимулируют избыточную продукцию ROS, что, как было отмечено выше, способствует развитию стресс-обусловленного сенесенса. Предотвращение окислительного повреждения посредством активации фактора транскрипции FOXO3, приводящей к усилению экспрессии каталазы и супероксиддисмутазы, предотвращает старение кардиомиоцитов [53].

Однако следует учитывать тот факт, что несмотря на наличие четкой взаимосвязи между митохондриальной дисфункцией и клеточным старением, неясно, является ли сенесенс причиной или следствием митохондриальной дисфункции [54, 55]. Например, накопление поврежденных митохондрий вследствие нарушения митофагии служит важным фактором старения, и, наоборот, сенесенс напрямую нарушает регуляцию митофагии [56].

Эпигенетические факторы также могут негативно влиять на старение кардиомиоцитов. Например, потеря триметилированного гистона 3 лизина 9 (H3K9me3) взрослыми кардиомиоцитами способствует сверхэкспрессии гистондеметидазы (KDM4D), что приводит к усилению пролиферации и экспрессии генов клеточного цикла и тем самым препятствует его завершению [57].

В литературе имеются данные о том, что кардиомиоцитам в состоянии сенесенса свойственен SASP фенотип, за счёт которого они оказывают обширное негативное паракринное воздействие на окружающие популяции клеток сердца. В частности, они секретируют воспалительные цитокины IL-1 и IL-6, фактор некроза опухоли α (TNF- α), эндотелин 3 (Edn3), фактор роста и дифференцировки 15 (GDF15) и трансформирующий фактор роста бета TGF- β [58, 49]. IL-1, IL-6 и TNF- α индуцируют локальное воспаление в окружающих клетках [58], Edn3, GDF15 и TGF- β активируют миофибробласты и фибробласты и тем самым индуцируют миокардиальный фиброз [49].

Полагают, что у кардиомиоцитов в состоянии сенесенса нарушена сократительная способность и снижена их электрическая стабильность [59].

Имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о важной роли сенесенса в патогенезе инфаркта миокарда (ИМ) [58, 60, 61]. Так, например, на модели острого ИМ показано, что накопление маркера сенесенса (сенесенс-ассоциированной β -галактозидазы — SA- β -Gal) в перинфарктной зоне ассоциировалось с «гиперразрушением» митохондрий, обусловленным повышением активности в этой зоне связанного с динамином белка 1 (Drp1) — ключевого медиатора деления митохондрий [62]. Известно, что Drp1 совместно с актин-связывающим белком А (филамин-А, FLN-А) локализуется вокруг митохондрий, а повышенная активность Drp1, которая наблюдается в условиях гипоксии/ишемии, активирует филамин-А, что усиливает агрегацию актина и тем

самым инициирует «гиперразрушение» митохондрий. Показано, что фармакологическое ингибирование взаимодействия Drp1/филамин А подавляет деструкцию митохондрий, связанную с сенесенсом кардиомиоцитов, спровоцированным ИМ [62].

Одним из ключевых компонентов реперфузионного повреждения сердца является повышенная генерация активных форм кислорода, приводящая к прогрессированию тканевой дисфункции и усилению воспаления миокарда [63], а также инициирующая значительное образование сенесцентных кардиомиоцитов и кардиофибробластов [64]. Показано, что ишемия/реперфузия индуцирует теломерные очаги повреждения ДНК в кардиомиоцитах, что может сопровождаться повышением экспрессии/активации просенесцентных белков, в частности, ассоциированных со старением белков-супрессоров p16^{INK4a} и p21^{CIP1/WAF1} [49].

В экспериментах на нокаутных по ингибитору циклинзависимой киназы 2A (CDKN2A) — гену, кодирующему белок p16^{INK4a}, мышах было показано, что перинфарктная зона миокарда нокаутных мышей (CM-p16^{KO}) содержала значительно меньше кардиомиоцитов, экспрессирующих p16^{INK4a} по сравнению с контролем. Также у CM-p16^{KO} в перинфарктной области была снижена и экспрессия белка p21^{CIP1/WAF1}. С помощью магнитно-резонансной томографии было показано, что у CM-p16^{KO} выше сократительная функция и ударный объём левого желудочка сердца, размер некроза значимо меньше [65]. Авторы этого исследования делают обоснованное заключение о том, что «кардиомиоциты в состоянии сенесенса вносят основной вклад в ремоделирование и дисфункцию сердечной мышцы после инфаркта миокарда».

Модельные эксперименты на животных, воспроизводящие патологию миокарда, и исследования на эксплантированных сердцах человека показали накопление фибробластов в состоянии сенесенса в фиброзных областях сердца [60, 66, 67]. Однако механизмы, ответственные за активацию путей старения в этих клетках, и их функциональные последствия остаются недостаточно изученными. Полагают, что сенесенс-обусловленный фиброз миокарда связан с активацией профибротических сигнальных путей, регулируемых TGF β и/или цитозольным белком криопирином (NLRP3) [68–70].

Также имеются данные о том, что в сенесенс-обусловленное старение фибробластов вовлечены такие микроРНК, как miR-15, miR-17, miR-22 и miR-1468-3p [71–73]. Продemonстрировано, что эти микроРНК обладают профибротической активностью и играют важную роль в патогенезе таких заболеваний, как хроническая сердечная недостаточность и фибрилляция предсердий [74, 75].

Хорошо известно, что возраст является независимым предиктором смертности пациентов с острым инфарктом миокарда как в стационаре, так и через 1 год

после выписки [76]. Одним из объяснений этого является то, что избыточное инфаркт-обусловленное накопление сенесцентных клеток у пожилых пациентов усугубляет течение постинфарктного периода, препятствуя эффективной регенерации сердечной мышцы.

Также известно, что окислительный стресс, сопутствующий острым коронарным событиям, играет ключевую роль в преждевременном старении сердечно-сосудистой системы, которое, в частности, связано с прогрессирующим выделением эндотелиальными клетками коронарных сосудов прокоагулянтных микрочастиц/микровезикул (MPs/MVs), которые являются просенесцентными и провоспалительными эндотелиальными эффекторами [77, 78]. MPs/MVs представляют собой субмикронные везикулы плазматической мембраны, выделяемые клетками в ответ на стресс. MPs/MVs переносят активные, в том числе тромбогенные, цитоплазматические белки, липиды, а также прострессорные микроРНК. Было показано, что MPs/MVs эндотелиального происхождения, полученные от пациентов с острым коронарным синдромом, в экспериментах *in vivo* инициирует сенесценс и последующую дисфункцию коронарных эндотелиальных клеток [79]. Сенесцентные эндотелиальные клетки, обладая сенесценс-ассоциированным секреторным фенотипом, интенсивно экспрессируют такие супрессоры и ингибиторы клеточного цикла, как белки p16^{Ink4a}, p21^{CIP1/WAF1} и p53, которые, действуя паракринно, снижают способность неповреждённых эндотелиальных клеток продуцировать оксид азота (NO) и подавлять их способность ингибировать агрегацию тромбоцитов, т. е. создают условия для инициации острых коронарных событий [79]. Клинически сенесценс этой популяции клеток коррелирует с риском рестеноза коронарных стентов после чрескожного коронарного вмешательства [80].

Фибрилляция предсердий (ФП), или мерцательная аритмия, одно из самых частых злокачественных нарушений сердечного ритма, является осложнением большого числа сердечно-сосудистых заболеваний (врождённые и приобретённые пороки сердца, инфаркт миокарда, хроническая сердечная недостаточность, артериальная гипертензия, синдром «Праздничного сердца» и хронический алкоголизм, кардиомиопатии и многие другие).

Несмотря на существенные достижения в лечении ФП, она остаётся одной из основных причин тромбоэмболических событий, например риск развития острого нарушения мозгового кровообращения на фоне ФП у лиц пожилого возраста составляет $\approx 25\%$. Согласно анализу результатов 3-группового рандомизированного двойного слепого многонационального исследования «ENGAGE AF-TIMI 48 Trial», внезапная смерть является наиболее частой причиной сердечно-сосудистой смерти пациентов с ФП [81]. По мнению экспертов Американской ассоциации

сердца, увеличение возраста населения в сочетании с рядом состояний, предрасполагающих к ФП, на текущий момент «приводит к эпидемиологическому взрыву ФП» [82].

Учитывая, что распространённость ФП прямо пропорциональна возрасту и что укорочение теломер лежит в основе репликативного сенесценса, причинно-следственная связь между ними представляется логичной.

В исследовании *Xie J с соавт.* показано, что существует прямая взаимосвязь между сенесценсом, фиброзом предсердий и ФП [83]. Также показано наличие положительной связи между укорочением теломер и патогномичным для ФП увеличением параметров, характеризующих наполнение левого желудочка сердца [84].

В работе *Carlquist JF с соавт.* показано, что у пациентов с ФП теломеры короче, чем у лиц с нормальным синусовым ритмом. Также было показано, что среднее соотношение теломер к отдельному гену (t/s) у пациентов с пароксизмальной формой ФП было значительно ниже, чем у пациентов с персистирующей или постоянной формой ФП, что подразумевает, что укороченные теломеры участвуют в возникновении ФП, но не в прогрессировании заболевания [85]. Авторы этого исследования приходят к выводу, что «настоящее исследование подтверждает связь между ФП и длиной теломер. Короткая длина теломер может быть ранее нераспознанным фактором риска развития ФП, который может быть использован в диагностике и терапии».

Вместе с тем, следует учитывать и тот факт, что в литературе имеются сообщения о том, что наличие ФП приводит к укорочению теломер, а не наоборот, а эффективная терапия ФП может замедлить истирание теломер [86].

Выше уже было отмечено, что ФП остаётся одной из основных причин тромбоэмболических событий, что позволяет рассматривать эту патологию как генерализованное протромботическое состояние, характеризующееся высокими уровнями циркулирующих в плазме крови продуктов распада эндогенных фибринолитиков, повышенной экспрессией ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) и повышенным выбросом в кровоток комплекса тромбин-анти тромбин и микрочастиц прокоагулянта (MPs) [87]. MPs, экспрессируемые эндотелиальными клетками сосудов, способствуют сенесценсу за счёт активации продукции митохондриями NOX и ROS [88]. Кроме того, циркулирующие MPs, оказывая прямое воздействие на сосуды и клетки крови, инициируют выработку тромбина [89]. Показано, что тромбин в концентрациях, достаточных для образования тромба, вызывает окислительный стресс и преждевременный сенесценс эндотелия предсердий [90]. Сенесценс предсердий, индуцируемый тромбином, характеризуется приобретением протромботического, проадгезивного,

профибротического и проремоделирующего фенотипа, в том числе повышенным уровнем экспрессии молекул адгезии сосудистых клеток (VCAM)-1, тканевого фактора, трансформирующего фактора роста (TGF)- β и MMP-2 и 9, что прямо свидетельствует о формировании SASP фенотипа [90].

Таким образом, помимо своей роли в свёртывании крови, тромбин также выступает в качестве ключевой просенесцентной молекулы, необходимой для выработки аритмогенного субстрата, создающего и/или поддерживающего ФП.

Также показано, что индуцированный тромбином сенесценс стимулирует в эндотелиальных клетках предсердий патологическую, в том числе и проаритмическую, активность локальной (тканевой) ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, тогда как блокада рецептора ангиотензина II типа 1 (AT1R) и ингибирование АПФ значительно ослабляют тромбин-зависимую индукцию ROS и замедляют формирование сенесценса [90].

Рецептор, активируемый протеиназой 1 (PAR-1), также известен как рецептор фактора свёртывания II (тромбина). Как следует из названия рецептора, тромбин является агонистом рецептора, активация которого вызывает изменение экспрессии множества генов, которые связаны с провоспалительным фенотипом [91]. У мышей избыточная экспрессия PAR-1 вызывает эксцентрическую гипертрофию и дилатационную кардиомиопатию, тогда как ингибирование PAR-1 в значительной степени препятствует развитию постинфарктного ремоделирования левого желудочка сердца [92]. Также показано, что тромбин инициирует гипертрофию и фиброз миокарда предсердий за счёт активации сопряжённых с PAR-1 сигнальных путей [93]. На модели хронической сердечной недостаточности у крыс, сопровождающейся дилатацией левого предсердия, показано, что на фоне терапии ингибитором тромбина или антагонистом PAR-1 уменьшается ремоделирование предсердий и продолжительность эпизодов ФП [93].

Другой возможной связью между сенесценсом и ФП, по-видимому, является митохондриальная дисфункция. Известно, что нарушение регуляции механизмов митохондриального гомеостаза является отличительной чертой сенесценса [94]. Также хорошо известно, что снижение активности митохондриальной цепи переноса электронов вызывает окислительный стресс и способствует развитию ФП [95]. Показано, что у пожилых людей митохондриальная дисфункция, инициирующая энергетическую недостаточность кардиомиоцитов и последующее развитие окислительного стресса, может быть провоцирующим фактором, ответственным за формирование ФП [96], возможно, вследствие ROS-обусловленного формирования в кардиомиоцитах предсердий SASP фенотипа.

Косвенным подтверждением вовлечённости сенесценса в формирование ФП может быть наличие у

сердечного гликозида дигоксина, широко применяемого для лечения ФП, выраженной сенолитической активности [97].

Трансмембранный белок 43 (TMEM43) играет важную роль в поддержании структуры ядерной оболочки путём организации белковых комплексов на внутренней ядерной мембране. Известно, что мутации в высококонсервативном трансмембранном домене TMEM43 вызывают аритмогенную кардиомиопатию (АКМ) [98]. Показано, что гетерозиготная делеция гена TMEM43 в кардиомиоцитах у мышей приводит к активации сигнальных путей, сопряжённых с белком-супрессором p53 экспрессии SASPs, что инициирует развитие ассоциированной со старением кардиомиопатии, характеризующейся дилатацией сердца, систолической дисфункцией и фиброзом миокарда [99].

Недавно у людей была зарегистрирована новая гомозиготная миссенс-мутация в домене LEM2 (LEMD2) белка ядерной оболочки TMEM43, вызывающая аритмогенную кардиомиопатию, протекающую с незначительным нарушением систолической функции левого желудочка сердца, но тяжёлыми желудочковыми аритмиями, приводящими к внезапной сердечной смерти [100]. В кардиомиоцитах и кардиофибробластах этих пациентов обнаружены удлинённые ядра аномальной формы, а также дезорганизованный, конденсированный гетерохроматин. Мутантные фибробласты имели сенесцентный фенотип и демонстрировали сниженную пролиферативную способность, что предполагает участие мутантного LEMD2 в процессах ремоделирования хроматина и инициации сенесценса [100].

Преждевременное старение кардиомиоцитов могут вызвать и кардиотоксичные препараты, например доксорубин, о чём свидетельствует увеличение на фоне его приёма экспрессии маркера сенесценса SA- β -Gal и сенесценс-связанных белков-супрессоров (p16^{Ink4a}, p21^{Cip1/Waf1} и p53), а также снижение фосфорилирования сердечного тропонина I и подавление активности теломеразы по мере старения кардиомиоцитов. Изменения в экспрессии мРНК, обычно наблюдаемые в старых клетках, наблюдались и в кардиомиоцитах новорождённых крысят, получавших доксорубин [101]. Предварительная обработка кардиомиоцитов новорождённых крысят специфическими ингибиторами MAPKs и p53 либо ослабляло повреждение, вызванное доксорубином, либо смещало клеточный ответ на стресс со старения на апоптоз [102].

В последнее время опубликован ряд систематических обзоров литературы, авторы которых высказывают обоснованное мнение о том, что «модуляция сенесценса кардиомиоцитов является жизнеспособной стратегией терапевтического лечения» [49] и рассматривают возможные подходы к фармакологической коррекции этой патологии [14, 51, 103, 104].

Сенотерапия: направления развития и терапевтические возможности / Senotherapy: Directions of development and therapeutic possibilities

Сегодня в качестве новой терапевтической стратегии для лечения патологий, связанных со старением, проводятся исследования по поиску и изучению механизмов действия сенотерапевтических лекарственных средств. Сенотерапевтические препараты представляют собой новый класс лекарственных средств, действие которых направлено или на устранение (уничтожение) сенесцентных клеток (сенолитики), или не на уничтожение сенесцентных клеток, а модификацию их секреторного фенотипа (сеностатики или сеноморфные препараты; ингибиторы SASP) [51, 105].

Сенолитики (senolytics)

Согласно имеющимся к настоящему времени экспериментальным данным, сенолитическая терапия оказывает определённое кардио- и ангиопротективное действие:

- улучшает инотропную функцию сердца (повышает фракции укорочения и выброса левого желудочка сердца) и повышает физическую работоспособность мышей [106];
- повышает реактивность сосудов у сенесцентных мышей [109];
- у сенесцентных мышей с гиперхолестеринемией снижает кальцификацию сосудов [109];
- у сенесцентных мышей с дефицитом рецепторов липопротеинов низкой плотности (Ldlr-/-) уменьшает в атеросклеротических сосудистых бляшках количество стареющих пенных клеток [110]. Авторы этого исследования полагают, что «селективное удаление этих клеток сенолитическими агентами является перспективным направлением для лечения атеросклероза».

Как уже было отмечено выше, одним из наиболее перспективных направлений в создании сенолитиков является поиск препаратов, способных активировать проапоптотические каскады в сенесцентных клетках. Впервые о такой возможности сообщили в 2011 году Даррен Дж. Бейкер с соавт., которые в экспериментах на трансгенных мышках (INK-АТТАС), у которых «ген самоубийства» (Cdkn2a) был встроен в локус Ink4a, показали, что его активация путём введения соединения AP20187 способна инициировать апоптоз посредством удаления сенесценс-связанного белка p16^{Ink4a} в позитивно стареющих клетках [111]. По результатам этого исследования было сделано заключение, что удаление сенесцентных клеток путём активации апоптоза «может предотвратить или отсрочить тканевую дисфункцию и продлить период здоровья».

В результате протеомных и транскриптомных исследований в сенесцентных клетках был выявлен ряд ключевых антиапоптотических молекул и сигнальных каскадов — SCAPs (senescent cell anti-apoptotic pathways), которые в настоящее время рассматривают

как биомаркеры для создания сенолитиков. К SCAPs относятся тирозинкиназа/эфрин B1/3 (EFNB1/3); белки Bcl1/Bcl2/Bcl-X; фосфатидилинозитол-3-киназа/протеинкиназа B (PI3K/Akt) сигнальный каскад; сигнальные каскады, сопряженные с белками-супрессорами p53/p21/PAI и II, а также SCAPs, связанные с транскрипционным фактором 1α, индуцируемым гипоксией (HIF-1α) [106–108].

Навитоклакс (navitoclax, АТВ-263) — низкомолекулярный миметик домена BH3 проапоптотического белка BAD, обладающий свойствами ингибитора белков семейства Bcl-2, является мощным индуктором апоптоза [112].

В экспериментах *in vitro* Zhu Y с соавт. в сравнительном аспекте оценили сенолитическую активность известных активаторов апоптоза раковых клеток, таких как навитоклакс и TW-37 [12]. TW-37 представляет собой миметическое производное госсипола второго поколения, гомологичное антиапоптотическому фактору Bcl-2. Авторы показали, что навитоклакс проявляет сенолитическое действие в стареющих эпителиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC), фетальных клетках лёгкого человека (IMR90) и первичных эмбриональных фибробластах мыши (MEFs), тогда как TW-37 в этих клетках значительно менее эффективен. Полагают, что расхождение в интенсивности сенолитического действия этих соединений связано с определёнными различиями в точках приложения их действия: хотя и навитоклакс, и TW-37 нацелены на белки Bcl-2 и Bcl-xl, навитоклакс взаимодействует с антиапоптотическим белком Bcl-w, а TW-37 — с белком дифференцировки клеток миелоидного лейкоза (ингибитором апоптоза) Mcl-1.

В модельных экспериментах, воспроизводящих инфаркт миокарда у «пожилых» мышей, показано, что индуктор апоптоза навитоклакс устраняет стареющие кардиомиоциты и ослабляет экспрессию профибротического белка, что уменьшает интенсивность пост-инфарктного ремоделирования миокарда и улучшает диастолическую функцию левого желудочка сердца, а также повышает выживаемость животных [61]. Авторы этого исследования полагают, что «их данные подтверждают концепцию, что стареющие клетки вносят основной вклад в нарушение функции и увеличение смертности после ИМ», и что «сенолитики являются потенциальным новым направлением терапии ИМ».

Это предположение нашло своё подтверждение в исследованиях Dookun E с соавт. которые в модельных экспериментах, воспроизводящих ишемию/реперфузионное повреждение сердца, показали, что навитоклакс, введённый после реперфузии, инициировал удаление сенесцентных клеток, что, в свою очередь, способствовало подавлению сенесценс-обусловленной экспрессии провоспалительных, профибротических и антиангиогенных цитокинов, включая индуцируемый интерфероном гамма-белок-10, TGF-β3, ин-

терлейкин-11, интерлейкин-16 и фракталкин и, как следствие этого, способствовало улучшению насосной функции левого желудочка, увеличению васкуляризации миокарда и уменьшению размера инфаркта [64]. Авторы исследования приходят к заключению, что их данные «подтверждают концепцию о том, что сенесенс способствует нарушению функции сердца и неблагоприятному ремоделированию после ишемии-реперфузии сердца».

Несколько позже эти результаты были подтверждены в экспериментах, в которых навитоклак, содержащийся в наночастицах (ABT263-PLGA), вводили внутримиекардиально за 5 мин до начала реперфузии [113]. Было показано, что ABT263-PLGA успешно удаляет индуцированные стрессом сенесцентные кардиомиоциты, ослабляет воспалительную реакцию и восстанавливает сердечную функцию, тогда как в контрольной группе она динамически снижалась. ABT263-PLGA не только значимо снижал экспрессию провоспалительных цитокинов и протеаз, разрушающих сердечный матрикс, но также индуцировал переход макрофагов из фазы воспаления в фазу репарации посредством эффероцитоза макрофагами апоптотических сенесцентных кардиомиоцитов и кардиофибробластов.

Имеющиеся к настоящему времени данные позволяют говорить о том, что удаление сенесцентных клеток с помощью навитоклакса задерживает начало и развитие сердечно-сосудистых заболеваний, включая атеросклероз, инфаркт миокарда, ишемия-реперфузионное повреждение, а также старение сердца [61, 64].

Однако стоит отметить, что навитоклак может вызывать тромбоцитопению и нейтропению даже после кратковременного воздействия [12, 114], что, по всей видимости, потенциально ограничивает возможности его клинического применения.

Кверцетин/дазатиниб. В литературе имеется достаточно большое количество сообщений, свидетельствующих о том, что природный флавоноид кверцетин обладает сенолитической активностью [115–117]. Показано, что способность кверцетина индуцировать апоптоз и аутофагию связана с его ингибирующим влиянием на PI3K/AKT/mTOR и STAT3 внутриклеточные сигнальные пути [118].

Дазатиниб [BMS 354825] представляет собой низкомолекулярный ингибитор, который воздействует на широкий спектр тирозинкиназ, участвующих в патофизиологии нескольких неоплазий. Среди наиболее чувствительных к дазатинибу мишеней выделяют Bcr-ABL тирозинкиназы, киназы семейства SRC (SRC, LCK, HCK, FYN, YES, FGR, BLK, LYN и FRK) и рецепторные тирозинкиназы c-KIT, рецепторы фактора роста тромбоцитов (PDGFR) α и β , рецептор дискоидинового домена 1 (DDR1), c-FMS и эфринные рецепторы B1/3 [119].

В экспериментах *in vitro* показано, что дазатиниб снижал жизнеспособность и/или вызывал гибель се-

несцентных преадипоцитов человека и способствовал увеличению (в 2–5 раз) количества пролиферирующих преадипоцитов [106].

На различных моделях патологических состояний показано, что комбинация кверцетина и дазатиниба более эффективна в плане элиминации сенесцентных клеток, нежели монотерапия. Так, например, в экспериментах *in vivo* продемонстрировано, что эта комбинация избирательно удаляет сенесцентные клетки и улучшает сердечную и сосудистую функцию у «пожилых» мышей и увеличивает продолжительность их жизни [106].

Систематическая терапия комбинацией кверцетина и дазатиниба вызывала в медиальном слое аорты значительное снижение экспрессии маркеров сенесенса и улучшала её вазомоторную функцию у мышей с гиперхолестеринемией, что связывают с терапией-обусловленным увеличением биодоступности NO и повышением чувствительности гладкомышечных клеток аорты к донорам NO [109].

К настоящему времени накоплены достаточно убедительные данные о том, что сердце млекопитающих, включая человека, содержит самообновляющиеся, клоногенные, мультипотентные стволовые клетки сердца и клетки-предшественники (CPC), обладающие *in vivo* регенеративным потенциалом [120, 121]. Показано, что комбинированное применение кверцетина и дазатиниба в течение 2 месяцев устраняло сенесенс-обусловленную сердечную дисфункцию посредством глобальной элиминации сенесцентных кардиомиоцитов у «старых» мышей с последующей активацией резидентных CPC и увеличением количества мелких Ki67-, EdU- позитивных кардиомиоцитов [121]. Ki67-, EdU-позитивные кардиомиоциты — это популяция резидентных стволовых и прогениторных клеток сердца, обладающих самовоспроизведением, колоногенностью и мультипотентностью, способных дифференцироваться в основные типы клеток сердечной линии [122].

Пиперлонгумин. Сенолитической активностью обладает и выделенный из длинного перца алкалоид пиперлонгумин [123]. Пиперлонгумин избирательно увеличивает выработку активных форм кислорода и апоптотическую гибель клеток за счёт активации индуцированной стрессом изоформы белка теплового шока HSP32 — гемооксигеназы-1 (HO-1), усиление экспрессии которой происходит посредством активации ядерного фактора-2, связанного с эритроидом-2 (NRF2) [124]. В экспериментах *in vivo* показано, что сверхэкспрессия HO-1, обладающей выраженным антиоксидантным действием, подавляла секреторную активность сенесцентных кардиомиоцитов в ишемизированном миокарде. Помимо этого, HO-1 улучшала инотропную функцию ишемизированного миокарда за счёт ингибирования индуцированного сенесцентными кардиомиоцитами отложения внеклеточного матрикса и торможения фиброгенеза [125]. Кроме того,

показано, что экспрессия HO-1 замедляла связанное с возрастом образование сенесцентных кардиомиоцитов как у здоровых мышей, так и в первичной культуре клеток кардиомиоцитов новорождённых мышей [125].

В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре эндотелиальных клеток человека (HUVECs), показано, что HO-1 является потенциальной мишенью для лечения сенесценса эндотелия: сверхэкспрессия HO-1 в сенесцентных клетках HUVEC стимулировала взаимодействие между эндотелиальной синтазой оксида азота (eNOS) и протенкиназой B (Akt), что приводило к усилению фосфорилирования eNOS по Ser1177 и последующему увеличению продукции оксида азота (NO). Более того, индукция HO-1 предотвращала снижение соотношения димер/мономер eNOS, стимулируемое H₂O₂, благодаря её антиоксидантным свойствам. Напротив, подавление экспрессии HO-1 нарушало фосфорилирование eNOS и тем самым ускоряло её расщепление [126].

Гелданамицин и 17-AAG — ингибиторы белка HSP90. Белок теплового шока 90 (HSP90) действует как молекулярный шаперон для стабилизации неправильно свёрнутых или развёрнутых белков в условиях клеточного стресса. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* ингибиторы белка HSP90 проявляют сенолитическую активность [127]. Поскольку изоформы белка HSP90 экспрессируются в цитозоле (HSP90AA), эндоплазматическом ретикулуме (ERGrp94 или HSP90AB), митохондриях (TRAP1) и, возможно, в ядре клетки, они представляют собой отличные терапевтические мишени для воздействия на различные клеточные процессы, включая выживаемость/старение клеток [128].

Показано, что селективные ингибиторы белка HSP90 гелданамицин и 17-AAG оказывают дозозависимое сенолитическое действие на сенесцентные клетки независимо от их вида, поскольку реализуют сенесцентное действие в стареющих фибробластах эмбриона мыши (MEFs), мезенхимальных стволовых клетках (MSC), фибробластах лёгких человека (IMR90 и WI-38) и эндотелиальных клетках сосудов (HUVECs) [127]. Так, например, внесение ингибиторов HSP90 в культуру стареющих MEFs сопровождается почти полным исчезновением активной формы фосфорилированной протеинкиназы B (AKT), ключевого регулятора антиапоптотического пути PI3K/AKT, активирующегося в процессе сенесценса, всего через 6 ч от момента внесения; эффект длится не менее 24 ч.

Кроме того, ингибиторы HSP90 проявляют выраженную сенолитическую активность в отношении сенесцентных клеток, старение которых индуцировали различными способами: окислительным стрессом, генотоксическим стрессом и репликативным стрессом. В частности, в них была снижена экспрессия регулятора клеточного цикла — p16^{INK4a}, фактора SASP — IL-6 и маркера повреждения ДНК — γH2AX после внесения в клеточную культуру ингибиторов белка HSP90 — гелданамицина или 17-AAG [127].

В экспериментах *in vivo* показано, что повторные прерывистые курсы лечения ингибитором HSP90 17-DMAG сопровождались значительной отсрочкой появления возрастной симптоматики у прогероидных мышей, что привело к улучшению их общего состояния здоровья [127]. {*Прогероидные мыши представляют собой новый инструмент для исследования механизмов старения: у прогероидных, или Ercc1-/Δ гипоморфных мышей, снижен уровень экспрессии эндонуклеазного комплекса репарации ДНК ERCC1-XPF, в результате чего в клетке накапливаются спонтанно возникающие эндогенные просенесцентные повреждения ДНК, аналогичные для мышей естественного возраста, но с более высокой скоростью*}.

Дигоксин. Сенолитической активностью обладает и широко применяемый в клинике сердечный гликозид — алколоид наперстянки шерстистой дигоксин. Согласно имеющимся данным, сенолитическая активность дигоксина, в определённой мере, связана с его способностью инициировать апоптоз в сенесцентных клетках путём индукции проапоптотического белка NOXA семейства Bcl2 [129].

Хорошо известно, что в основе кардиотропного действия дигоксина лежит его способность подавлять активность фермента Na⁺/K⁺-АТФазы Р-типа, встроенного в клеточную мембрану кардиомиоцитов, за счёт взаимодействия с его α субъединицей, что влечёт за собой увеличение внутриклеточной концентрации ионов Na⁺ и снижение концентрации ионов K⁺ и, как следствие этого, усиление деполяризации клеточной мембраны. *Triana-Martínez F* высказывает предположение о том, что поскольку клеточная мембрана сенесцентной клетки в условиях покоя и так более деполяризована, чем у интактной клетки, усиление её деполяризации под влиянием дигоксина может лежать в основе его сенолитической активности [97].

Также нельзя исключить, что сенолитическое действие дигоксина связано с тем, что сенесцентные клетки имеют более высокую концентрацию ионов H⁺, т. е. более закислены, а повышение в них уровня ионов Na⁺ может привести к блокаде Na⁺/H⁺-обменника (натрий–водородный антипортер) и дальнейшему увеличению цитозольной концентрации ионов H⁺, что усилит закисление сенесцентной клетки и инициирует её гибель [130].

Говоря о возможности использования дигоксина в качестве сенолитического лекарственного средства, следует учитывать, что дигоксин, так же как и другие сердечные гликозиды, обладает очень узкой терапевтической широтой и высокой кардиотоксичностью, что делает применение препарата в качестве сенолитика достаточно проблематичным.

Ингибиторы БЕТ-бромодоменных белков. В последнее время появились сообщения о возможности использования эпигенетических регуляторов — ингибиторов БЕТ-бромодоменных белков в качестве сенолитиков [131]. Бромодомен был впервые описан

Haynes SR в 1992 году как эволюционно консервативный домен из ≈ 110 аминокислот, обнаруживаемый во многих связанных с хроматином белках [132]. В качестве мишени для сенолитиков выступает представитель подсемейства бромодоменных белков BET хроматинсвязывающий белок BRD4 [131]. Ряд исследователей рассматривает BRD4 в качестве глобального регулятора транскрипции, в частности BRD4, являющийся атипичной протеинкиназой, способен самостоятельно фосфорилировать РНК-полимеразу II по Ser-2 [133] — транскрипционный фактор, который катализирует транскрипцию ДНК, регулирует синтез предшественников мРНК и большинство мРНК и микроРНК [134]. Полагают, что BRD4 необходим для репарации двухцепочечных разрывов ДНК (DSB) и опосредует образование перестроек генов путём вовлечения процесса негомологичного соединения концов — NHEJ [135].

В качестве ингибитора BRD4 выступает химера, нацеленная на протеолиз, гетеробифункциональный PROTAC — ARV-825, которая рекрутирует BRD4 в убиквитинлигазу E3 cereblon, что приводит к быстрой, эффективной и продолжительной его деградации [136].

В сенесцентных клетках блокада BRD4 с помощью ARV825 вызывает стойкий апоптоз, индуцированный аутофагией, за счёт, как минимум, двух независимых, но интегрированных путей: усиливает двухцепочечные разрывы ДНК (DSBs) путём блокирования репарации NHEJ и/или усиления экспрессии генов аутофагии [131].

В литературе также имеются данные о том, что определённым сенолитическим действием обладают антибиотики из группы макролидов — азитромицин и рокситромицин [137], низкомолекулярное производное цис-имидазолина — препарат нутлин-3а — белково-протеиновый ингибитор E3 убиквитин-протеинлигазы Mdm2 (MDM2), который гидрофобно взаимодействует с MDM2, занимая на ней сайт связывания с белком — супрессором p53 [138], а также природные соединения — флавоноид физетин [139] и полифенол куркумин [140].

Сеностатики (senostatics) или сеноморфики (senomorphics)

Подавление SASP без уничтожения сенесцентных клеток является альтернативным терапевтическим подходом для лечения заболеваний, связанных с клеточным старением.

Ингибиторы SASP (сеностатики) могут прямо или косвенно ослаблять SASP сенесцентных клеток путём ингибирования активности ядерного фактора транскрипции (NF)- κ B, серин/треониновой протеинкиназы I (mTOR1) и митохондриальных мишеней, связанных с дыхательными комплексами I или IV, а также блокады сигнального пути, сопряжённого с JAK-STAT или ряда других сигнальных путей, участвующих в индукции и поддержании SASP [141–143].

Основными мишенями сеностатических агентов являются сигнальные пути, напрямую определяющие интенсивность SASP и ответственные за инициацию/усиление хронической воспаленной реакции, а именно сигнальные пути, контролируемые NF- κ B, сопряжённый с ним mTOR1 сигнальный путь и регуляторный PI3k/Akt сигнальный каскад [144].

В основе активация NF- κ B и последующей его провоспалительной активности лежат сложные окислительно-восстановительные регуляторные взаимодействия, реализующиеся либо путём окисления цистеина в его ДНК-связывающей области, либо путём окисления ингибитора NF- κ B киназы (I κ B) [145]. Активация NF- κ B индуцирует транскрипцию генов медиаторов воспаления, таких как IL-6 и IL-8 [144].

mTOR1-обусловленная передача сигналов является основным промежуточным регулятором воспаления посредством контроля положительной обратной связи между NF- κ B и интерлейкином (IL)-1 α [146]. Помимо этого, mTOR1 способствует трансляции IL-1 α , который играет ключевую роль в поддержании SASP, влияя на ДНК-связывающую активность NF- κ B и белка, связывающего ССАТ-энхансер (C/EBP β), что инициирует транскрипцию IL-6 и IL-8 [144].

Имеются также данные о возможности контроля экспрессии SASP посредством усиленной трансляции MAPK-активируемой протеинкиназы 2 (MAPKAPK2 или MK2) [147]. В этом случае активация NF- κ B происходит посредством MK2-киназы, которая активируется при стрессе митоген-активируемой протеинкиназой p38 (p38MAPK) [148].

Активацию NF- κ B и повышение активности SASP может вызвать и фактор некроза опухоли (TNF)- α , который индуцирует фосфорилирование АК-киназы, в результате чего сигнальные молекулы и активатор фосфорилирования транскрипции 3 (STAT3) перемещаются в ядро клетки, где усиливают просенесцентную транскрипцию генов [149].

В норме ДНКазы, такие как дезоксирибонуклеаза II (DNase II) и экзонуклеаза репарации I (TREX), разрушают фрагменты цитоплазматической ДНК, исходящие из ядра или повреждённых митохондрий [150]. В сенесцентных клетках экспрессия этих ДНКаз подавлена, что приводит к накоплению в цитоплазме аномальных фрагментов цитоплазматической ДНК, инициирующих активизацию сигнальной оси ДНК-сенсоров — cGAS-STING, включающую в себя синтазу для вторичного мессенджера циклического GMP — AMP (cGAS) и циклический стимулятор рецепторов генов интерферона GMP-AMP (STING), что, в свою очередь, формирует SASP-фенотип [151].

Белок ламин B1 является одним из ключевых элементов ядерной мембраны, играющий решающую роль в функционировании и организации ядра. В процессе формирования сенесценса происходит снижение экспрессии ламина B1, расположенного на внутренней поверхности ядерной мембраны [152].

В результате дефицита белка ламин В1 происходит дестабилизация структуры ядра клетки, что приводит к формированию микроядер путём экструзии хроматина из ядра. Накопление ядерной ДНК в цитоплазме вызывает aberrантную активацию цитоплазматического ДНК-сенсора cGAS-STING, что провоцирует образование SASP-фенотипа посредством индукции интерферона- β [153].

Недавно было показано, что во время формирования сенесенса ретротранспозируемые элементы LINE-1 (тип генетического компонента, который копирует и вставляет себя в разные участки генома) накапливаются в клетке и запускают SASP путём инициации транскрипционной дерепрессии и последующей активации реакции клетки на интерферон I типа (IFN-I), которая является признаком позднего старения и способствует поддержанию секреторного фенотипа [154]. Увеличение количества цитоплазматической ДНК, продуцируемой ретротранспозонами LINE-1 в сенесцентных клетках, инициирует активацию оси cGAS-STING и, в частности сенесенс-связанного хронического воспаления — инфламмажа [154]. Показано, что молекулярно-таргетная терапия в течение двух недель мышей линии C57BL/6J (возраст 26 месяцев) нуклеозидным ингибитором обратной транскриптазы ламивудином подавляла активность IFN-I и, как следствие этого, снижала интенсивности инфламмажа [150, 154].

В конце 2023 году *Victorelli S с соавт.* опубликовали результаты исследования, из которого следует, что SASP-фенотип сенесцентных клеток может формироваться и за счёт накопления в цитозоле клеток митохондриальной ДНК (mtДНК) [155]. Авторы показали, что формирование распространённой проницаемости внешней мембраны митохондрий (MOMP) является признаком/триггером сенесенса. Для этого процесса, называемого миноритарным MOMP (miMOMP), требуется формирование во внешней мембране митохондрий макропор BAX и BAK, обеспечивающих высвобождение митохондриальной ДНК в цитозоль. В свою очередь, цитозольная mtДНК активирует один из основных триггеров SASP-сигнальный путь cGAS-STING.

Ингибиторы NF- κ B. Фактор транскрипции NF- κ B, являющийся центральным компонентом клеточного ответа на повреждение, стресс и воспаление, состоит из 5 субъединиц, RelA или p65, c-Rel, RelB, p50 и p52. С ДНК NF- κ B связывается в виде димеров, наиболее распространённым из которых является гетеродимер p65p50 [156]. Гетеродимер p65p50 локализован преимущественно в цитоплазме и поддерживается в этом неактивном состоянии за счёт секвестрации белка I κ B [156]. Активация NF- κ B по каноническому пути опосредуется вышестоящей I κ B-киназой (IKK), гетеротримером, состоящим из 2 каталитических субъединиц, IKK α и IKK β , и регуляторной субъединицей, называемой IKK γ или важным модулятором NF- κ B (NEMO) [156]. В ответ на различные факторы, включая

провоспалительные цитокины, патогены, окислительный стресс и факторы роста, IKK активируется и фосфорилирует I κ B, приводя к его полиубиквитинированию и последующей протеасомной деградации [157]. Деградация I κ B позволяет NF- κ B переместиться в ядро, где он, связываясь с родственной последовательностью ДНК, а также с коактиваторами, такими как CBP/p300, регулирует экспрессию генов [158].

Метформин. В качестве одного из возможных ингибиторов NF- κ B рассматривают эугликемическое лекарственное средство производное диметилбигуанида метформин, традиционно используемый для лечения пациентов с сахарным диабетом II типа. Препарат также оказывает противовоспалительное и кардиопротекторное действие [159].

Подавление избыточного глюконеогенеза метформином связано с его способностью активизировать АМФ-активируемую протеинкиназу (АМФК), в результате чего увеличивается экспрессия ядерного рецептора внутриклеточных факторов транскрипции SHP (малый гетеродимерный партнер или NR0B2), который, в свою очередь, подавляет экспрессию фосфонолпируват карбоксикиназы и глюкозо-6-фосфатазы, участвующих в глюконеогенезе [160].

Moiseeva O с соавт. в экспериментах *in vitro* показали, что метформин, подавляя фосфорилирование I κ B и IKK α/β , препятствовал активации NF- κ B и тем самым предотвращал его транслокацию в ядро клетки. Этот эффект препарата не связан с его активирующим влиянием в отношении АМПК, поскольку в экспериментах, проведённых на макрофагах мышиной клеточной линии RAW264.7, не экспрессирующих АМПК, метформин также ингибировал активность NF- κ B [143]. Кроме того, эти авторы в экспериментах на стареющих клетках IMR90 показали, что метформин ингибировал продукцию ROS и подавлял экспрессию генов провоспалительных цитокинов, не влияя на экспрессию генов противоопухолевых цитокинов.

В литературе имеются данные о том, что сеностатическое действие метформина связано или напрямую с ингибированием комплекса RasGTP-связывающих (Rag) GTPases, необходимого для активации mTORC1 [161], или косвенно увеличивая экспрессию p53-зависимым образом негативного регулятора mTOR — чувствительного к стрессу белка REDD1 [162]. В обоих случаях ингибирование mTOR происходит независимо от АМПК.

Помимо этого, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что метформин может индуцировать апоптоз [163, 164], т. е. помимо сеностатической проявлять и сенолитическую активность.

В экспериментах *in vivo* показано, что метформин значимо продлевает продолжительность жизни короткоживущих, склонных к опухолям самок мышей HER2/neu и самок мышей SHR [165, 166]. Также было показано, что скорость демографического старения трансгенных мышей HER-2/neu, оцененная соот-

ветствующими параметрами Гомперца, была снижена в 2,26 раза.

В литературе имеются единичные сообщения о том, что определённой сеностатической активностью обладает ингибитор NF-κB сесквитерпеновый лактон, содержащийся в растениях рода пиретрум — препарат партенолид [167].

Adler AS с соавт. сообщают о том, что «индуцируемая генетическая блокада NF-κB в течение 2 недель в эпидермисе хронологически состарившихся мышей вернула характеристики ткани и глобальные программы экспрессии генов к таковым у молодых мышей» [168].

Ингибиторы mTOR. О роли mTOR в инициации старения впервые сообщил в 2003 году *Vellai T с соавт.* [169]. Авторы этого исследования показали «что дефицит mTOR у нематоды *Caenorhabditis elegans* более чем удваивает её естественную продолжительность жизни».

Рапамицин. Рапамицин (Сиролимус) был открыт в 1972 году как вещество с противогрибковой активностью, выделяемое бактерией *Streptomyces hygroscopicus*, и рассматривался авторами как антифунгальный антибиотик [170]. Позднее у рапамицина была выявлена выраженная иммуносупрессивная активность, и его стали широко применять для предотвращения отторжения органов при трансплантации, особенно при трансплантации почек [171].

Интерес к рапамицину как сенолитику возник в 2009 году после публикации *Harrison DE с соавт.*, которые сообщили, что лечение рапамицином может значительно продлить продолжительность жизни мышей [172].

Сеностатическую активность рапамицина, который на сегодняшний день имеет самую аргументированную экспериментальную базу, позволяющую позиционировать его как потенциальное средство для профилактики/лечения сенесенса, связывают с его ингибирующим влиянием в отношении mTOR [173].

mTOR представляет собой серин/треониновую протеинкиназу, которая принадлежит к семейству киназ, связанных с фосфоинозитид-3-киназой (PI3K), и образует ядра двух больших белковых комплексов — mTORC1 и mTORC2 [174].

Известно, что mTORC1 фосфорилирует/регулирует активность таких субстратов, как S6-киназа 1 (S6K1), eIF4E-связывающий белок 1 (4E-BP1), транскрипционный фактор EB (TFEB), unc-51-подобная киназа 1 (Ulk1) и связанный с рецептором фактора роста белок 10 (GRB-10), а mTORC2 регулирует фосфорилирование Akt, сывороточной/глюкокортикоид-регулируемой киназы 1 (SGK1) и представителей семейства протеинкиназ C (PKC) [175].

Показано, что однократное применение или короткий курс лечения рапамицином инициирует ингибирование mTORC1 [176]. В отличие от mTORC1, изоформа mTORC2 не чувствительна к рапамицину.

Однако длительное лечение рапамицином косвенно подавляет активность mTORC2, необходимого для поддержания передачи сигналов Akt/PKB [177].

Систематическая терапия рапамицином оказывает комплексное воздействие на организм, значимо предотвращая формирование характерной для старения симптоматики:

- **Неврологические и когнитивные изменения.** Показано, что рапамицин препятствует зависящему от возраста снижению двигательной активности [178, 179]; в тесте «Rotarod» (вращающийся стержень) у пожилых животных способствует улучшению координации движений и равновесия [180]; улучшает обучение и память и оказывает сопутствующее анксиолитическое и антидепрессантное действие [181].

- **Структурные и функциональные изменения сердечно-сосудистой системы.** Показано, что рапамицин препятствует возраст-обусловленному увеличению массы миокарда и дилатации полостей сердца [180] и способствует поддержанию инотропной функции левого желудочка сердца [179], а также в определённой мере препятствует формированию характерных для «пожилого сердца» морфологических изменений — аномалии размера ядра и конформации хроматина [178]. В изолированных перфузированных сердцах, полученных от старых животных, рапамицин «обращает вспять связанное с возрастом снижение окисления жирных кислот, восстанавливая более молодое использование субстрата и энергетический профиль сердца» [182].

- **Изменения в опорно-двигательном аппарате.** Показано, что рапамицин значительной степени препятствовал формированию возрастных биомеханических изменений сухожилий [178].

- **Изменения в репродуктивной системе.** Показано, что на фоне терапии рапамицином наблюдалось значительное снижение распространённости патологической для «пожилых» животных гиперплазии эндометрия [178], вместе с тем у самцов, получавших препарат, наблюдалась значимая дегенерация яичек, превышающая таковую у контрольных животных [180].

Помимо рапамицина, способностью подавлять SASP путём ингибирования mTOR обладают и его структурные производные, так называемые «рапа-логи», к которым относятся препараты эверолимус, темсиролиму, ридафоролимус, зотаролимус и 32-дезоксо-рапамицин [142, 183].

Рибосомальная протеинкиназа S6β-1. Рибосомальная протеинкиназа S6β-1 (S6K1) представляет собой серин/треонинкиназу, расположенную ниже по течению сигнального пути mTOR [184]. Предполагают, что специфическое ингибирование не mTORC1, а S6K1 может быть не менее эффективно, чем терапия рапамицином. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре клеток пупочной вены человека (HUVECs), показано, что ингибирование S6K1 предотвращает эндотелиальную дисфункцию, экспрессию молекул адгезии и старение на фоне длительного применения

L-аргинина [185]. В исследованиях, выполненных на нокаутных по S6K1 (S6K1^{-/-}) мышах, показано, что делеция S6K1 «привела к увеличению продолжительности жизни и устойчивости к возрастным патологиям, таким как костная, иммунная и двигательная дисфункции, а также потеря чувствительности к инсулину» [186].

Активаторы NAD⁽⁺⁾-зависимой гистондеацетилазы — сиртуин-1 (Sirt-1). NAD⁽⁺⁾-зависимая гистондеацетилаза III класса — сиртуин-1 (Sirt1) представляет собой многофункциональный белок, критически участвующий в стрессовых реакциях, клеточном метаболизме и предупреждении сенесенса посредством деацетилирования различных субстратов, в том числе белка-супрессора p53, аутоантигенного белка p70 (Ku70), а также факторов транскрипции forkhead-box (FOXO1), гамма-коактиватор 1-α рецептора, активируемый пролифератором пероксисом (PGC-1α), NF-κB и гистонов, а также инфламасомы NLRP3 — многобелкового олигомерного комплекса, отвечающего за активацию воспалительного ответа. Предполагается, что негистоновая мишень Sirt1 белок p53 играет центральную роль в опосредованной Sirt1 регуляции сенесенса [187]. Показано, что в кардиомиоцитах стареющих животных нарушается нуклео-плазматическое перемещение Sirt-1, что снижает его активность и, напротив, приводит к повышению активности белка p53, что стимулирует сенесенс клеток сердца [188].

Ресвератрол. Ресвератрол (RSV) — природный фитоалексин, полифенол — производное транс-стильбена. Полагают, что сенесенс-протективный эффект RSV осуществляется посредством активации Sirt-1, приводящей к подавлению экспрессии белка p53 [190] и ингибированию активности инфламасомы NLRP3 [189]. Кроме того, RSV также повышает деацетилазную активность Sirt-1 за счёт усиления его связывания с ламином A — белковым активатором Sirt-1 [191].

В модельных экспериментах, воспроизводящих инфаркт миокарда у мышей, показано, что RSV, обладающий мощными антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, ингибировал экспрессию сенесенс-связанных белков (p16^{INK4a}, p19 и p53) и NLRP3, а также подавлял экспрессию интерлейкинов IL-1β, IL-6 и IL-18, а также TNF-α. Согласно результатам морфогистологических исследований, такое сеностатическое действие RSV препятствовало формированию SASP кардиомиоцитов и кардиофибробластов и приводило к уменьшению интенсивности фиброза и площади инфаркта миокарда [189]. В экспериментах *in vitro* RSV предотвращал индуцированный гипоксией сенесенс кардиомиоцитов, выделенных у новорождённых крыс (NRCM) [189]. Авторы этого исследования приходят к заключению о том, что RSV в экспериментах *in vivo* препятствует образованию сенесцентных кардиомиоцитов в ишемизированном миокарде, а в экспериментах *in vitro* предупреждает

развитие вызванного гипоксией сенесенса в NRCM.

В январе этого года были опубликованы результаты метаанализа (проанализированы 43 исследования), целью которого была оценка кардиопротективных эффектов RSV на модели ишемия-реперфузионного повреждения миокарда у крыс [192]. Авторы этого анализа сообщают о том, что RSV может в условиях ишемия/реперфузия уменьшить воспалительную реакцию и окислительное повреждение кардиомиоцитов, улучшить систолическую и диастолическую функцию левого желудочка сердца, уменьшить девиацию сегмента ST на ЭКГ и размер инфаркта миокарда, однако эти данные требуют дополнительного подтверждения.

Следует отметить, что имеются единичные сообщения о том, что RSV не является прямым активатором Sirt-1 [193].

В литературе также приводятся данные о том, что и метформин обладает свойствами прямого агониста Sirt-1 и в процессе старения может замедлять формирование сенесенса, вызванное, в том числе, и снижением уровня NAD⁺ [194].

Ингибиторы сигнального пути JAK / STAT, Руксолитиниб / Inhibitors of the JAK/STAT signaling pathway, Ruxolitinib

Сигнальный путь янус-киназа/активатор транскрипционных белков (JAK/STAT) играет жизненно важную роль в контроле продукции цитокинов [195], а поскольку молекулы SASP обычно экскретируют провоспалительные цитокины и хемокины, ингибирование пути JAK/STAT представляется привлекательным кандидатом для создания сеностатиков [196]. Показано, что у старых крыс повышены уровни экспрессии активированных янус-киназ — JAK1 и JAK2, с чем авторы связывают формирование сенесенса [141]. Аналогичные данные получены и в экспериментах *in vitro*, в которых показана решающая роль сигнального пути JAK/STAT в инициации сенесенса стволовых клеток хрящевого происхождения [197].

Руксолитиниб, ингибитор JAK1/2, уменьшает возрастные изменения в жировой ткани, резистентность к инсулину и дисфункцию стволовых клеток на моделях старения животных [15].

В экспериментах, выполненных на «пожилых» ослабленных 24-месячных мышах-самцах линии C57BL, показано, что селективный ингибитор JAK1/2 руксолитиниб (INCB18424) повышает физическую активность и частично восстанавливает сниженную с возрастом координацию движений. Помимо этого, подавление активности JAK1/2 способствовало понижению избыточной массы жировой ткани и уменьшало системное воспаление у «пожилых» мышей, о чём свидетельствует значимое уменьшение экспрессии таких маркеров воспаления, как IL-6, TNF-α, а также матричных металлопротеиназ 3 и 12 типов (ММП 3 и 12) [141].

В экспериментах *in vitro*, выполненных на стареющих преадипоцитах, показано, что в них повышен уровень мРНК таких ключевых компонентов SASP,

как IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 (MCP-1), MMP-3, MMP-12, ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) и TNF- α . Внесение в культуру клеток стареющих преадипоцитов руксолитиниба снижало уровень мРНК IL-6, IL-8 и MCP-1 $\approx$ на 60 %, а уровень мРНК MMP-3 и MMP-12 $\approx$ на 80 % [141].

Близкие результаты получены в работе Griveau A с соавт., которые в экспериментах на клеточной культуре фибробластов человека (MRC5) показали, что ингибирование пути JAK1/2 руксолитинибом предотвращает индуцированную прогеринном остановку клеточного цикла, преждевременное старение клеток и деформацию ядер [198], а в экспериментах на мышах продемонстрировали, что руксолитиниб снижает проявления нескольких фенотипов преждевременного старения, в частности уменьшает риск переломов ребер, повышает содержание минеральных веществ в костной ткани, увеличивает силу захвата и выживаемость животных.

Ингибиторы белка, связывающего полупиримидиновый тракт 1 (Ptbp1) / Inhibitors of the protein binding the polypyrimidine tract 1 (Ptbp1)

Белок, связывающий полипиримидиновый тракт 1 (Ptbp1), член семейства гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (hnRNP), принимает участие в регуляции процессинга пре-мРНК и других аспектах метаболизма и транспорта мРНК.

РНК-опосредованный интерференционный скрининг показал, что нацеливание на альтернативный сплайсинг (вариант сплайсинга матричных РНК (мРНК), при котором в ходе экспрессии гена на основе одного и того же первичного транскрипта (пре-мРНК) происходит образование нескольких зрелых мРНК) в стареющих клетках может быть жизнеспособным подходом для ингибирования SASP [199]. Georgilis A. с соавт. в диплоидных фибробластах человека, управляемых Ras, провели крупномасштабный библиотечный анализ РНК-интерференции (RNAi) для выявления транскриптов, нокдаун которых «отключает» связанный со старением SASP без ущерба для здоровых клеток [200]. В результате этих исследований был обнаружен регулятор альтернативного сплайсинга — белок Ptbp1, который регулирует альтернативный сплайсинг генов (EXOC7 и SNX14), контролирующих SASP. Было показано, что прямой нокдаун Ptbp1 сопровождается значимым ослаблением в различных клеточных линиях провоспалительного влияния SASP.

Помимо этого, в экспериментах *in vitro* показано, что истощение Ptbp1 способствовало получению сердечного транскрипта и повышало эффективность перепрограммирования мышинных фибробластов в индуцированные кардиомиоциты, что предлагает новую стратегию регенерации тканей миокарда [201].

Подобно сенолитическим средствам, лечение ингибиторами SASP должно быть прерывистым, чтобы

предотвратить побочные эффекты, связанные с действием этих препаратов на другие внутриклеточные сигнальные пути. Например, рапамицин может вызывать резистентность к инсулину [15].

Сенореверторы (Senoreverters)

В последнее время в литературе появились сообщения о том, что в определённых типах клеток сенесенс можно обратить вспять путём «возвращения» этих клеток в нормальный клеточный цикл, т. е. о возможном новом подходе к сенотерапии — создании сенореверторов [202]. Показано, что подавление сигнальных каскадов, сопряжённых с NF- κ B и/или mTOR, и/или PDK1 в стареющих фибробластах кожи человека устраняет признаки сенесенса и переводит клетки из стареющего фенотипа в состояние покоя, что приводит к восстановлению способности кожи к регенерации [203]. Lapasset L с соавт. продемонстрировали возможность прямого перепрограммирования сенесцентных соматических клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) при помощи шестифакторной комбинации генов OSKM, дополнительно содержащей гены NANOG и LIN28 [204]. Авторы этого исследования приходят к выводу, что «в совокупности наши результаты показывают, что, используя адекватную стратегию перепрограммирования, возможно эффективно перепрограммировать сенесцентные клетки и клетки, полученные от очень старых особей, в iPSC, и что сенесенс не является препятствием для перепрограммирования в сторону плюрипотентности».

В конце 2021 года Paramos-de-Carvalho D. в статье, опубликованной в журнале eLife, основываясь на анализе этих и ряде других публикаций, пишет: «Серьёзный вопрос, который следует рассмотреть, заключается в том, действительно ли мы хотим в конечном итоге уничтожить сенесцентные клетки, которые когда-то были фундаментальной и неотъемлемой частью гомеостаза нашего организма. Это может иметь решающее значение в тканях, не обладающих способностью к регенерации, например таких как нейроны ЦНС или кардиомициты, т. е. к возможности восстановления («повторному заселению») сенесцентных клеток. В определённых сценариях революционная стратегия заключалась бы в способности эффективно возвращать сенесцентные клетки в их исходное состояние. В связи с этим разработка «senoreverters» может стать ценной терапевтической стратегией, нацеленной на сенесенс. Однако следует тщательно изучить возможные последствия использования «senoreverters» для обращения вспять состояния сенесенса» [205].

Заключение / Conclusion

Преждевременное старение сердца — сенесенс — в настоящее время рассматривают как потенциальную причину развития самых разнообразных заболеваний сердечно-сосудистой системы. Пред-

полагается, что критическое накопление массы сенесцентных клеток, т. е. формирование активного SASP-фенотипа, приводит к паракринно-обусловленному увеличению числа сенесцентных клеток, которое опережает способность иммунной системы их элиминировать, что приводит к «лавинообразному» накоплению стареющих клеток и резкому прогрессированию патологического процесса. Не менее важно и то, что ускоренное накопление стареющих клеток с активным SASP-фенотипом может предрасполагать к формированию самых различных возрастных заболеваний и, возможно, лежать в основе развития возрастной мультиморбидности.

Следует также отметить, что вопрос, каким образом каждый тип клеток, формирующих ткань сердца, в условиях сенесценсы влияет на его функциональную активность, достаточно далек от своего решения. Вместе с тем, именно ответ на этот вопрос позволяет разработать эффективные и специализированные фармакологические стратегии, направленные на предотвращение формирования стресс-обусловленного сенесценсы в ткани сердца.

Это направление исследований представляется крайне важным, поскольку известно, что ткань сердца на $\approx 25\text{--}30\%$ формируют сократительные и проводящие кардиомиоциты и на $\approx 70\%$ не кардиомиоциты, преимущественно кардиофибробласты и эндотелиальные клетки и в меньшей степени $\approx 5\%$ перикарды. Но даже если говорить о сократительных кардиомиоцитах, следует отметить, что они далеко не однородны: сократительные кардиомиоциты предсердий, в отличие от желудочковых, в частности имеют способность к митозу, содержат на 40% меньше миофибриллярных элементов и имеют секреторные гранулы, экскретирующие натрийуретический пептид и, возможно, ренин.

Помимо этого, существует достаточно большое количество других фундаментальных проблем, требующих своего решения, среди них: динамика появ-

ления и накопления сенесцентных клеток; их вклад в формирование/прогрессирование системных и/или локальных патофизиологических процессов; гетерогенность клеточного старения; поиск единого универсального маркера сенесценсы и т. д.

Хочется надеяться, что начатые в последнее время эпигенетические, метаболомные или протеомные исследования механизмов, лежащих в основе сенесценс-обусловленного поражения сердца, позволят решить эти и другие фундаментальные проблемы и предложат персонализированную терапию заболеваний, связанных с сенесценсом.

Также далека от своего окончательного решения и проблема создания высокоэффективных сенотерапевтических средств. Первые публикации, посвященные такого рода соединениям, относятся к 2015 году. В настоящее время известно уже более 20 биологически активных соединений и лекарственных средств, обладающих сенолитической и/или сеностатической активностью.

Вместе с тем, несмотря на то что результаты доклинических исследований являются многообещающими, до настоящего времени отсутствуют клинические испытания, демонстрирующие безопасность и эффективность сенолитиков или ингибиторов SASP. Не менее важно и то, что практически все известные биологически активные соединения и препараты в определенной мере, за исключением метформина, обладают широким спектром побочных эффектов, что в существенной мере ставит под вопрос целесообразность их клинического применения.

Таким образом, можно говорить о том, что поиск новых оригинальных, ключевых для формирования сенесценсы биомолекул и создание на их основе инновационных лекарственных средств, в частности кардиотропных, обладающих сенолитической и/или сеностатической активностью, представляется актуальной задачей.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

См. список литературы на сайте

https://www.pharmacokinetica.ru/jour/manager/files/литература_Статья_Крыжановский.pdf

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Крыжановский Сергей Александрович

Автор, ответственный за переписку

д. м. н., зав. лабораторией фармакологии
кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация

e-mail: kryzhanovskij_sa@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>

РИНЦ SPIN-код: 6596-4865

Sergey A. Kryzhanovskii

Corresponding author

PhD, Dr. Sci. (Med.), Head of Laboratory of Cir-
culation Pharmacology Federal research center for
innovator and emerging biomedical and pharma-
ceutical technologies, Moscow, Russian Federation

e-mail: kryzhanovskij_sa@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>

RSCI SPIN code: 6596-4865

Вититнова Марина Борисовна

к. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологии
кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>

РИНЦ SPIN-код: 1901-8919

Marina B. Vititnova

PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher of
Laboratory of Circulation Pharmacology Federal
research center for innovator and emerging bio-
medical and pharmaceutical technologies, Moscow,
Russian Federation

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>

RSCI SPIN code: 1901-8919



Роль биотрансформации и химического строения лекарственных средств в диагностике лекарственной аллергии

Мясникова Т. Н.¹, Смирнов В. В.^{1,2}

¹ — ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Российская Федерация

² — ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

Аннотация

Актуальность. Несмотря на то, что фармакологическое действие лекарственных средств хорошо известно и изучено, к сожалению, предсказать развитие лекарственной аллергии (ЛА) невозможно, так как в её развитии большое значение имеют индивидуальные особенности реактивности организма.

Цель — анализ клинической ситуации развития лекарственной аллергии для иллюстрации важности роли биотрансформации и химического строения лекарственных средств в её диагностике.

Методы. Исследование было проведено на пациенте после подписания информированного согласия и включало в себя сбора анамнеза, физикальный осмотр, скарификационные кожные пробы с ингаляционными аллергенами, установки периферического венозного катетера, провокационное тестирование.

Результаты. Прик-тесты с: 0,9 % раствором NaCl (отрицательный контроль), раствором гистамина (10 мг/мл) (положительный контроль), амоксициллином + клавулановой кислотой (100 мг + 20 мг), ампициллином (100 мг/мл), цефалексином (50 мг/мл) — результаты положительные, цефтазидимом (20 мг/мл), кларитромицином (20 мг/мл) — результаты отрицательные; в/к тесты с: 0,9 % раствором NaCl (отрицательный контроль), цефтазидимом (2 мг/мл), кларитромицином (0,01 мг/мл) — результаты отрицательные; пероральный провокационный дозируемый тест (ПДТ) с цефуроксимом (кумулятивная доза — 250 мг), джозамицином (кумулятивная доза — 1000 мг) — результаты отрицательные. В результате проведённого кожного тестирования подтверждена ЛА на аминогруппу бета-лактамов; данных, касающихся ЛА, бета-лактамного кольца, клавулановой кислоты, макролидов не получено.

Ключевые слова: лекарственная гиперчувствительность; лекарственная аллергия; биотрансформация; диагностика

Для цитирования:

Мясникова Т. Н., Смирнов В. В. Роль биотрансформации и химического строения лекарственных средств в диагностике лекарственной аллергии. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(3):20-24. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-3-20-24>. EDN: PGBVUA

Поступила: 05.07.2024. В доработанном виде: 07.08.2024. Принята к печати: 07.09.2024. Опубликовано: 30.09.2024.

The role of biotransformation and chemical structure of drugs in the diagnosis of drug allergies

Tatiana N. Myasnikova¹, Valerii V. Smirnov^{1,2}

¹ — National Research Center – Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

² — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract

Relevance. Despite the fact that the pharmacological effect of drugs is well known and studied, unfortunately, it is impossible to predict the development of drug allergies, since the individual characteristics of the body's reactivity are of great importance in its development. The goal is to analyze the clinical situation of the development of drug allergies to illustrate the importance of the role of biotransformation and the chemical structure of drugs in its diagnosis.

Methods. The study was carried out on the patient after signing informed consent and included anamnesis, physical examination, skin prick tests with inhalant allergens, installation of a peripheral venous catheter, and provocative testing.

Results. prick tests with: 0.9 % NaCl solution (negative control), histamine solution (10 mg/ml) (positive control), amoxicillin + clavulanic acid (100 mg + 20 mg), ampicillin (100 mg/ml), cephalexin (50 mg/ml) — positive results, ceftazidime (20 mg/ml), clarithromycin (20 mg/ml) — negative results; intravenous tests with: 0.9 % NaCl solution (negative control), ceftazidime (2 mg/ml), clarithromycin (0.01 mg/ml) — negative results; oral PDT with cefuroxime (cumulative dose — 250 mg), josamycin (cumulative dose — 1000 mg) — negative results. As a result of skin testing, LA for the amino group of beta-lactams was confirmed; No data have been obtained for LA on the beta-lactam ring, clavulanic acid, or macrolides.

Keywords: drug hypersensitivity; drug allergies; biotransformation; diagnostics

For citations:

Myasnikova TN, Smirnov VV. The role of biotransformation and chemical structure of drugs in the diagnosis of drug allergies. *Farmakokinetika i farmakodinamika* = *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(3):20-24. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-3-20-24>. EDN: PGBVUA

Received: 05.07.2024. Revision received: 07.08.2024. Accepted: 07.09.2024. Published: 30.09.2024.

Введение / Introduction

Лекарственная гиперчувствительность (ЛГ) — это реакция на введение лекарственных средств (ЛС), которая клинически проявляется симптомами, характерными для аллергических реакций, и которая развивается на приём терапевтических доз ЛС [1]. В свою очередь, ЛГ подразделяется на аллергическую (лекарственная аллергия (ЛА)) и неаллергическую (псевдоаллергия). ЛА — иммунологически-опосредованная реакция, в развитии которой участвуют иммунные механизмы. Неаллергическая ЛГ — неиммунологически-опосредованная, в развитии которой не участвуют иммунные механизмы [2]. Несмотря на то, что фармакологическое действие лекарственных препаратов (ЛП) хорошо известно и изучено, к сожалению, предсказать развитие ЛГ невозможно, так как в развитии реакций ЛГ большое значение имеют индивидуальные особенности реактивности организма. Интенсивность биотрансформации ЛП и преобладание тех или иных её путей в каждом конкретном случае может значительно отличаться. При этом не следует забывать, что причиной развития ЛА может быть не только сам ЛП, но и его метаболиты [3, 4]. Выраженность реакций ЛГ может быть различной по клиническим проявлениям их течения и степени тяжести, вплоть до летальных исходов. *Johansson SG et al.* показали, что в США зарегистрировано 106 000 смертельных случаев в год из-за побочных реакций на ЛП у госпитализированных пациентов [1].

Полные антигены (бактерии, вирусы, ЛП с высокой молекулярной массой и т. п.) активируют врождённую иммунную систему, например, через Toll-подобные рецепторы, и подают начальный сигнал тревоги и активируют антиген-презентирующие клетки (АПК), которые фагоцитируют антиген и мигрируют в регионарные лимфатические узлы. В лизосомах АПК происходит процессинг антигенов и их представление в виде пептидов в ассоциации с главным комплексом гистосовместимости Т-клеткам преимущественно лимфатических узлов. Развивается иммунный ответ, направленный на элиминацию аллергена. Таким образом, полные антигены обладают и антигенностью, и иммуногенностью.

ЛП — это вещества с низкой молекулярной массой (<1000 Да), то есть они слишком малы, чтобы запускать иммунный ответ. Несмотря на это, было показано, что ЛП могут быть триггерами таких реакций [5, 6]. В настоящее время существуют три концепции презентации лекарственных антигенов: гаптенная, прогаптенная и теория фармакологического взаимодействия ЛП с иммунными рецепторами (p-i concept: pharmacological interaction of drugs with immune receptors).

Гаптенная концепция. Данная концепция предполагает, что маленькие молекулы могут стать анти-

генными, связавшись с белками с высокой молекулярной массой. Гаптены — химически активные мелкие молекулы, которые способны вступать в стабильную связь с большими белками или пептидами, что приводит к модификации боковых цепей.

Прогаптенная концепция. Многие препараты химически неактивны, но они, тем не менее, способны вызывать иммуно-опосредованные реакции. Гипотеза прогаптенов заключается в том, что химически инертное лекарство может стать реактогенным в ходе метаболизма или биотрансформации [7, 8]. Например, сульфаметоксазол сам по себе химически неактивен, но приобретает активность и, следовательно, антигенность в ходе внутриклеточного метаболизма в печени. Цитохром Р450-зависимый метаболизм (CYP2C9) приводит к формированию сульфаметоксазол-гидроксиламина, который может быть обнаружен в моче и который легко окисляется в нитрозосульфаметаксозол. Последний обладает высокой химической активностью и легко связывается с внутриклеточными белками, создавая новые антигенные детерминанты [9].

Концепция фармакологического взаимодействия ЛС и иммунных рецепторов (p-i концепция) / The concept of pharmacological interaction of drugs and immune receptors (p-i concept)

Согласно гаптенной и прогаптенной концепциям, ЛС и другие вещества, которые химически неактивны, и, следовательно, неспособны образовывать соединения с белками, не будут антигенами и не смогут вызвать реакции гиперчувствительности. Однако это не так, и есть клинические и иммунологические данные, которые нельзя объяснить с позиции гаптенов и прогаптенов [10]. Согласно p-i концепции, химически инертные препараты, неспособные ковалентно связываться с белками, могут активировать некоторые Т-клетки, если у них есть высокий аффинитет к одному из разнообразных Т-клеточных рецепторов или к представленным молекулам главного комплекса гистосовместимости. Т-клетки, активированные *in vivo*, размножаются и впоследствии инфильтрируют кожу и другие органы. Эффекторными клетками и клетками памяти имеют значительно более низкий порог активации, чем наивные Т-клетки. Интересно, что хотя p-i взаимодействие было доказано для многих лекарств (сульфаметоксазол, лидокаин, ламотриджин, карбамазепин, р-фенилендиамин, рентгеноконтрастные средства) [11], все их метаболиты также могут участвовать в реакциях ЛГ. Анализ различных реакций ЛГ у некоторых пациентов показал присутствие гаптенов, p-i взаимодействия одновременно с исходным веществом и его метаболитами [12]. Это означает, что одни Т-клетки реагируют с исходным препаратом

(p-i механизм), другие — с гаптеном, а некоторые — с исходным препаратом и гаптеном одновременно.

Очевидно, что при диагностике ЛГ необходимо учитывать знания фармакокинетики ЛС, в том числе структуру его возможных метаболитов. Если не учитывать биотрансформацию ЛС, то можно получить ложные результаты диагностики: гипердиагностику, когда в результате пациенту будет запрещён приём ЛС, на которые у него в действительности нет ЛА, и гиподиагностику, когда пациенту будет разрешён приём ЛС, на которые у него будет развиваться аллергическая реакция. При этом, необходимо учитывать химическое строение ЛС, особенно это касается бета-лактамов антибиотиков. Выявление конкретной детерминанты, отвечающей за аллергический ответ, является крайне важным в диагностике ЛА к этой группе препаратов. В связи с этим целью работы является анализ клинической ситуации развития лекарственной аллергии для иллюстрации важности роли биотрансформации и химического строения лекарственных средств в её диагностике.

Материалы и методы / Materials and methods

Пациент Г., 56 лет, обратился с жалобами на несколько перенесённых анафилактических реакций, возможно связанных с применением ЛП. *Фармакологический анамнез*: считает себя больным с лета 2022 г., когда впервые в жизни отметил генерализованную зудящую гиперемию кожи, отёчность всего тела, слабость, шаткость походки, плохое самочувствие, в связи с чем вызвал бригаду скорой медицинской помощи, которая приехала через 15 мин. При осмотре отмечена гипотония. Введён адреналин, дексаметазон, супрастин с положительным эффектом. Через 20 мин состояние значительно улучшилось. Через 2 ч состояние полностью нормализовалось. Данное состояние связал с употреблением томатов, небольшого количества пива. Приём ЛП отрицал. После этого отмечал подобные состояния 2 раза. Дважды госпитализация в стационар по месту жительства. Помимо гипотонии, генерализованных зудящих высыпаний отмечал боли в животе, потерю сознания. Связывал с применением поливитаминов (витамины А, С, Е), возможно, был приём амоксициллина + клавулановая кислота (амоксиклав). В ноябре 2022 г. направлен к гастроэнтерологу для лечения эрозивного гастрита. Через 10 мин после приёма амоксициллина (флемоксин) и джозамицина (вильпрафен) (приём джозамицина впервые в жизни) аналогичная реакция с потерей сознания, артериальное давление (АД) 40/0 мм рт. ст. госпитализирован в отделение реанимации.

Консультирован в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, назначено обследование: сывороточная триптаза (базальный уровень) — 4,40 мкг/л (норма 0,00–11,0), специфические IgE (тест

система ImmunoCAP) к пенициллину G 0,00 кЕдА/л (класс 0), пенициллину V 0,05 кЕдА/л (класс 0); аллергенным детерминантам ампициллоилу и амоксициллоилу — анализ не сделан. Учитывая тяжесть перенесённой реакции, госпитализирован в отделение реанимации и интенсивной терапии для проведения провокационного тестирования с ЛП. *Аллергоанамнез*: в течение 3 лет в сезон апрель–май, отмечает конъюнктивит. Применяет супрастин с положительным эффектом. Скарификационные кожные пробы с ингаляционными аллергенами отрицательные. *Данные осмотра при поступлении*: рост: 182 см, масса тела 82 кг, температура тела 36,5 °С. Общее состояние: удовлетворительное. Кожные покровы: телесного цвета, обычной влажности, без патологических высыпаний. Видимые слизистые: розовые, без патологических высыпаний. Подкожная жировая клетчатка: развита нормально. Лимфатические узлы: не пальпируются, не увеличены. Органы движения (костно-мышечная система): без патологических изменений. Органы дыхания: носовое дыхание свободное с обеих сторон. Частота дыхательных движений (ЧДД): 17 в мин. Аускультация лёгких: дыхание везикулярное, хрипов нет. Сердечно-сосудистая система: тоны сердца ясные, ритм правильный, патологические шумы не определяются. АД: 130/98 мм рт. ст. Частота пульса: 64 удара в мин. Органы пищеварения: живот — пальпация органов брюшной полости безболезненна, печень не увеличена, селезёнка не пальпируется. Стул: нормальный, оформленный, без патологических включений, регулярный. Мочеполовая система: патологические изменения не определяются, область проекции почек внешне не изменена, симптом поколачивания отрицательный. После получения информированного согласия, установки периферического венозного катетера было проведено провокационное тестирование с ЛП: амоксициллином + клавулановой кислотой (100 мг + 20 мг, н/к), ампициллином (100 мг/мл, н/к), цефалексином (50 мг/мл, н/к), цефтазидимом (20 мг/мл, н/к), кларитромицином (20 мг/мл, н/к), цефтазидимом (2 мг/мл, в/к), кларитромицином (0,01 мг/мл, в/к), цефуросимом (кумулятивная доза — 250 мг, п/о), джозамицином (кумулятивная доза — 1000 мг, п/о) — результаты отрицательные.

Результаты и их обсуждение / Results and discussion

Оценка результатов провокационного тестирования:

- прик-тесты с: 0,9 % раствором NaCl (отрицательный контроль), раствором гистамина (10 мг/мл) (положительный контроль), амоксициллином + клавулановой кислотой (100 мг + 20 мг), ампициллином (100 мг/мл), цефалексином (50 мг/мл) (рис. 1 а–в) — результаты положительные, цефтазидимом (20 мг/мл),



а



б



в

Рис. 1. Положительные результаты прик-тестов (оценка через 20 минут) с:

а — ампициллином (100 мг/мл); б — амоксициллином + клавулановая кислота (100 мг/мл + 20 мг/мл); в — цефалексином (50 мг/мл)

Fig. 1 (a–c). Positive results of prick tests (assessment after 20 minutes) with:

а — ampicillin (100 mg/ml); б — amoxicillin + clavulanic acid (100 mg/ml + 20 mg/ml); в — cephalexin (50 mg/ml)

кларитромицином (20 мг/мл) — результаты отрицательные;

- в/к тесты с: 0,9 % раствором NaCl (отрицательный контроль), цефтазидимом (2 мг/мл), кларитромицином (0,01 мг/мл) — результаты отрицательные;
- пероральный ПДТ с цефуросимом (кумулятивная доза — 250 мг), джозамицином (кумулятивная доза — 1000 мг) — результаты отрицательные.

В результате проведённого кожного тестирования подтверждена ЛА на аминогруппу бета-лактамов; данных за ЛА на бета-лактамовое кольцо, клавулановую кислоту, макролиды не получено.

Диагноз: ЛА на аминогруппу бета-лактамов: анафилактический шок.

Благодаря проведённому тестированию запрещено применение только бета-лактамов с аминогруппой (аминопенициллинов (ампициллин, амоксициллин), цефалоспоринов с идентичной боковой цепью (аминогруппой) (цефалексин, цефаклор, цефрадин, цефалоглицин, лоракарбеф, цефатризин, цефпрозил, цефадроксил). Противопоказаний для применения бета-лактамов без аминогруппы (бензилпенициллина, пиперациллина, цефтриаксона, цефотаксима, цефепима, цефазолина, цефоперазона, цефтазида, цефтибутена, цефиксима, цефуросима, цефподоксима, цефдиторена, карбапенемов, азтреонама) нет.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

Authors' participation

All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication.

Funding

The work was carried out without sponsorship.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Мясникова Татьяна Николаевна

Автор, ответственный за переписку

к. м. н., врач аллерголог-иммунолог, старший научный сотрудник, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: t_miasnikova@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8491-195X>

Tatiana N. Myasnikova

Corresponding author

PhD, Cand. Sci. (Med), Allergist, Senior Research Associate, NRC Institute of Immunology, FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: t_miasnikova@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8491-195X>

Смирнов Валерий Валерьевич

д. фарм. наук, зав. научно-производственным комплексом ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации им. А.П. Нелюбина, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8232-6682>

Valerii V. Smirnov

PhD, Dr. Sci. (Pharm), Head of Research and Production Department, NRC Institute of Immunology, FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; Professor of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry Chair named after A.P. Arzamastsev, Institute of Pharmacy named after A.P. Neliubin, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the MOH of Russia (Sechenov University), Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8232-6682>

Список литературы / References

1. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 May;113(5):832-6. doi: 10.1016/j.jaci.2003.12.591. PMID: 15131563.
2. Лекарственная аллергия. Методические рекомендации для врачей. Под редакцией Хайтова Р.М. — Москва, 2012 — 74 с. / Н.И. Ильина, Т.В. Латышева, Т.Н. Мясникова и др. [Lekarstvennaya allergiya. Metodicheskie rekomendatsii dlya vrachei. Ed by Khaitova RM. Moscow, 2012. / NI Il'ina, TV Latysheva, TN Myasnikova, et al. (In Russ.)].
3. Demoly P, Adkinson NF, Brockow K, et al. International Consensus on drug allergy. *Allergy*. 2014 Apr;69(4):420-37. doi: 10.1111/all.12350.
4. deShazo RD, Kemp SF. Allergic reactions to drugs and biologic agents. *JAMA*. 1997 Dec 10;278(22):1895-906.
5. Pichler WJ. Immune pathomechanism and classification of drug hypersensitivity. *Allergy*. 2019 Aug;74(8):1457-1471. doi: 10.1111/all.13765.
6. Romano A, Atanaskovic-Markovic M, Barbaud A, et al. Towards a more precise diagnosis of hypersensitivity to beta-lactams - an EAACI position paper. *Allergy*. 2020 Jun;75(6):1300-1315. doi: 10.1111/all.14122.
7. Pichler WJ. The p-i Concept: Pharmacological Interaction of Drugs With Immune Receptors. *World Allergy Organ J*. 2008 Jun;1(6):96-102. doi: 10.1097/WOX.0b013e3181778282.
8. Mallal S, Nolan D, Witt C, et al. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet*. 2002 Mar 2;359(9308):727-32. doi: 10.1016/S0140-6736(02)07873-x.
9. Tassaneeyakul W, Jantararoungtong T, Chen P, et al. Strong association between HLA-B*5801 and allopurinol-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in a Thai population. *Pharmacogenet Genomics*. 2009 Sep;19(9):704-9. doi: 10.1097/FPC.0b013e328330a3b8.
10. Kaniwa N, Saito Y, Aihara M, et al. HLA-B locus in Japanese patients with anti-epileptics and allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Pharmacogenomics*. 2008 Nov;9(11):1617-22. doi: 10.2217/14622416.9.11.1617.
11. Lochareonkul C, Loplumler J, Limotai C, et al. Carbamazepine and phenytoin induced Stevens-Johnson syndrome is associated with HLA-B*1502 allele in Thai population. *Epilepsia*. 2008 Dec;49(12):2087-91. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01719.x. Epub 2008 Jul 14. Erratum in: *Epilepsia*. 2009 Apr;50(4):971.
12. McCormack M, Alfrevic A, Bourgeois S, et al. HLA-A*3101 and carbamazepine-induced hypersensitivity reactions in Europeans. *N Engl J Med*. 2011 Mar 24;364(12):1134-43. doi: 10.1056/NEJMoa1013297.



Синтез и изучение антидепрессантоподобного эффекта гексаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-*D*-серил-*D*-лизина), энантиомера дипептидного миметика BDNF ГСБ-106

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

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

Аннотация

Ранее нами на основе β -изгиба четвертой петли мозгового нейротрофического фактора был получен ГСБ-106 (гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина), обладающий выраженными нейропротекторной и антидепрессивной активностями в дозах 0,1–10 мг/кг при внутривенном и пероральном введении. Для выявления стереоспецифичности антидепрессантоподобного эффекта ГСБ-106 в настоящей работе синтезирован его энантиомер (ГСБ-106DD) и изучены его антидепрессантоподобные свойства. Показано, что у ГСБ-106DD антидепрессантоподобный эффект при внутривенном введении в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг отсутствует. Делается вывод о стереоспецифичности антидепрессантоподобной активности ГСБ-106, т. е. о её зависимости от конфигурации аминокислотных остатков.

Ключевые слова: мозговой нейротрофический фактор; BDNF; дипептидный миметик; ГСБ-106; энантиомер; стереоспецифичность; антидепрессивная активность

Для цитирования:

Сазонова Н. М., Тарасюк А. В., Филиппова М. Ю., Мельникова М. В., Никифоров Д. М., Поварнина П. Ю., Гудашева Т. А., Дорофеев В. Л. Синтез и изучение антидепрессантоподобного эффекта гексаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-*D*-серил-*D*-лизина), энантиомера дипептидного миметика BDNF ГСБ-106. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(3):25-37. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-3-25-37>. EDN: CDTRWE

Поступила: 26.06.2024. **В доработанном виде:** 27.07.2024. **Принята к печати:** 07.09.2024. **Опубликована:** 30.09.2024.

Synthesis and the antidepressant-like activity investigation of bis-(*N*-monosuccinyl-*D*-seryl-*D*-lysine) hexamethylenediamide, the DD-enantiomer of the BDNF dipeptide mimetic, compound GSB-106

Nellya M. Sazonova, Alexey V. Tarasyuk, Maria Yu. Filippova, Marina V. Melnikova, Dmitry M. Nikiforov,
Polina Yu. Povarnina, Tatiana A. Gudasheva, Vladimir L. Dorofeev

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

Abstract

Previously, based on the β -turn of the fourth loop of the brain-derived neurotrophic factor, we obtained GSB-106 (bis-(*N*-monosuccinyl-*L*-seryl-*L*-lysine) hexamethylenediamide), that has pronounced neuroprotective and antidepressant activities in doses of 0.1–10 mg/kg with intraperitoneal and oral administration. For identifying the stereospecificity of the antidepressant-like effect of GSB-106, in this work its enantiomer (GSB-106DD) was synthesized and its antidepressant-like properties were studied. It was shown that GSB-106DD has no antidepressant-like effect when administered intraperitoneally in doses of 0.1 and 1.0 mg/kg. It can be assumed that the stereospecificity of the antidepressant-like activity of GSB-106 dependence on the configuration of amino acid moieties.

Keywords: brain-derived neurotrophic factor; BDNF; dipeptide mimetic; GSB-106; enantiomer; stereospecificity; antidepressant activity

For citations:

Sazonova NM, Tarasyuk AV, Filippova MYu, Melnikova MV, Nikiforov DM, Povarnina PYu, Gudasheva TA, Dorofeev VL. Synthesis and the antidepressant-like activity investigation of bis-(*N*-monosuccinyl-*D*-seryl-*D*-lysine) hexamethylenediamide, the DD-enantiomer of the BDNF dipeptide mimetic, compound GSB-106. *Farmakokinetika i farmakodinamika* = *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(3):25-37. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-3-25-37>. EDN: CDTRWE

Received: 26.06.2024. **Revision received:** 27.07.2024. **Accepted:** 07.09.2024. **Published:** 30.09.2024.

Введение / Introduction

Хорошо известно о ключевой роли BDNF в патогенезе депрессии и его антидепрессантоподобном потенциале [1].

В «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» в соответствии с оригинальной гипотезой о ведущей роли центральных участков бета-изгибов в распознавании белковых лигандов рецептором, на основе структуры бета-изгиба наиболее экспонированной 4-й петли мозгового нейротрофического фактора (BDNF) был создан его димерный дипептидный миметик гексаметилендиамид *бис*-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина) (ГСБ-106) [2–6]. ГСБ-106, аналогично полноразмерному BDNF, активировал TrkB рецепторы и их основные пострецепторные сигнальные пути PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC γ [7, 8]. Селективность взаимодействия ГСБ-106 с TrkB рецепторами была подтверждена с помощью нокаутных по генам *trka* и *trkb* гиппокампальных клеток мыши линии HT-22 [9].

Дипептид ГСБ-106 проявил антидепрессантоподобную активность в батарее тестов на грызунах (тест вынужденного плавания по Порсолту, тест вынужденного плавания в сосуде с вращающимися колесами по Номура, тест подвешивания за хвост) при системном введении, включая пероральное, в диапазоне доз 0,1–5 мг/кг [10, 11]. Антидепрессантоподобная активность ГСБ-106 была также выявлена на экспериментальных моделях депрессивно-подобного состояния на мышах, воспроизводящих основные патофизиологические механизмы и симптомы депрессии. Так, на модели хронического социального стресса на мышах ГСБ-106 при хроническом пероральном введении (0,1 мг/кг) после окончания стрессирования полностью противодействовал проявлению агедонии и снижению иммунореактивности к синаптофизину и транскрипционному фактору CREB (маркер нейропластичности), а также к его фосфорилированной форме, в гиппокампе [12]. Введение ГСБ-106 мышам на фоне хронического непредсказуемого умеренного стресса (хронически, перорально, на фоне стресса, 1 мг/кг) полностью препятствовало развитию депрессивноподобного состояния по результатам теста вынужденного плавания, а также снижению содержания BDNF в префронтальной коре и гиппокампе [13]. Также ГСБ-106 противодействовал развитию депрессивноподобного состояния у крыс с экспериментальным ишемическим инсультом, индуцированным окклюзией средней мозговой артерии [14]. С помощью фармакологического ингибиторного анализа было показано, что антидепрессантоподобная активность ГСБ-106 опосредована активацией TrkB рецепторов и трёх их основных пострецепторных сигнальных каскадов PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC γ [15].

В рамках Государственной программы «Фарма 2020» был завершён полный цикл доклинических исследований ГСБ-106 в качестве перспективного, первого в классе антидепрессанта с нейротрофическим механизмом действия (Гос. контракт №14–N08–12–0086).

При производстве оптически активных лекарственных препаратов важно знать, как на их активность может повлиять возможная рацемизация. Эти данные получают при изучении стереоспецифичности эффектов фармакологически активной субстанции.

Целью данной работы явилось выявление стереоспецифичности антидепрессантоподобного действия ГСБ-106. Для этого был синтезирован энантиомер ГСБ-106 — гексаметилендиамид *бис*-(*N*-моносукцинил-*D*-серил-*D*-лизина) (ГСБ-106DD) и изучена его антидепрессантоподобная активность в тесте вынужденного плавания по Порсолту на мышах.

Материалы и методы / Materials and methods

Список сокращений

Ag — арильный заместитель; Boc — трет-бутилоксикарбонил; COSY — гомоядерная корреляция; DMSO — диметилсульфоксид; HSQC — гетероядерная одноквантовая корреляция; HMBC — гетероядерная многосвязная корреляция; Lys — лизил; OPfr — пентафторфенил; OSu — оксисукцинил; Pd/C — катализатор: наночастицы палладия на поверхности активированного угля; TFA — трифторуксусная кислота; Ser — серил; Z — бензилоксикарбонил; ДИПЭА — диизопропилэтиламин; ДМПДА — диметилпропилендиамин; ДМФА — диметилформамид; ДЦГК — дициклогексилкарбодиимид; ДЦГМ — дициклогексилмочевина; т.пл. — температура плавления; ТСХ — тонкослойная хроматография; ТФУ — трифторуксусная кислота; ЭА — этилацетат; ЯМР — ядерный магнитный резонанс.

Исходные вещества и вспомогательные реагенты

В работе использовали коммерческие аминокислоты *H*-*D*-Ser-OH, *Z*-*D*-Lys(Boc)-OH**D*CHA, а также вспомогательные реагенты пентафторфенол (Pfr-OH), трифторуксусная кислота (ТФУ) и дициклогексилкарбодиимид (ДЦГК) (Sigma-Aldrich, Германия; AlfaAesar, США).

Растворители: этилацетат, диметилформамид (ДМФА), диэтиловый эфир, дихлорметан, гексан, MeOH были получены у ООО ТД «Химмед» (Россия). ДМФА очищали перегонкой в вакууме над нингидрином. Диэтиловый эфир выдерживали над NaOH, затем фильтровали через бумажный фильтр. Дихлорметан пропускали через колонку с Al₂O₃. Этилацетат и спирты использовали без дополнительной очистки.

Аналитические методы

Температуру плавления определяли на приборе Optimelt MPA100 (Stanford Research Systems, Великобритания) в открытых капиллярах и не корректировали. Удельное оптическое вращение регистрировали на автоматическом поляриметре ADP 440 Polarimeter (Bellingham+Stanley Ltd., Великобритания), удельный угол оптического вращения ($[\alpha]_D$) определяли по формуле $[\alpha]_D = [\alpha]_{\text{набл}}/c$, где $[\alpha]_{\text{набл}}$ — наблюдаемое значение угла оптического вращения, c — концентрация в % (m/V). Строение и диастереомерную чистоту целевых пептидов и промежуточных соединений устанавливали методами одномерной ^1H -, ^{13}C — и двумерной (COSY — гомоядерная корреляция, HSQC — гетероядерная одноквантовая корреляция, HMBC — гетероядерная многосвязная корреляция) ЯМР-спектроскопии. Спектры ^1H — и ^{13}C —ЯМР регистрировали в шкале δ , м. д. на спектрометре Bruker FOURIER 300 HD (Bruker Corporation, Leipzig, Germany, 300 и 75 МГц для ядер ^1H — и ^{13}C , соответственно) в растворах $\text{DMSO}-d_6$ и CDCl_3 , внутренний стандарт тетраметилсилан (0 м.д.). Константа спин-спинового взаимодействия J приведена в Гц. Для обозначения резонансных сигналов использовали следующие сокращения: с — синглет, д — дублет, т — триплет, м — мультиплет.

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) выполняли на стеклянных силикагелевых пластинах DC Kieselgel 60 G/F₂₅₄ (Merck, Германия) в системах растворителей: этилацетат (А); гексан—этилацетат, 1:3 (Б); гексан—этилацетат, 1:5 (В); хлороформ—метанол, 6:1 (Г); хлороформ—метанол, 1:1 (Д); бензол—метанол, 1:4 (Е); *n*-бутанол—уксусная кислота—вода, 3:1:1 (Ж); хлороформ—метанол—вода—уксусная кислота, 15:10:2:3 (З); хлороформ—метанол—вода—уксусная кислота, 8:10:2:3 (И); хлороформ—метанол—уксусная кислота, 80:10:1 (К); метанол—вода, 1:1 (Л); метанол—вода, 2:1 (М). Аминосодержащие соединения обнаруживали нингидрином, соединения с амидными группами — с помощью хлор-толидиновой пробы, соединения с открытой карбоксильной группой — бромкрезоловым зелёным.

Синтез ГСБ-106DD

N-оксисукцинимидный эфир *N*^α-бензилоксикарбонил-*N*^ε-трет-бутилоксикарбонил-*D*-лизина, Z-D-Lys(Boc)-OSu (I). К суспензии 5,02 г (9,26 ммоль) Z-D-Lys(Boc)-OH • DCHA в 43 мл этилацетата (ЭА) приливали 18 мл 5,96 % H_2SO_4 и перемешивали в течение 30 мин до полного растворения осадка при комнатной температуре. Через 30 мин органический слой отделяли, а воднокислый экстрагировали ЭА (2 × 20 мл). Органические растворы объединяли, промывали дистиллированной водой (2 × 25 мл) и насыщенным раствором NaCl (40 мл). Этилацетатный раствор высушивали над безводным

Na_2SO_4 в течение 1 ч, осушитель отфильтровывали, промывали на фильтре 50 мл ЭА. Фильтрат упаривали на ротационном испарителе при температуре 50 °С до прекращения погона. Получали 3,52 г (9,26 ммоль) Z-D-Lys(Boc)OH в виде светло-жёлтого масла. R_f 0,16 (А), R_f 0,24 (Г), R_f 0,50 (В). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$), δ , м.д.: 1,38 (уш.с, 13H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ $\text{C}^\delta\text{H}_2$ Lys, -OC(CH₃)₃ Boc), 1,62 (м, 2H, C^βH_2 Lys), 2,89 (м, 2H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Lys), 3,92 (м, 1H, C^αH Lys), 5,03 (с, 2H, -OCH₂- Z), 6,77 (уш. т, 1H, $\text{N}^\epsilon\text{H}$ Lys), 7,35 (м, 5H, -C₆H₅ Z), 7,54 (д, 1H, 3J 7,4 Гц, NH Lys).

К полученному Z-D-Lys(Boc)-OH приливали 50 мл ЭА и при перемешивании добавляли 1,25 г (10,8 ммоль) *N*-гидроксисукцинимид и 20 мл ЭА. Реакционную смесь охлаждали до +8 — +10 °С, прибавляли раствор 2,30 г (11,0 ммоль) дициклогексилкарбодиимида (ДЦГК) в 25 мл ЭА и перемешивали при охлаждении в течение 2 ч, затем ещё 20 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок дициклогексилмочевины (ДЦГМ) отфильтровывали, промывали на фильтре 60 мл охлаждённого (+10 °С) ЭА. Фильтрат упаривали в вакууме при температуре 50 °С, полученное масло затирали под сухим диэтиловым эфиром (60 мл), выдерживали ночь в холодильнике, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре сухим диэтиловым эфиром (60 мл), высушивали в эксикаторе над CaCl_2 , получали 3,80 г (90 %) **Z-D-Lys(Boc)-OSu** в виде кристаллического вещества белого цвета. R_f 0,83(А), R_f 0,73(Г); т.пл. 91–97 °С (из диэтилового эфира); $[\alpha]_D^{27} + 16,2^\circ$ ($c = 2$; диоксан), $[\alpha]_D^{25} + 21,2^\circ$ ($c = 1$; этанол). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$), δ , м. д.: 1,37 (уш.с, 13H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ $\text{C}^\delta\text{H}_2$ Lys, -OC(CH₃)₃ Boc), 1,78 (м, 2H, C^βH_2 Lys), 2,81 (с, 4H, -CH₂CH₂- OSu), 2,88 (м, 2H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Lys), 4,40 (м, 1H, C^αH Lys), 5,07 (с, 2H, -OCH₂- Z), 6,79 (уш. т, 1H, $\text{N}^\epsilon\text{H}$ Lys), 7,37 (м, 5H, -C₆H₅ Z), 8,04 (д, 1H, 3J 7,8 Гц, NH Lys).

Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3), δ , м.д.: 1,43 (с, 9H, -OC(CH₃)₃ Boc), 1,52 (м, 4H, $\text{C}^\delta\text{H}_2$ $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Lys), 1,91–1,99 (м, 2H, C^βH_2 Lys), 2,84 (с, 4H, -CH₂CH₂- OSu), 2,88 (м, 2H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Lys), 3,12 (м, 2H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Lys), 4,72 (м, 2H, C^αH и $\text{N}^\epsilon\text{H}$ Lys), 5,13 (с, 2H, -OCH₂- Z), 5,59 (уш. с, 1H, NH Lys), 7,37 (м, 5H, -C₆H₅ Z).

Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl_3), δ , м.д.: 168,70 (с, 2C, 2 CO -OSu), 168,23 (с, 1C, CO Lys), 156,25 (с, 1C, -CO-OC(CH₃)₃ Boc), 155,73 (с, 1C, -CO-O-CH₂- Z), 136,02 (с, 1C, -O-CH₂-C- Ar), 128,55 и 128,28 (два с, 5C, -C₆H₅- Z), 79,23 (с, 1C, -OC(CH₃)₃ Boc), 67,34 (с, 1 C, -OCH₂- Z), 52,23 (с, 1C, C^α), 39,72 (с, 1C, C^ϵ), 31,88 (с, 1C, C^β), 29,41 (с, 1C, C^δ), 28,42 (с, 3C, -OC(CH₃)₃ Boc), 25,59 (с, 2C, -CH₂CH₂- OSu), 21,84 (с, 1C, C^γ). $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_8$.

Лит. [16]: т.пл. 97–99 °С (i-PrOH); $[\alpha]_D^{22} + 16,0^\circ$ ($c = 2$; диоксан). Лит. [17]: т.пл. 96–100 °С.

N-Бензилоксикарбонил-*D*-серина, Z-D-Ser-OH (II) получали аналогично Z-L-Ser-OH по методике [18] из 50 г (0,475 моль) H-D-Ser-OH с выходом

50 % в виде белого кристаллического вещества. R_f 0,10 (А), R_f 0,42 (Д), R_f 0,77 (Ж); т.пл. 110–116 °С (ЭА); $[\alpha]_D^{25} - 4,6^\circ$ (с = 7; АсОН), $[\alpha]_D^{25} - 20,5^\circ$ (с = 1; ЭА), $[\alpha]_D^{25} - 10,5^\circ$ (с = 1; ацетон). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$), δ , м.д.: 3,66 (с, 2H, C^βH_2 , Ser), 4,05 (м, 1H, C^αH , Ser), 5,04 (с, 2H, $-\text{OCH}_2-$, Z), 7,36 (м, 6H, $-\text{C}_6\text{H}_5$, Z и N^αH , Ser), 12,61 (ш.с, ^1H , COOH). Спектр ^1H -ЯМР (CD_3COCD_3), δ , м.д.: 3,45–4,45 (ш.с. $-\text{COOH}$ и $-\text{OH}$, Ser), 3,89 и 3,97 (два м, 2H, C^βH_2 , Ser), 4,34 (м, 1H, C^αH , Ser), 5,11 (с, 2H, $-\text{OCH}_2-$, Z), 6,41 (д, 1H, N^αH , Ser), 7,34–7,39 (м, 5H, $-\text{C}_6\text{H}_5$, Z).

Лит. [19]: т.пл. 119 °С; $[\alpha]_D^{25} - 5,6^\circ$ (с = 7; АсОН). Лит. [20]: т.пл. 114–115 °С.

Пентафторфениловый эфир *N*-бензилокси-карбонил-*D*-серина, Z-D-Ser-OPfp (III) получали аналогично Z-L-Ser-OPfp по методике [18] из 47 г (0,197 моль) Z-D-Ser-OH с выходом 81 % в виде белого кристаллического вещества. R_f 0,77 (Г), R_f 0,81 (Б), R_f 0,76 (В); т.пл. 132–136 °С (петролейный эфир); $[\alpha]_D^{23} + 17,35^\circ$ (с = 1; ЭА). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$), δ , м.д.: 3,85 (м, 2H, C^βH_2 Ser), 4,58 (м, 1H, C^αH Ser), 5,09 (с, 2H, $-\text{OCH}_2-$ Z), 5,22 (т, 1H, J 5,8 Гц, $-\text{OH}$ Ser), 7,31–7,38 (м, 5H, $-\text{C}_6\text{H}_5$ Z), 7,95 (д, 1H, J 7,6 Гц, NH Ser). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3), δ , м.д.: 4,27 (два д, 2H, ^2J 10,99 Гц, C^βH_2 Ser), 4,86 (м, 1H, C^αH Ser), 5,18 (с, 2H, $-\text{OCH}_2-$ Z), 5,80 (д, 1H, J 7,6 Гц, NH Ser), 7,37–7,40 (м, 5H, $-\text{C}_6\text{H}_5$ Z).

Гексаметилендиамид бис-(*N*-бензилоксикарбонил-*N*^ε-трет-бутилоксикарбонил-*D*-лизина) (Z-D-Lys(Boc)-NH-)₂(CH₂)₆ (IV). К раствору 3,80 г (7,96 ммоль) Z-D-Lys(Boc)-OSu в 25 мл диметилформамида (ДМФА) при перемешивании приливали раствор 0,425 г (3,617 ммоль) гексаметилендиамина в 12 мл ДМФА, при этом выпадало небольшое количество серого осадка, который в течение 2 ч полностью растворялся. Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре, далее оставляли на ночь без перемешивания. Затем к реакционной смеси при перемешивании медленно приливали 150 мл дистиллированной воды, предварительно нагретой до 43–45 °С, при этом выпадал белый творожистый осадок. Перемешивание вели до достижения температуры 20–22 °С самоохлаждением, после чего оставляли на 12 ч при температуре 12–17 °С. Хорошо сформированный осадок отфильтровывали, промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции, хорошо отжимали на фильтре, досушивали на воздухе. Получали 2,70 г (89 %) (Z-D-Lys(Boc)-NH-)₂(CH₂)₆ в виде белого кристаллического вещества. R_f 0,55 (А), R_f 0,24 (Б), R_f 0,84 (Г); т.пл. 154–157 °С; $[\alpha]_D^{25} + 7,6^\circ$ (с = 1; метанол), $[\alpha]_D^{25} + 9,2^\circ$ (с = 0,3; этанол), $[\alpha]_D^{24} + 7,39^\circ$ (с = 1; этанол). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$), δ , м.д.: 1,23 (м, 4H $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}-$), 1,36 (уш.с, 30H, 2 $\text{C}^\delta\text{H}_2$, 2 $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Lys, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, 2 $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ Boc), 1,50 (м, 4H, C^βH_2 Lys), 2,86 (м, 4H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Lys), 3,02 (м, 4H, $-\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NH}-$), 3,88

(м, 2H, C^αH Lys), 5,0 (с, 4H, $-\text{OCH}_2-$ Z), 6,76 (уш. т, 2H, $\text{N}^\epsilon\text{H}$ Lys), 7,37 (м, 12H, 2 $-\text{C}_6\text{H}_5$ Z, 2 NH Lys), 7,83 (уш.т, 2H, $-\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NH}-$).

Лит. [16]: т.пл. 151–154 °С; $[\alpha]_D^{25} + 9,0^\circ$ (с = 0,3; этанол).

Гексаметилендиамид бис-(*N*^ε-трет-бутилоксикарбонил-*D*-лизина), (H-D-Lys(Boc)-NH-)₂(CH₂)₆ (V). Раствор 2,6 г (3,1 ммоль) IV в 85 мл метанола подвергали гидрогенолизу в присутствии 0,38 г 10 % Pd/C 50 % влажности при комнатной температуре. По исчезновении исходного вещества (ТСХ контроль) катализатор отфильтровывали, промывали 40 мл метанола. Метанольный раствор упаривали в вакууме при температуре 50 °С до прекращения погона, полученное бесцветное масло выдерживали при температуре 4 °С в смеси диэтилового и петролейного эфиров в соотношении 3:1 в течение 12 ч. Образовавшийся твёрдый остаток после декантации растворителей высушивали в вакууме водоструйного насоса (насадка для фильтрования гигроскопичных веществ). Получали 1,75 г (95 %) V в виде белого кристаллического вещества, который высушивали в вакууме водоструйного насоса (насадка для фильтрования гигроскопичных веществ), получали 1,75 г (95 %) V в виде белого кристаллического вещества. R_f 0,10 (Г), R_f 0,44 (Е), R_f 0,80 (З); т.пл. 81–85 °С (диэтиловый эфир-петролейный эфир); $[\alpha]_D^{25} - 12,64^\circ$ (с = 1; метанол). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$), δ , м.д.: 1,24 (м, 4H, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}-$), 1,28 (м, 4H, 2 C^γH Lys), 1,37 (уш.с, 26H, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, 2 $\text{C}^\delta\text{H}_2$ Lys, 2 $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ Boc), 1,48 (м, 4H, 2 C^βH_2 Lys), 2,87 (м, 4H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Lys), 3,00–3,07 (м, 6H, 2 C^αH Lys, $-\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NH}-$), 6,75 (т, 2H, J 5,4 Гц, 2 $\text{N}^\epsilon\text{H}$ Lys), 7,78 (т, 2H, J 5,6 Гц, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}-$).

Гексаметилендиамид бис-(*N*-бензилоксикарбонил-*D*-серил-*N*^ε-трет-бутилокси-карбонил-*D*-лизина), (Z-D-Ser-D-Lys(Boc)-NH-)₂(CH₂)₆ (VI). К раствору 1,84 г (3,21 ммоль) V в 20 мл ДМФА одномоментно присыпали 3,1 г (7,65 ммоль, 38 %-ный изб.) Z-D-Ser-OPfp III и приливали 10 мл ДМФА. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при комнатной температуре, далее приливали 0,154 мл диметиламинопропиламина (ДМАПА) и выдерживали 50 мин при перемешивании. Реакционную массу выливали в дистиллированную воду (300 мл) и оставляли на 12 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали 150 мл воды, 50 мл гексана и 50 мл диэтилового эфира. Осадок высушивали в вакууме (15 мм.рт.ст.) над CaCl_2 . Получали 2,80 г (86 %) продукта в виде белого кристаллического вещества. R_f 0,56 (К), R_f 0,71 (Г); т.пл. 169,5–173 °С; $[\alpha]_D^{23} + 13,6^\circ$ (с = 1; метанол). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$), δ , м.д.: 1,24–1,37 (м, 16H, 2 $\text{C}^\gamma\text{H}_2\text{C}^\delta\text{H}_2$ Lys, $-\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NH}-$), 1,37 (с, 18H, 2 $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ Boc), 1,48 и 1,64 (два м, 4H, 2 C^βH_2 Lys), 2,86 (м, 4H, 2 $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Lys), 3,01 (м, 4H,

-NHCH₂(CH₂)₄CH₂NH-), 3,57 (м, 4H, 2 C^βH₂ Ser), 4,13 (м, 4H, 2 C^αH Ser, 2 C^αH Lys), 5,04 (уш.с, 6H, 2-ОСН₂- Z, 2 -ОН Ser), 6,72 (уш.т, 2H, 2 N^εH Lys), 7,28-7,36 (м, 12H, -C₆H₅ Z, 2 NH Ser), 7,80 (уш.т, 2H, -NH(CH₂)₆NH-), 7,95 (д, 2H, J 6,71 Гц, 2 NH Lys).

Гексаметилендиамид бис-(D-серил-N^ε-трет-бутилоксикарбонил-D-лизина), (H-D-Ser-D-Lys-(Boc)-NH-)₂(CH₂)₆ (VII). Раствор 2,70 г (2,66 ммоль) VI в 100 мл MeOH подвергали гидрогенолизу в присутствии 0,40 г 10 % Pd/C 50 % влажности при перемешивании в атмосфере водорода и при комнатной температуре. По окончании гидрирования (ТСХ-контроль), катализатор отфильтровывали, промывали 50 мл метанола, фильтрат упаривали, далее переупаривали с 20 мл бензола, к пенообразному остатку приливали 100 мл смеси петролейного и диэтилового эфиров в соотношении 3:1 и оставляли на ночь в холодильнике, растворители декантировали, а твёрдый остаток высушивали в вакууме (15 мм рт.ст.) над CaCl₂, получали 1,85 г (96 %) VI в виде белого аморфного порошка. R_f 0,53 (E), R_f 0,93 (Г), R_f 0,47 (Ж); т.пл. 100–112 °С с разложением; [α]_D²⁴ + 10,53° (с = 1; метанол). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-d₆), δ, м.д.: 1,20 и 1,29-1,36 (два м, 16H, 2 C^γH₂C^δH₂ Lys, -NHCH₂(CH₂)₄CH₂NH-), 1,36 (с, 18H, 2 -OC(CH₃)₃ Boc), 1,49 и 1,59 (два м, 4H, 2 C^βH₂ Lys), 2,85 (м, 4H, 2 C^εH₂ Lys), 3,02 (м, 4H, -NHCH₂(CH₂)₄CH₂NH-), 3,32 (м, 2H, 2 C^αH Ser), 3,47 (м, 4H, 2 C^βH₂ Ser), 4,20 (м, 2H, 2 C^αH Lys), 4,87 (уш.с, 2H, 2 -ОН Ser), 6,74 (уш.т, 2H, 2 N^εH Lys), 7,93 (уш.т, 2H, -NH(CH₂)₆NH-), 8,03 (уш.с, 2H, 2 NH Lys).

Гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-D-серил-N^ε-трет-бутилокси-карбонил-D-лизина), (HOOC(CH₂)₂CO-D-Ser-D-Lys(Boc)-NH-)₂(CH₂)₆ (VIII). К раствору 1,781 г (2,38 ммоль) VII в 25 мл ДМФА при +5 °С и перемешивании одномоментно прибавляли раствор 0,566 г (5,658 ммоль, 40 % изб.) янтарного ангидрида в 5 мл ДМФА. Остатки ангидрида смывали 10 мл охлажденного (+10 °С) ДМФА. Реакционную смесь перемешивали при охлаждении 1,5 ч и 12 ч при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ контроль) ДМФА упаривали и переупаривали с дистиллированной водой (3 × 20 мл), остатки воды удаляли переупариванием с ацетонитрилом (25 мл), маслообразный остаток затирали под сухим диэтиловым эфиром (2 × 25 мл) с декантацией, далее оставляли на ночь в холодильнике под свежей порцией сухого диэтилового эфира (50 мл). 2/3 объёма эфира декантировали, а осадок отфильтровывали в вакууме на насадке для гигроскопичных веществ, полученный кристаллический продукт высушивали в вакууме над CaCl₂, получали 2,05 г (91 %) VIII хроматографически гомогенного продукта в виде белого кристаллического вещества R_f 0,74 (E), R_f 0,80 (Ж); т.пл. 145–164 °С с разлож.; [α]_D²² + 22,5° (с = 1; метанол). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-d₆), δ, м.д.:

1,21 (м, 8H, 2 C^γH₂ Lys, -NH(CH₂)₂(CH₂)₂(CH₂)₂NH-), 1,36 (уш.с, 26H, 2 C^δH₂ Lys, 2 -OC(CH₃)₃ Boc, -NHCH₂CH₂(CH₂)₂CH₂CH₂NH-), 1,49 и 1,68 (два м, 4H, 2 C^βH₂ Lys), 2,41 (м, 8H, 2 -CH₂CH₂- Suc), 2,86 (м, 4H, 2 C^εH₂ Lys), 3,00 (м, 4H, -NHCH₂(CH₂)₄CH₂NH-), 3,51 и 3,59 (два м, 4H, 2 C^βH₂ Ser), 4,10 (м, 2H, 2 C^αH Lys), 4,27 (м, 2H, 2 C^αH Ser), 5,11 (уш.с, 2H, 2 -ОН Ser), 6,75 (уш.т, 2H, 2 N^εH Lys), 7,66 (уш.т, 2H, -NH(CH₂)₆NH-), 7,88 (уш.д, 2H, 2 NH Lys), 8,08 (уш.д, 2H, 2 NH Ser).

Дитрифторацетат гексаметилендиамида бис-(N-моносукцинил-D-серил-D-лизина), 2 CF₃COOH·(HOOC-(CH₂)₂CO-D-Ser-D-Lys-NH-)₂(CH₂)₆ (IX). К суспензии 0,50 г (0,53 ммоль) VIII в 15 мл CH₂Cl₂ приливали 5 мл ТФУ и перемешивали при комнатной температуре, по исчезновению исходного вещества (ТСХ-контроль, 2,5 ч) реакционную смесь упаривали на роторном испарителе, переупаривали с CH₂Cl₂ (2 × 15 мл), ещё подвижный остаток затирали под сухим диэтиловым эфиром с декантацией (3 × 20 мл). Далее оставляли под свежей порцией (20 мл) сухого диэтилового эфира на 2 ч, осадок отфильтровывали (насадка для фильтрования гигроскопичных веществ), досушивали в вакууме диафрагменного насоса при 9 мм рт.ст. Соединение IX подвергали 2-кратной лиофилизации для удаления избытка ТФУ. Для этого весь продукт растворяли в деионизованной воде (25 мл), раствор пропускали через фильтр с полиэфирсульфоновой мембраной с диаметром пор 0,45 мкм (производство Швейцария, компании Techno Plastic Product) и лиофилизировали. Получали 0,34 г дитрифторацетата ГСБ-106DD в виде аморфного белого вещества. R_f 0,11 (Ж), R_f 0,55 (И), R_f 0,42 (М); [α]_D²⁴ + 27,88° (с = 1; метанол). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-d₆), δ, м.д.: 1,20 (м, 4H, -NH(CH₂)₂(CH₂)₂(CH₂)₂NH-), 1,33 (м, 8H, 2 C^γH₂ Lys, -NHCH₂CH₂(CH₂)₂CH₂CH₂NH-), 1,50 (м, 4H, 2 C^δH₂ Lys), 1,50 и 1,72 (два м, 4H, 2 C^βH₂ Lys), 2,41 (м, 8H, 2 -CH₂CH₂- Suc), 2,75 (м, 4H, 2 C^εH₂ Lys), 3,00 (м, 4H, -NHCH₂(CH₂)₄CH₂NH-), 3,52 и 3,60 (два м, 4H, 2 C^βH₂ Ser), 4,12 (м, 2H, 2 C^αH Lys), 4,25 (м, 2H, 2 C^αH Ser), 5,23 (с, 2H, 2 -ОН, Ser), 7,71 (уш.с, 6H, 2 N⁺H₃ Lys), 7,96 (д, 2H, J 8,0 Гц, 2 NH Lys), 8,10 (д, 2H, J 6,6 Гц, 2 NH Ser), 12,14 (с, 2H, 2 COOH Suc).

Спектр ¹³C-ЯМР (DMCO-d₆), δ, м.д.: 174,46 (с, 2 C, 2 COOH Suc); 172,14; 171,53; 170,81 (три с, 6 C, 2 CO-NH-Suc, 2 CO Lys, 2 CO Ser); 62,17 (с, 2 C, 2 C^β Ser); 55,72 (с, 2 C, 2 C^α Ser); 53,04 (с, 2 C, 2 C^α Lys); 39,18 (с, 2 C, 2 C^ε Lys); 39,05 (с, 2 C, -NHCH₂(CH₂)₄CH₂NH-); 31,27 (с, 2 C, 2 C^β Lys); 30,31 (с, 2 C, 2 -CH₂COOH, Suc); 29,57 (с, 2 C, 2 -COCH₂CH₂- Suc); 29,31 (с, 2 C, -NHCH₂CH₂(CH₂)₂CH₂CH₂NH-); 27,04 (с, 2 C, 2 C^δ Lys); 26,44 (с, 2 C, -NH(CH₂)₂(CH₂)₂(CH₂)₂NH-); 22,90 (с, 2 C, 2 C^γ Lys); 117,5 (кв, 2C, ¹J_{C-F} 300,25 Гц, CF₃COOH), 158,6 (кв, 2C, ²J_{C-F} 31,29 Гц, CF₃COOH).

Гексаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-*D*-серил-*D*-лизина), (HOOC-(CH₂)₂CO-*D*-Ser-*D*-Lys-NH)₂(CH₂)₆. (ГСБ-106DD). К раствору 0,34 г (0,349 ммоль) IX в 15 мл абс. этанола добавляли ДИПЭА до pH 6–6,5 и смесь оставляли в холодильнике на ночь, выпавший осадок отфильтровывали с использованием насадки для гигроскопичных веществ, промывали этанолом (3 × 10 мл). Осадок растворяли в 15 мл дистиллированной воды, раствор пропускали через фильтр (диаметр пор 0,45 мкм), затем лиофилизовывали. Получали 0,247 г (0,285 ммоль) (~82 %) ГСБ-106DD в виде белого аморфного вещества. R_f 0,19 (3), R_f 0,53 (И), R_f 0,42 (М); $[\alpha]_D^{25} + 42,4^\circ$ (с = 1; вода). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-d₆), δ, м.д.: 1,21 (м, 4H, -NH(CH₂)₂(CH₂)₂(CH₂)₂NH-), 1,36 (м, 8H, 2 C^γH₂ Lys, -NHCH₂CH₂(CH₂)₂CH₂CH₂NH-), 1,53 (м, 4H, 2 C^δH₂ Lys), 1,64 (м, 4H, 2 C^βH₂ Lys), 2,23–2,44 (м, 8H, 2 -CH₂CH₂- Suc), 2,77 (м, 4H, 2 C^εH₂ Lys), 3,01 (м, 4H, -NHCH₂(CH₂)₄CH₂NH-), 3,59 и 3,66 (два м, 4H, 2 C^βH₂ Ser), 4,05 (м, 4H, 2 C^αH Lys), 4,11 (м, 2H, 2 C^αH Ser), 7,57 (уш. т, 2H, -NH(CH₂)₆NH-), 8,17 (уш. д, 2H, 2 NH Lys), 8,23 (уш. д, 2H, 2 NH Ser).

Спектр ¹³C-ЯМР (DMCO-d₆), δ, м.д.: 176,07; 172,61; 171,82; 170,90 (четыре с, 8 C, 2 COOH Suc, 2 CO Suc, 2 CO Lys, 2 CO Ser); 61,66 (с, 2C, 2 C^β Ser); 56,72 (с, 2C, 2 C^α Ser); 53,76 (с, 2C, 2 C^α Lys); 39,06 (с, 2C, -NHCH₂(CH₂)₄CH₂NH-); 38,38 (с, 2C, 2 C^ε Lys); 31,55 и 31,46 (2с, 4C, 2 -CH₂CH₂- Suc); 30,49 (с, 2C, 2 C^β Lys); 29,17 (с, 2C, -NHCH₂CH₂(CH₂)₂CH₂CH₂NH-); 26,78 (с, 2C, 2 C^δ Lys); 26,47 (с, 2C, -NH(CH₂)₂(CH₂)₂(CH₂)₂NH-); 22,56 (с, 2C, 2 C^γ Lys).

Изучение биологической активности *in vivo* / Study of biological activity *in vivo*

Животные. Исследование проведено на 42 мышах-самцах линии BALB/с массой 19–22 г, полученных в Филиале «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Эта линия мышей часто применяется в тесте вынужденного плавания, так как из-за высокого уровня тревожности склонна к депрессивно-подобному поведению, вызванному стрессом [21]. Установлено, что мыши Balb/с отвечают на действие широкого спектра антидепрессантов [22]. 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 одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» (протокол № 2 от 30 января 2023 г.).

Тест вынужденного плавания / Forced swimming test

Данный тест [23] является наиболее распространенным для выявления соединений с антидепрессантной активностью, поскольку чувствителен к действию антидепрессантов с разным механизмом действия и обладает высокой прогностической валидностью [24]. В основе метода лежит наблюдение, что мышь, помещённая в ситуацию неизбежного плавания, в конце концов перестаёт совершать попытки выбраться и принимает характерную позу имобильности (отказ от активно-оборонительного и исследовательского поведения), что интерпретируют как отчаяние [25]. Поза имобильности у мышей показана на рис. 1.



Рис. 1. Характерная поза имобильности у мышей в тесте вынужденного плавания

Fig. 1. Typical immobility posture in mice in the forced swim test

Тест на мышах проводили по модифицированной методике с двумя сессиями плавания. Установка для проведения теста (ООО «НПК Открытая наука», Москва, Россия) представляла собой 5 цилиндров из прозрачного пластика диаметром 10 см и высотой 30 см. Цилиндры заполняли водой температурой 22–23 °С 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. Поведение животных 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 антидепрессантоподобной активности.

Дизайн эксперимента

Мышей случайным образом разделили на 4 группы по 10–11 животных:

1. Контроль ($n = 10$);
2. ГСБ-106 (DD) ($n = 10$), 0,1 мг/кг;
3. ГСБ-106 (DD) ($n = 11$), 1 мг/кг;
4. Амитриптилин ($n = 11$), 10 мг/кг.

Исследуемое соединение разводили в дистиллированной воде и вводили внутривенно (в/б)

через 1 ч после первой сессии плавания. Дозы исследуемого соединения выбраны на основе активных доз его LL-стереоизомера [26]. В качестве препарата сравнения использовали классический антидепрессант Амитриптилин в виде раствора для инъекций (ФГУП «Московский эндокринный завод», Москва Россия, который вводили в том же режиме в дозе 10 мг/кг, в/б. Доза амитриптилина выбрана на основании данных литературы [27].

Контрольные животные получали в/б дистиллированную воду. Объем введения составлял 10 мл на 1 кг массы мышей. Дизайн эксперимента представлен на рис. 2.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку полученных в ходе экспериментов данных проводили с помощью компьютерной программы GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. В связи с нормальностью распределения выборок статистическую значимость межгрупповых различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с последующими попарными межгрупповыми сравнениями с помощью теста Даннета. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные на рисунках представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.

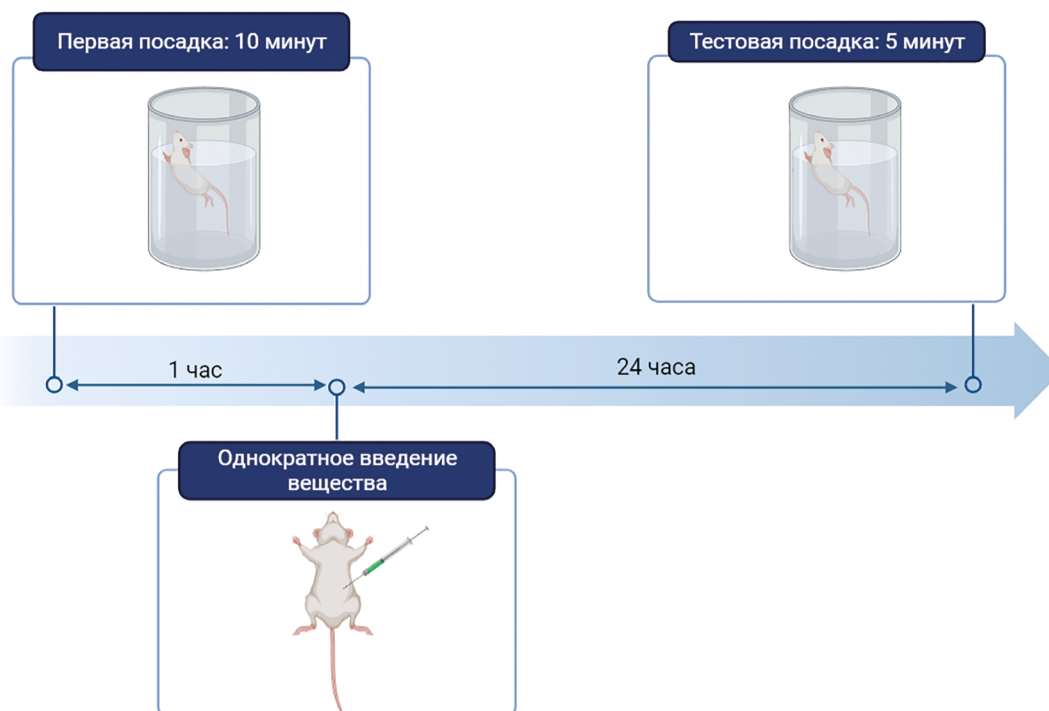


Рис. 2. Дизайн эксперимента
Fig. 2. Design of experiment

Результаты и их обсуждение / Results and Discussion

Синтез ГСБ-106DD

Соединение ГСБ-106DD получали методами классического пептидного синтеза в растворе наращиванием пептидной цепи с С-конца с использованием Z/Вос-стратегии защитных групп и метода активированных N-гидроксисукцинимидных и пентафторфениловых эфиров по общей схеме, представленной на рис. 3.

ГСБ-106DD синтезировали, исходя из коммерчески доступных энантиомерно чистых H-D-Ser-OH и Z-D-Lys(Boc)-OH. На первой стадии получали активированные эфиры защищённых аминокислот. Активированный N-оксисукцинимидный эфир Z/Вос-защищённого лизина (I) получали с выходом 90 %, используя дициклогексилкарбодиимид (ДЦГК) и N-гидроксисукцинимид, синтез вели в этилацетате при +8–+10 °С. Карбобензоксизащищённый серин (II) получали взаимодействием N-бензилоксикарбонилсукцинимида (ZOSu)

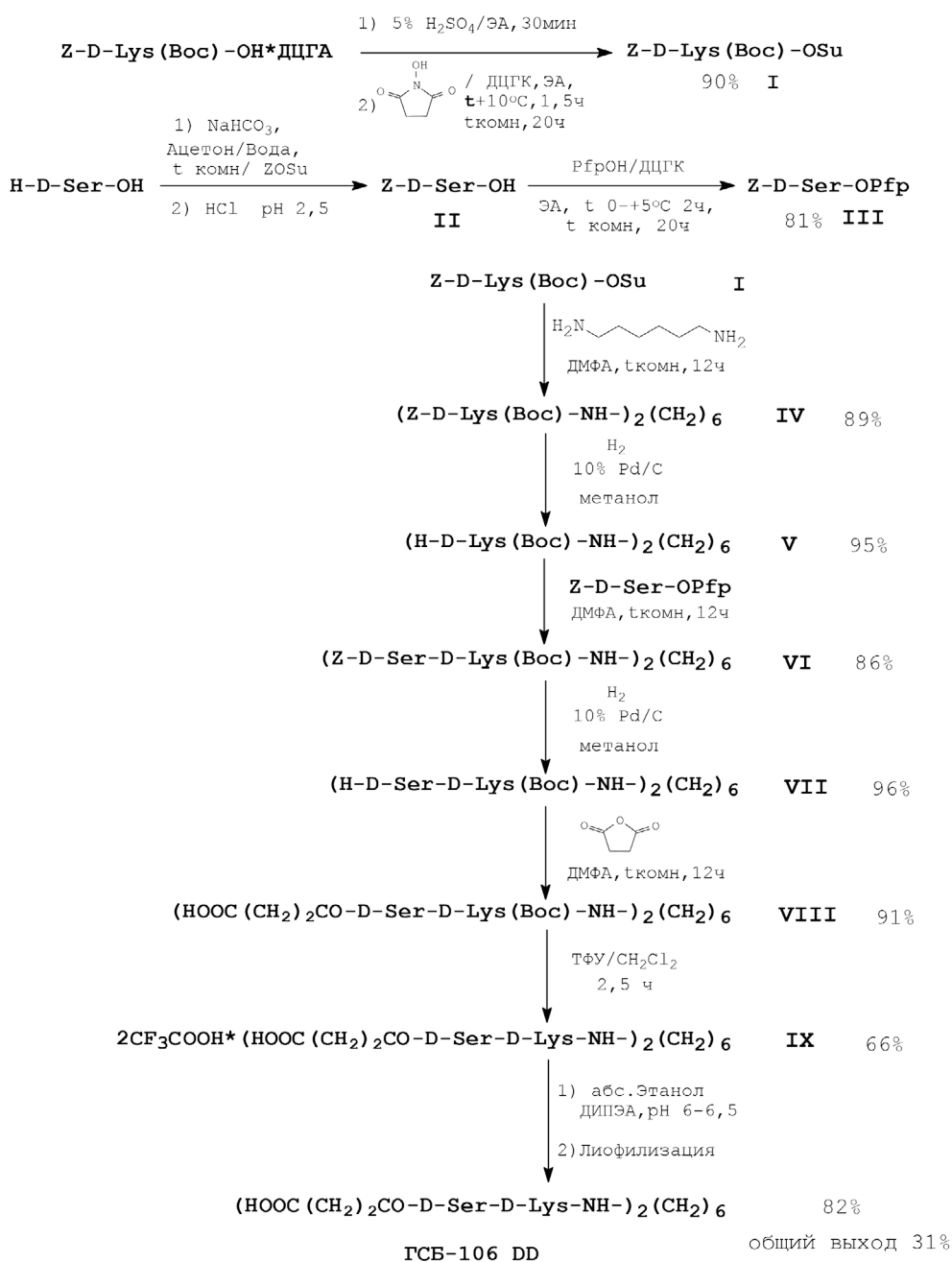


Рис. 3. Схема синтеза ГСБ-106DD
Fig. 3. Synthesis scheme for GSB-106DD

с *D*-серином в смеси ацетон–вода в соотношении 1:1 в присутствии бикарбоната натрия при температуре 20–22 °С [16]. Активированный пентафторфениловый эфир *Z-D-Ser-OPfp* (III) получали с выходом 81 %, используя ДЦГК и пентафторфенол, проводя синтез в этилацетате при 0–+5 °С (28). Конденсация *Z-D-Lys(Boc)-OSu* (I) с гексаметилендиамином в ДМФА при комнатной температуре приводила к бис-продукту (IV) с выходом 89 %, который затем *Z*-деблокировали в условиях каталитического гидрогенолиза (10 % Pd/C), получая гексаметилендиамид бис-(*N*^ε-трет-бутилоксикарбонил-*D*-лизина) (V) с 95 % выходом. Взаимодействием пентафторфенилового эфира (III) и бис-лизина (V) в ДМФА получали продукт (*Z-D-Ser-D-Lys(Boc)-NH*)₂(CH₂)₆ (VI) с выходом 86 %. Бис-дипептид (VI) подвергали каталитическому гидрогенолизу (10 % Pd/C), получая гексаметилен-

диамид бис-(*D*-серил-*N*^ε-трет-бутилоксикарбонил-*D*-лизина) (VII) с выходом 96 %. *Z*-деблокированный бис-дипептид (VII) ацилировали янтарным ангидридом в ДМФА, получая *N*-моносукцинильное производное бис-дипептида (VIII) с выходом 91 %. Кислотный ацидолиз (трифторуксусная кислота) соединения (VIII) приводил к дитрифторацетату (IX). Чистота дитрифторацетата (IX) составляла 98 %, по данным ОФ ВЭЖХ (τ = 12,00 мин). Дитрифторацетат (IX) обрабатывали ДИПЭА в абсолютном этаноле, осадок отфильтровывали, промывали абсолютным этанолом, растворяли в воде и лиофилизировывали. Общий выход ГСБ-106DD составлял 31 % в расчёте на исходный защищённый лизин. Структура и диастереомерная чистота ГСБ-106DD (X) были подтверждены методами одномерной и двумерной ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР-спектроскопии (табл. 1).

Таблица 1

Физико-химические свойства и данные ЯМР для ГСБ-106DD и ГСБ-106

Table 1

Physico-chemical properties and NMR data for GSB-106DD and GSB-106

Физико-химические характеристики	ГСБ-106LL	ГСБ-106DD
Удельный угол оптического вращения, [α] _D	[α] _D ²³ – 44,4° (с, 1; вода)	[α] _D ²⁵ + 42,4° (с, 1; вода)
Подтверждение структуры – ¹ H-ЯМР (DMSO-d ₆), δ, м.д.	ГСБ-106LL	ГСБ-106DD
м, 4H, -NH(CH ₂) ₂ (CH ₂) ₂ (CH ₂) ₂ NH-	1,20	1,21
м, 8H, 2 C ^α H ₂ Lys, -NHCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂ CH ₂ NH-	1,37	1,36
два м, 8H, 2 C ^β H ₂ Lys, 2 C ^δ H ₂ Lys	1,52-1,70	1,52-1,70
м, 8H, 2 -CH ₂ CH ₂ - Suc	2,07-2,47	2,23-2,44
м, 4H, 2 C ^α H ₂ Lys	2,75	2,77
м, 4H, -NHCH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₂ NH-	3,03	3,01
два м, 4H, 2 C ^β H ₂ Ser	3,62 и 3,69	3,59 и 3,66
м, 4H, 2 C ^α H Lys	4,03	4,05
м, 2H, 2 C ^α H Ser	4,03	4,11
уш. т, 2H, -NH(CH ₂) ₆ NH-	7,53	7,57
уш. д, 2H, 2 NH Lys	8,32	8,17
уш. д, 2H, 2 NH Ser	8,36	8,23
Подтверждение структуры – ¹³ C-ЯМР (DMSO-d ₆), δ, м.д.		
четыре с, 8C, 2 COOH Suc, 2 CO Suc, 2 CO Lys, 2 CO Ser	177,16; 175,08; 172,02; 171,00	176,07; 172,61; 171,82; 170,90
с, 2C, 2 C ^β Ser	61,34	61,66
с, 2C, 2 C ^α Ser	57,31	56,72
с, 2C, 2 C ^α Lys	54,17	53,76
с, 2C, -NHCH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₂ NH-	39,03	39,06
с, 2C, 2 C ^ε Lys	37,89	38,38
два с, 4C, 2 -CH ₂ CH ₂ - Suc	32,36 и 33,08	31,55 и 31,46
с, 2C, 2 C ^β Lys	30,03	30,49
с, 2C, -NHCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂ CH ₂ NH-	29,14	29,17
с, 2 C, 2 C ^δ Lys	26,68	26,78
с, 2 C, -NH(CH ₂) ₂ (CH ₂) ₂ (CH ₂) ₂ NH-	26,45	26,47
с, 2C, 2 C ^γ Lys	22,37	22,56

В спектре ^1H -ЯМР ГСБ-106DD наблюдались сигналы альфа-протонов Lys и Ser, сигналы CH_2 -групп (C^βH_2 , $\text{C}^\delta\text{H}_2$, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ - Lys, C^βH_2 - Ser, C^1H_2 , C^2H_2 , C^3H_2 — спейсера и C^1H_2 , C^2H_2 , сукцинильного остатка), а также сигналы амидных NH-групп (NH - Lys, NH - Ser и NH — спейсера). В спектре ^{13}C -ЯМР наблюдались сигналы атомов углерода — пять сигнала карбонильных групп, два сигнала C^αH групп и 10 сигналов CH_2 групп (C^βH_2 , $\text{C}^\delta\text{H}_2$, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ - Lys, C^βH_2 - Ser, C^1H_2 , C^2H_2 , C^3H_2 — спейсера и C^1H_2 , C^2H_2 , сукцинильного остатка). В спектре ^{13}C ЯМР характерные сигналы (квартеты) CF_3 и CO групп трифторуксусной кислоты отсутствовали.

ГСБ-106DD был охарактеризован хроматографической подвижностью в тонком слое силикагеля в различных системах растворителей и удельным углом оптического вращения $[\alpha]_D$ (табл. 1).

Сравнение физико-химических свойств ГСБ-106DD и ГСБ-106 показало, что оба соединения идентичны по хроматографической подвижности, спектрам ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР и абсолютным величинам $[\alpha]_D$. Отличия, как и положено для энантиомеров, наблюдались только в знаке удельного угла оптического вращения (см. табл. 1).

Антидепрессантоподобную активность ГСБ-106DD изучали в тесте вынужденного плавания по Порсолту на мышах [23] с использованием в качестве положительного контроля антидепрессанта амитриптилина в дозе 10 мг/кг внутривнутрибрюшинно [27].

Время иммобильности в контрольной группе составляло в среднем 166,3 с. Амитриптилин статистически значимо снижал ($p < 0,0001$) его до 102,2с. Дипептид ГСБ-106DD в отличие от его активного L,L-энантиомера в обеих изученных дозах не оказывал статистически значимого влияния на этот параметр. Время иммобильности в группах мышей, получавших ГСБ-106DD в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг составляло в среднем 151,0 и 151,3 с (рис. 4).

Выводы / Conclusions

Дипептид ГСБ-106DD, в отличие от его L,L-энантиомера, не проявляет антидепрессантоподобных эффектов. Таким образом, антидепрессантоподобная активность ГСБ-106 является стереоспецифичной.

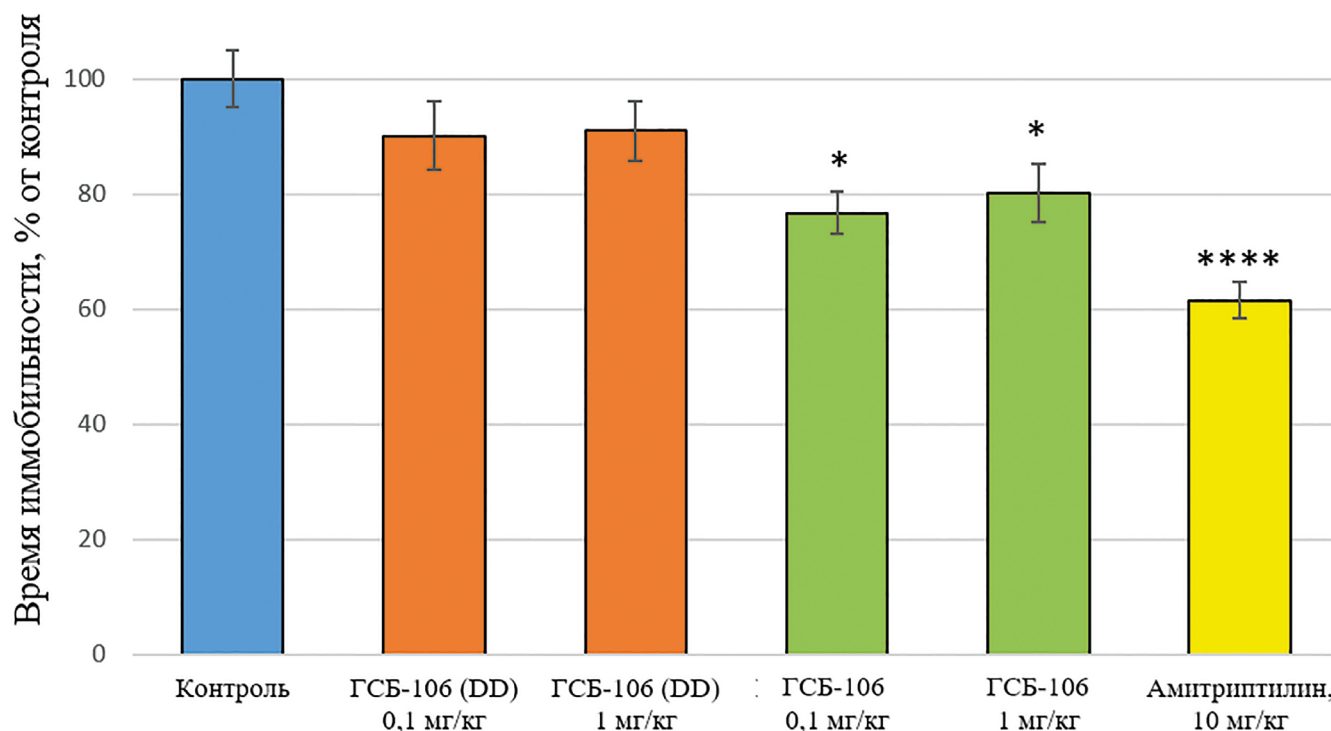


Рис. 4. Результаты исследования антидепрессантоподобной активности ГСБ-106DD в тесте вынужденного плавания в сравнении с Амитриптилином и ГСБ-106

Fig. 4. Results of a study of the antidepressant-like activity of GSB-106DD in the forced swimming test in comparison with Amitriptyline and GSB-106

Примечания: Данные по ГСБ-106 ранее опубликованы в работе [26]. Время иммобильности приведено в % от контрольной группы. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. * — $p < 0,05$, **** — $p < 0,0001$ по сравнению с контрольной группой.
Notes: Data on GSB-106 were previously published in [26]. The immobilization time is given in % of the control group. The data is presented in the form of averages and standard errors of the mean. * — $p < 0.05$, **** — $p < 0.0001$ compared to the control group.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

Authors' participation

All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication.

Funding

The work was carried out without sponsorship.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Сазонова Нелля Михайловна

к. х. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7608-7419>
РИНЦ SPIN-код: 8835-7887

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>
RSCI SPIN code: 8835-7887

Тарасюк Алексей Валерьевич

Автор, ответственный за переписку

к. х. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
e-mail: tarasyuk_av@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9750-4157>
РИНЦ SPIN-код: 9670-2415

Alexey V. Tarasyuk

Corresponding author

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
e-mail: tarasyuk_av@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9750-4157>
RSCI SPIN code: 9670-2415

Филиппова Мария Юрьевна

Инженер 1-й категории лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Maria Yu. Filippova

Engineer 1st category of laboratory of peptide bioregulators of medicinal chemistry department Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Мельникова Марина Валерьевна

м. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов
отдела химии лекарственных средств
ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация

Marina V. Melnikova

Junior Researcher of Laboratory of Peptide Bioregulators of Medicinal Chemistry Department Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Никифоров Дмитрий Михайлович

м. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов
отдела химии лекарственных средств
ФГБНУ «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

Dmitry M. Nikiforov

Junior Researcher of Laboratory of Peptide Bioregulators of Medicinal Chemistry Department Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8901-3101>
RSCI SPIN code: 7028-8335

Поварнина Полина Юрьевна

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
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>
РИНЦ SPIN-код: 5498-6724

Polina Yu. Povarnina

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
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>
РИНЦ SPIN-код: 5498-6724

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

- Castrén E, Monteggia LM. Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Depression and Antidepressant Action. *Biol Psychiatry*. 2021 Jul 15;90(2):128-136. doi: 10.1016/j.biopsych.2021.05.008.
- Патент РФ на изобретение №2410392 / 27.01.2011 Бюл. № 3. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Дипептидные миметики нейротрофинов NGF и BDNF. [Patent RUS №2410392 / 27.01.2011. Byul. №3. Seredenin SB, Gudasheva TA. Dipeptide mimetics of NGF and BDNF neurotrophins. (In Russ.)]. Доступно по: <https://clck.ru/3DDshf> Ссылка активна на 20.06.2024.
- Patent US-9683014-B2. 2017/06/20. Seredenin SB, Gudasheva TA. Dipeptide mimetics of NGF and BDNF neurotrophins. Available at: <https://clck.ru/3DDt8W> Accessed Jun 20, 2024.
- Patent CN 102365294 B, 2016/02/17. Available at: <https://clck.ru/3DDt89> Accessed Jun 20, 2024.
- Patent EP-2397488-B1. 2019/03/27. Seredenin SB, Gudasheva TA. Dipeptide mimetics of NGF and BDNF neurotrophins. Available at: <https://clck.ru/3DDtBS> Accessed Jun 20, 2024.
- Patent EP 0 296506 A2, 2018. Available at: <https://clck.ru/3DDtDn> Accessed Jun 20, 2024.
- Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Дипептидный миметик 4-й петли мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 активирует TrkB, Erk, Akt и способствует выживаемости нейронов *in vitro*. Доклады Академии наук. 2013;451(5):577-580. [Gudasheva TA, Logvinov IO, Antipova TA, Seredenin SB. Dipeptide mimetics of different NGF and BDNF loops activate PLC-γ1. *Reports of the Russian Academy of Sciences*. 2020;494(1):486-490. (In Russ.)]. doi: 10.7868/S0869565213240250.
- Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Николаев С.В. и др. Дипептидные миметики отдельных петель NGF и BDNF активируют PLC-γ1. Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2020;494(1):486-490. [Gudasheva TA, Logvinov IO, Nikolaev SV, et al. Dipeptide mimetics of different NGF and BDNF loops activate PLC-γ1. *Reports of the Russian Academy of Sciences. Life Sciences*. 2020;494(1):486-490. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S2686738920050133.
- Антипова Т.А., Логвинов И.О., Деев И.Е. и др. Фармакогенетический анализ взаимодействия низкомолекулярного миметика BDNF дипептида ГСБ-106 с Trk рецепторами. Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2023;511(1):391-394. [Antipova TA, Logvinov IO, Deyev IE, et al. Pharmacogenetic analysis of the interaction of the low-molecular weight BDNF mimetic dipeptide GSB-106 with Trk receptors. *Reports of the Russian Academy of Sciences. Life Sciences*. 2023;511(1):391-394. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S2686738923600218. EDN: JFIMHI
- Середенин С.Б., Воронина Т.А., Гудашева Т.А. и др. Антидепрессивный эффект оригинального низкомолекулярного миметика BDNF, димерного дипептида ГСБ-106. *Acta Naturae*. 2013;5(4(19)):116-120. [Seredenin SB, Gudasheva TA, Voronina TA. Antidepressant effect of the original low molecular weight mimetic BDNF, dimeric dipeptide GSB-106. *Acta Naturae*. 2018;10(3(88)):88-92. (In Russ.)].
- Поварнина П.Ю., Гарибова Т.Л., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора обладает свойствами антидепрессанта при пероральном введении. *Acta Naturae*. 2018;10(3(88)):88-92. [Povarnina PYu, Garibova TL, Gudasheva TA, Seredenin SB. Dipeptide mimetic of brain neurotrophic factor has the properties of an antidepressant when administered orally. *Acta Naturae*. 2018;10(3(88)):88-92. (In Russ.)].
- Gudasheva TA, Tallero AV, Mezhlumyan AG, et al. Low-Molecular Weight BDNF Mimetic, Dimeric Dipeptide GSB-106, Reverses Depressive Symptoms in Mouse Chronic Social Defeat Stress. *Biomolecules*. 2021 Feb 10;11(2):252. doi: 10.3390/biom11020252.
- Vakhitova YV, Kalinina TS, Zainullina LF, et al. Analysis of Antidepressant-like Effects and Action Mechanisms of GSB-106, a Small Molecule, Affecting the TrkB Signaling. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 13;22(24):13381. doi: 10.3390/ijms222413381.
- Povarnina PY, Antipova TA, Logvinov IO, et al. Chronically Administered BDNF Dipeptide Mimetic GSB-106 Prevents the Depressive-like Behavior and Memory Impairments after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Curr Pharm Des*. 2023;29(2):126-132. doi: 10.2174/1381612829666230103161824.
- Mezhlumyan AG, Tallero 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 Feb 24;15(3):284. doi: 10.3390/ph15030284.
- Paquet A. Introduction of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, trichloroethoxycarbonyl, and benzyloxycarbonyl amine protecting groups into O-unprotected hydroxyamino acids using succinimidyl carbonates. *Canadian Journal of Chemistry*. 1982;60(8):976-980. doi: 10.1139/v82-146.10.1139/v82-146.
- Kuhler JL, Brooks RT, Helms WK et al. Selective synthesis applying amino acids with basic side chains as peptide precursors. *Afr. J. Pure Appl. Chem*. 2009;3(6):108-115.
- Сазонова Н.М., Тарасюк А.В., Шумский А.Н. и др. Синтез и биологические свойства нового дипептидного миметика 2-й петли мозгового нейротрофического фактора. Химико-фармацевтический журнал. 2018;52(9):14-21. [Sazonova NM, Tarasyuk AV, Shumskii AN, et al. Synthesis and biological properties of new dipeptide mimetic of brain derived neurotrophic factor loop. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(9):14-21. (In Russ.)]. doi: 10.30906/0023-1134-2018-52-9-14-21.
- Baer E, Maurukas J. Phosphatidyl serine. *J Biol Chem*. 1955 Jan;212(1):25-38.
- Scheurer A, Mosset P, Bauer W, Saalfrank RW. A Practical Route to Regiospecifically Substituted (R)- and (S)-Oxazolyphenols. *Eur J Org Chem*. 2001;3067-3074. doi:10.1002/1099-0690(200108)2001:163.0.CO;2-0
- Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res*. 2001 Nov 1;125(1-2):141-9. doi: 10.1016/S0166-4328(01)00291-1.
- Lucki I. Behavioral Despair. *Encycl. Psychopharmacol*. 2014;1-5. doi: 10.1007/978-3-642-27772-6_141-2.
- Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, Doron R. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *J Vis Exp*. 2015 Mar 2;(97):52587. doi: 10.3791/52587.
- Abdelhamid RE, Kovács KJ, Nunez MG, Larson AA. Depressive behavior in the forced swim test can be induced by TRPV1 receptor activity and is dependent on NMDA receptors. *Pharmacol Res*. 2014 Jan;79:21-7. doi: 10.1016/j.phrs.2013.10.006.
- Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res*. 2001 Nov 1;125(1-2):141-9. doi: 10.1016/S0166-4328(01)00291-1.
- Angoa-Pérez M, Kane MJ, Briggs DI, et al. Mice genetically depleted of brain serotonin do not display a depression-like behavioral phenotype. *ACS Chem Neurosci*. 2014 Oct 15;5(10):908-19. doi: 10.1021/cn500096g.
- Тарасюк А.В., Гудашева Т.А., Сазонова Н.М. и др. Анализ зависимости структура-активность в ряду аналогов ГСБ-106-дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора. *Биоорганическая химия*. 2014;40(2):142-156. [Tarasiuk AV, Gudasheva TA, Sazonova NM, et al. Study of structure-activity relationship in series of Gsb-106 analogues-dipeptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *Bioorg Khim*. 2014;40(2):142-156. (In Russ.)]. doi: 10.7868/S0132342314020134.
- Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В. и др. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора. *Биоорганическая химия*. 2012;38(3):280-290. [Gudasheva TA, Tarasiuk AV, Pomogaibo SV, et al. Design and Synthesis of Dipeptide Mimetics of Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2012;38(3):280-290. (In Russ.)].
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1977 Oct;229(2):327-36.



Исследование влияния КАПАХ, мемантина и ривастигмина на поведение и когнитивные функции крыс

Никитин Д. О., Семина И. И., Валеева Е. В., Никитина А. В.,
Хафизова А. З., Овчинникова А. Г.

ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань,
Российская Федерация

Аннотация

Актуальность. Болезнь Альцгеймера (БА) — нейродегенеративное заболевание, сопровождающееся когнитивными и поведенческими нарушениями. Препараты, используемые сегодня в клинической практике, способны замедлить её прогрессирование, но ассоциированы с пожизненным применением, что обусловлено комплексностью патогенеза. Поэтому для коррекции БА необходим аналогичный подход, которым может стать КАПАХ (2-хлорэтоксипара-N-диметиламинофенилфосфорилацетогидразид) — потенциальное лекарственное средство (ЛС) с мультитаргетным механизмом действия.

Цель. Изучить влияние КАПАХ и препаратов сравнения (мемантина и ривастигмина) на поведение и когнитивные функции крыс.

Материалы и методы. Объект исследования — КАПАХ потенциальное ЛС, обладающее мультитаргетным механизмом действия. Препараты сравнения — мемантин (10 мг/кг) и ривастигмин (2 мг/кг). Животные были разделены на 4 группы (контроль, КАПАХ, мемантин, ривастигмин) по 8 самцов и 9 самок и 30 дней получали подкожные инъекции соответствующих средств, после чего их когнитивные функции и поведение были исследованы на моделях «Водный лабиринт Морриса» (ВЛМ) и «Экстраполяционное избавление» (ЭПИ) (НПК «Открытая наука», Россия) при помощи программы «EthovisionXT» (Noldus, Нидерланды). Статистическая обработка проводилась с использованием однофакторного анализа ANOVA в программе GraphPadPrism8.0.1.

Результаты. На модели «ВЛМ» применение КАПАХ в 1,8 и 1,5 раза ($p < 0,05$) увеличивало время плавания в зоне платформы по сравнению с контролем в группах самцов и самок, соответственно, превосходя показатели ЛС сравнения. В тесте «ЭПИ» введение КАПАХ самцам снижало число прыжков в 4,4 раза ($p < 0,05$) раза и в 2,3 раза ($p < 0,05$) увеличивало латентный период двигательной активности по сравнению с контролем, но не влияло на данные аспекты в случае самок.

Вывод. Многократное введение КАПАХ улучшает когнитивные функции и память здоровых самцов и самок крыс, а также снижает тревожность самцов, превосходя при этом эффекты мемантина и ривастигмина.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера; мемантин; ривастигмин; водный лабиринт Морриса; экстраполяционное избавление

Для цитирования:

Никитин Д. О., Семина И. И., Валеева Е. В., Никитина А. В., Хафизова А. З., Овчинникова А. Г. Исследование влияния КАПАХ, мемантина и ривастигмина на поведение и когнитивные функции крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(3):38–48. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-3-38-48>. EDN: TKQGOZ
Поступила: 05.07.2024. В доработанном виде: 07.08.2024. Принята к печати: 07.09.2024. Опубликовано: 30.09.2024.

Effects of CAPAH, memantine, and rivastigmine on behavioral and cognitive functions of rats

Dmitry O. Nikitin, Irina I. Semina, Elena V. Valeeva, Anastasiya V. Nikitina, Aigul Z. Khafizova, Amina G. Ovchinnikova
Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

Abstract

Relevance. Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by cognitive and behavioral disorders. The drugs currently used in clinical practice can slow drug development but are usually associated with lifelong use because of the complexity of pathogenesis. Therefore, to correct AD, a similar approach is needed, which can be CAPAH (2-chloroethoxy-para-N-dimethylaminophenylphosphorylaceto-hydrazide), a potential drug with a multitarget mechanism of action.

Objective. Investigate the effects of CAPAH, memantine, and rivastigmine on the behavior and cognitive functions of rats.

Materials and methods. This study identified CAPAH as a potential drug with a multitarget mechanism of action. The comparator drugs were memantine (10 mg/kg) and rivastigmine (2 mg/kg). Animals were divided into 4 groups (control, CAPAH, memantine, rivastigmine), 8 males and 9 females each receiving subcutaneous injections of the respective agents for 30 days. Subsequently, their cognitive functions and behavior were studied on the «Morris Water Maze» (MWM) and «Extrapolation deliverance» (EPI) ("Open Science", Russia) with the help of the "EthovisionXT" program (Noldus, the Netherlands). Statistical processing was performed using one-way ANOVA in the GraphPadPrism 8.0.1 program.

Results. In case "MWM" CAPAH increased the swimming time in the platform zone by 1.8 and 1.5 times ($p < 0.05$) compared with the control in the male and female groups, respectively, exceeding the parameters of the comparison drug. In case "EPI" test, the administration of CAPAH to males reduced the number of jumps by 4.4 times ($p < 0.05$) and increased the latent period of motor activity by 2.3 times ($p < 0.05$) compared with the control group, but did not affect these aspects in females.

Conclusion. Administration of CAPAH improves cognitive function and memory in healthy male and female rats and reduces anxiety in male rats, whereas it outperforms the effects of memantine and rivastigmine.

Keywords: Alzheimer's disease; memantine; rivastigmine; Morris water maze; extrapolation deliverance

For citations:

Nikitin DO, Semina II, Valeeva EV, Nikitina AV, Khafizova AZ, Ovchinnikova AG. Effects of CAPAH, memantine, and rivastigmine on behavioral and cognitive functions of rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(3):38–48. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-3-38-48>. EDN: TKQGOZ

Received: 05.07.2024. Revision received: 07.08.2024. Accepted: 07.09.2024. Published: 30.09.2024.

Введение / Introduction

Терапия нейродегенеративных расстройств является актуальной темой современной медицины, поскольку изменение возрастной структуры популяции в пользу пожилого населения, возрастание доли умственного труда, а также увеличение стрессогенных воздействий приводят к повышению частоты встречаемости данных нарушений. Особенно остро данная ситуация наблюдается в случае болезни Альцгеймера (БА) — хронического необратимого заболевания, которое сопровождается когнитивными и поведенческими нарушениями [1, 2].

Как правило, начальные стадии нейродегенерации характеризуются ухудшением кратковременной памяти, которые не сильно влияют на качество жизни — человек может справиться со сложными задачами (особенно если делал их ранее) и способен обучаться новому, однако не так быстро [2, 3]. Далее при прогрессировании БА поражается пространственная и долговременная память, утрачивается способность абстрактно и логически мыслить, что сказывается на социальных и профессиональных навыках, а самые тяжёлые стадии заболевания характеризуются тотальным слабоумием, потерей самостоятельности и дееспособности [2–6].

Несмотря на то, что точный патогенез БА остаётся открытым вопросом, современной науке очевидно, что возникающая когнитивная и поведенческая симптоматика является результатом нарушения процессов синапто- и нейропластичности или гибели нейронов [6–8]. Как правило, первые нейродегенеративные проявления ассоциированы с нарушением баланса нейротрансмиттеров, что указывает на исключительную важность нейромедиаторных систем для формирования и поддержания как когнитивных функций, так и поведенческих реакций [9–11]. Например, известно, что большую роль в вышеуказанных процессах играет холинергическая система, а нарушения её иннервации, возникающие при БА в тканях неокортекса, гиппокампа и височной доли, сопровождаются поражениями памяти и когнитивных функций [7, 11–13]. Не менее значимым аспектом является баланс возбуждающих аминокислот, а именно глутамата: известно, что иннервация глутаматергической системы усиливается при обучении, однако её гиперактивация считается одним из основных механизмов развития нейродегенеративного процесса и гибели нейронов из-за развития эксайтотоксичности [14].

Поэтому к препаратам выбора в случае данной нозологии относятся средства, способные напрямую или

опосредованно воздействовать на функциональную активность нейротрансмиттерных систем. Например, одна из важнейших линий терапии данной нозологии основана на использовании центральных ингибиторов холинэстеразы — донепезила, ривастигмина, галантамина [15, 16]. Механизм их действия основан на разрушении фермента ацетилхолинэстеразы и нормализации сниженного уровня ацетилхолина в поражённых участках мозга, что активизирует процессы синаптической пластичности и способствует улучшению памяти, внимания, речи и эмоционального статуса [16, 17]. В этой группе лекарственных средств отдельного внимания заслуживает препарат ривастигмин. Известно, что он способен ингибировать функциональную активность не только ацетилхолинэстеразы, но и бутирилхолинэстеразы, фермента, активность которого увеличивается в случае БА. Это предположение подтверждается исследованиями, в которых высокий уровень бутирилхолинэстеразы был обнаружен в сенильных бляшках и нейрофибрилярных клубочках подкорковых структур (гиппокампа, височных и лобных отделов) [18].

Не менее перспективным лекарственным средством, применяемым в случае БА, является мемантин — неконкурентный антагонист NMDA-рецепторов [19, 20]. Как отмечалось ранее, глутамат в качестве нейротрансмиттера играет значимую роль в поддержании механизмов обучаемости и когнитивных функций. Однако гиперактивация NMDA-рецепторного комплекса, возникающая при БА, приводит к эксайтотоксичности — нарушению процессов деполяризации, увеличению поступления ионов кальция и гибели нейронов [21, 22]. Плюсом механизма действия мемантина является его физиологическая вариативность: он способен как избирательно фокусироваться на патологически активных NMDA-рецепторах и блокировать их, предупреждая явление эксайтотоксичности, так и облегчать глутаматергическую стимуляцию в нормальных условиях (например, при обучении) [19–21]. Кроме этого, существует предположение, согласно которому мемантин предупреждает гиперфосфорилирование тау-протеина и таким образом способствует поддержанию гомеостаза и других нейромедиаторных систем — холинергической, дофаминергической и серотонинергической [17, 19, 20]. В настоящее время мемантин при БА применяется как в качестве монотерапии, так и в комбинации с антихолинэстеразными препаратами [16, 18].

Таким образом, своевременное начало лечения способно существенно задержать прогрессирование

нейродегенерации, смягчить симптомы и увеличить количество качественно прожитых лет. Однако ни одно из существующих на сегодняшний день ЛС не способно повернуть вспять процесс нейродегенерации, а их длительный или пожизненный курс применения неуклонно увеличивает риск возникновения побочных эффектов [3, 17, 19, 22].

Поэтому в настоящее время усилия многих научных центров сосредоточены на изучении и изыскании новых, более эффективных и безопасных препаратов. Перспективным вариантом решения этого вопроса может стать применение соединений группы фосфорилацетогидразидов (ФАГ). Ранее было показано, что ФАГ обладают мультитаргетным механизмом действия и способны корригировать функции важнейших нейротрансмиссерных систем, что связано с наличием в их структуре четырёхкоординированного атома фосфора, удерживающего несколько функционально активных групп (хлорэтокси-, диметиламино-, гидразидную группы, фенильный и карбонильный радикалы), каждая из которых может иметь свою мишень в патологическом процессе [24–26]. Это позволило позиционировать наиболее перспективное производное этой группы 2-хлорэтокси-пара-N-диметиламинофенил фосфорилацетогидразид (КАПАХ) как потенциальное лекарственное средство с комплексным механизмом действия, способное улучшать функции мозга при деменциях и различных поражениях когнитивных функций [25–27].

Материалы и методы / Materials and methods

Объектом исследования явилось перспективное соединение ряда ФАГ с мультитаргетным механизмом действия — КАПАХ: 2-хлорэтокси-пара-N-диметиламинофенилфосфорилацетогидразид. Его применяли в дозе 10 мг/кг (1/100 от LD₅₀) (рис. 1А).

КАПАХ был синтезирован на кафедре органической химии ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» под руководством ведущего научного сотрудника,

кандидата химических наук *Тарасовой Р. И.* и в настоящее время находится на завершающей стадии доклинических исследований.

В качестве препаратов сравнения использовали ЛС, применяемые в настоящее время в клинической практике в терапии БА: нейропротектор мемантин («Меманейрин», ЗАО БИС, Россия; в дозе 10 мг/кг) и антихолинэстеразное средство ривастигмин (Novartis, Швейцария; в дозе 2 мг/кг) (рис. 1Б, В). Их выбор основан на предварительном анализе литературы, свидетельствующем об их эффективности в экспериментах на животных [15–22, 28]. Введение всех соединений проводилось в течение 30 дней путём подкожных (п/к) инъекций.

В исследовании было использовано 32 крысы-самца, а также 36 крыс-самок линии Wistar массой 200–300 г в возрасте 3 месяцев. До начала проведения экспериментов все испытуемые животные содержались в стандартных условиях, в естественном световом режиме на полнорациональной сбалансированной диете (согласно ГОСТ Р 50258-92) с соблюдением международных требований Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях, а также согласно «Правилам надлежащей лабораторной практики», утверждённым приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016. В исследовании применялись методы, описанные в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [29].

Животные были разделены на 4 группы, с учётом половой принадлежности:

1. Контрольная группа — введение физиологического раствора (9 самок и 8 самцов);
2. Группа КАПАХ (9 самок и 8 самцов);
3. Группа мемантина (9 самок и 8 самцов);
4. Группа ривастигмина (9 самок и 8 самцов).

После введения препаратов поведение и когнитивные функции животных были исследованы на моделях «Водный лабиринт Морриса» и «Экстраполяционное извлечение». Дизайн исследования представлен на рис. 2.

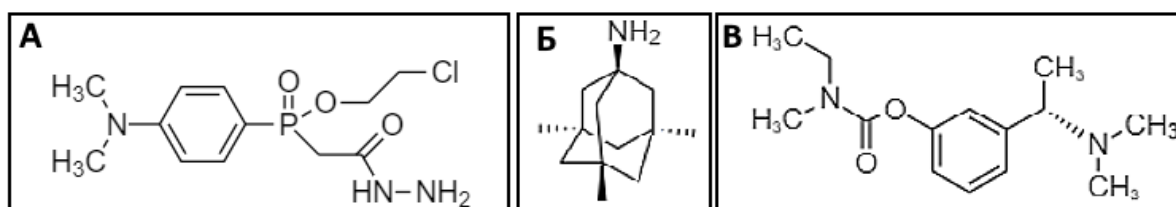


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых соединений

А — КАПАХ (2-хлорэтокси-пара-N-диметиламинофенилфосфорилацетогидразид); Б — мемантин; В — ривастигмин.

Fig. 1. Structural formulas of the studied compounds

А — CAPAH (2-chloroethoxy-para-N-dimethylaminophenylphosphorylacetohydrazide); Б — memantine; В — rivastigmine.

Самцы (n=32) и самки (n=36) крыс линии Wistar			
Этап 1	Многократное (25 дней) подкожное введение		
<u>Физ.р-р.</u>	<u>КАПАХ; 10 мг/кг</u>	<u>Мемантин; 10 мг/кг</u>	<u>Ривастигмин; 2 мг/кг</u>
Самцы (n=8)	Самцы (n=8)	Самцы (n=8)	Самцы (n=8)
Самки (n=9) крыс	Самки (n=9) крыс	Самки (n=9) крыс	Самки (n=9) крыс
Этап 2	Поведенческое тестирование:		
	«Водный лабиринт Морриса» (25-28 дни)		
	«Экстраполяционное избавление» (30 день)		

Рис. 2. Дизайн эксперимента
Fig. 2. Experimental design

Методы поведенческого тестирования / Behavioral testing methods

А) Тест «Водный лабиринт Морриса» (НПК «Открытая наука», Россия) использовали для исследования процессов памяти и когнитивных функций животных [29]. Установка представляет собой круглый бассейн (диаметр 1,5 м, глубина — 0,6 м), заполненный водой (+25 °C). В одном из секторов бассейна на глубине 1,5–2 см под водой находится скрытая платформа (10 × 10 см), расположение которой на этапе обучения неизменно. Воду перед началом эксперимента подкрашивали обезжиренным молочным порошком, чтобы крыса не видела установленную платформу и полагалась только на память. Метод основан на том, что животное должно найти кратчайший путь в бассейне с водой до спрятанной спасательной платформы на основании знаний о её местонахождении, полученных в процессе обучения. Для ориентации грызунов в бассейне использовали 4 чёрно-белых ориентира, которые устанавливали на борта бассейна на равноудалённом расстоянии по сторонам света — север, юг, запад, восток. Таким образом, расстояние от точки старта до спасательной платформы было приблизительно равным. Тест состоит из двух этапов.

Первый этап (обучение) необходим для формирования и закрепления у животных понимания расположения спасательной платформы в пространстве. Для этого в течение 3 последовательных дней, по 3 сессии в день исследуемое животное осторожно опускали в воду поочерёдно возле каждого из 3 ориентиров (мордочкой к данному ориентиру) и в течение 60 с позволяли самостоятельно искать платформу. Если в течение этого времени крыса её не находила, то была аккуратно туда направлена. Когда животное забира-

лось на платформу, ему позволяли посидеть на ней 15 с, после её чего перемещали клетку для просушки.

Второй этап (тестирование) был проведён на 4-й день (после этапа обучения) и служил способом проверки показателей памяти. Для этого спасательную платформу убрали из установки и в течение 1 минуты регистрировали время нахождения животного в зоне, где ранее располагалась платформа. При нормальном состоянии процессов памяти и когнитивных функций животное больше времени пребывало в зоне прежнего расположения платформы [30, 31].

Б) Тест «Экстраполяционное избавление» позволяет оценить когнитивные функции в состоянии стресса [29]. Установка (НПК «Открытая наука», Россия) представляет собой ёмкость (высотой 35 см, диаметром 23 см), наполненную водой с прозрачным сосудом в центре (диаметр 9,2 см), который не касается стенок и погружён в воду (21 °C) на 2 см. Суть методики заключается в помещении испытуемого животного в стрессовые условия (ограниченное водное пространство центрального цилиндра), из которых нужно найти верный выход — т. е. поднырнуть под его край. Чем быстрее животное это понимает, тем лучше её когнитивные функции. Кроме того, данная методика позволяет выявить расположенность к тревожному поведению — безуспешные попытки выпрыгнуть или вскарабкаться на верхний край цилиндра наблюдаются исключительно у крыс с повышенным уровнем эмоциональной реактивности.

За 2 минуты теста учитывали:

1. Количество прыжков животного, что отражает общий уровень стресса, т. е. чем больше прыжков — тем больше уровень стресса.

2. Латентный период двигательной активности (с) — время с момента начала эксперимента до первого движения, что отражает общее состояние когнитивных функций в стрессогенных условиях.

3. Время до подныривания — аспект когнитивных функций, т. е. увеличение данного показателя, отражает снижение когнитивных функций в стрессовых условиях [32].

Для регистрации поведенческих реакций использовали систему «EthoVisionXT» (Noldus, Нидерланды) с автоматическим способом анализа треков [33].

Статистическая обработка результатов проводилась в программе GraphPadPrism 8.0.1. при помощи однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, где фактором служила принадлежность к экспериментальной группе (контроль, КАПАХ, мемантин, ривастигмин). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез $p < 0,05$. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$, где M — среднее значение, SEM — стандартная ошибка среднего.

Результаты / Results

Результаты исследования поведения животных в тесте «Водный лабиринт Морриса» представлены на рис. 3.

В ходе проведения тестирования было установлено, что КАПАХ при многократном режиме введе-

ния способен оказывать положительное влияние на когнитивные функции и пространственную память крыс-самцов, что выражалось в увеличении времени плавания в зоне платформы в 1,8 раз ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными животными. При применении мемантина и ривастигмина не выявлено статистически значимых отличий от времени плавания в зоне платформы контрольной группы, однако многократное введение ривастигмина статистически значимо снижало данный показатель в 2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой, получавшей КАПАХ (рис. 3А).

В группе самок при введении КАПАХ и мемантина было установлено увеличение времени пребывания в зоне платформы по сравнению с контрольными самками в 1,5 ($p < 0,05$) и 1,7 ($p < 0,05$) раз, соответственно, что свидетельствует об улучшении процессов памяти (рис. 3Б).

Результаты исследования поведения животных в тесте «Экстраполяционное избавление» представлены на рис. 4–6.

В тесте были исследованы такие характеристики, как количество прыжков, латентный период двигательной активности, а также время до подныривания. Тест показал, что многократное введение КАПАХ приводило к уменьшению количества прыжков в группе самцов в 4,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными крысами, т. е. к снижению общего

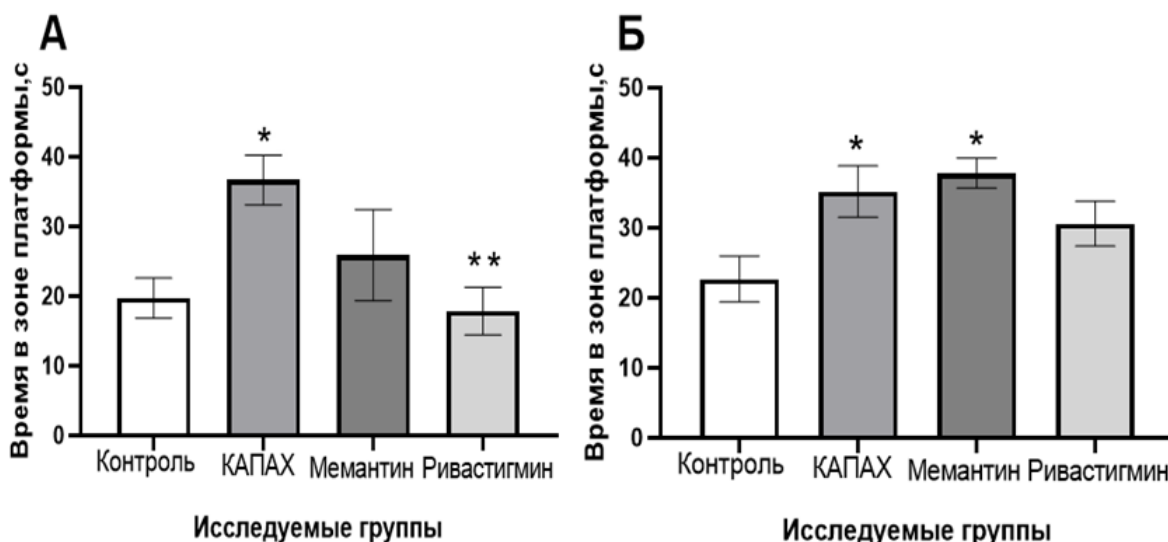


Рис. 3. Влияние КАПАХ, мемантина и ривастигмина на время нахождения в зоне платформы самцов (А) и самок (Б) крыс в тесте «Водный лабиринт Морриса»

Fig. 3. Influence of CAPAH, memantine and rivastigmine on the time spent in the platform zone of male (A) and female (B) rats in the «Morris Water Maze» test

Примечания: по оси абсцисс — время в зоне платформы, с; по оси ординат — группы животных); * ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по отношению к показателям группы контроля; ** ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по отношению к показателям группы КАПАХ.

Notes: on the abscissa axis — time in the platform area, c; on the ordinate axis — groups of animals); * ($p < 0.05$) — statistically significant differences in relation to the indicators of the control group; ** ($p < 0.05$) — statistically significant differences in relation to the indicators of the KAPAH group.

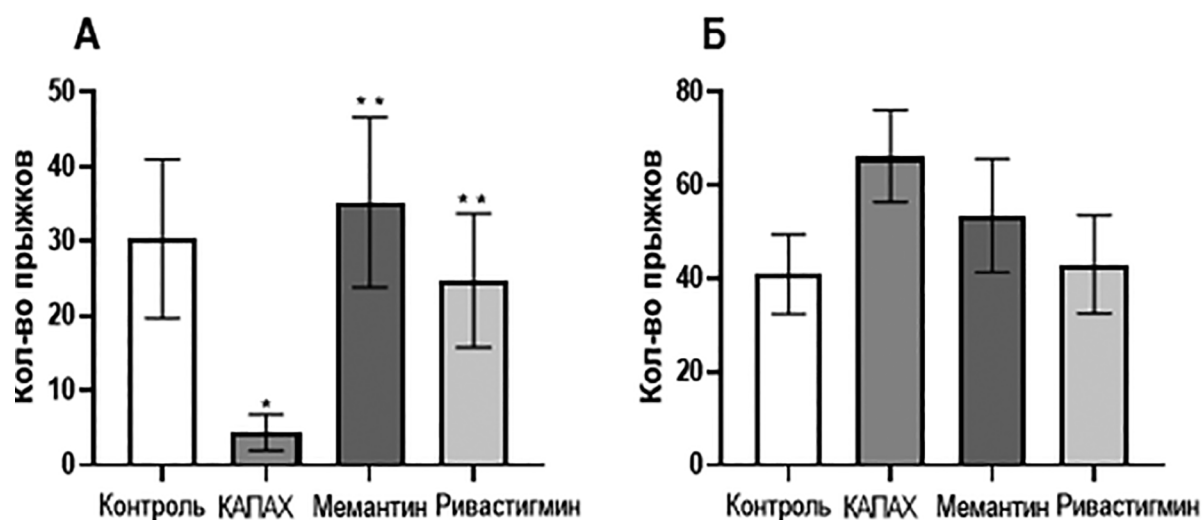


Рис. 4. Влияние КАПАХ, мемантина и ривастигмина на количество прыжков самцов (А) и самок (Б) крыс в тесте «Экстраполяционное избавление»

Fig. 4. Influence of CAPAH, memantine and rivastigmine on the number of jumps of male (A) and female (B) rats in the «Extrapolation escape» test

Примечания: по оси абсцисс — количество прыжков, с; по оси ординат — группы животных; * ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по отношению к показателям группы контроля; ** ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по отношению к показателям группы КАПАХ.

Notes: on the abscissa axis — the number of jumps, c; on the ordinate axis — groups of animals; * ($p < 0.05$) — statistically significant differences in relation to the indicators of the control group; ** ($p < 0.05$) — statistically significant differences in relation to the indicators of the KAPAH group.

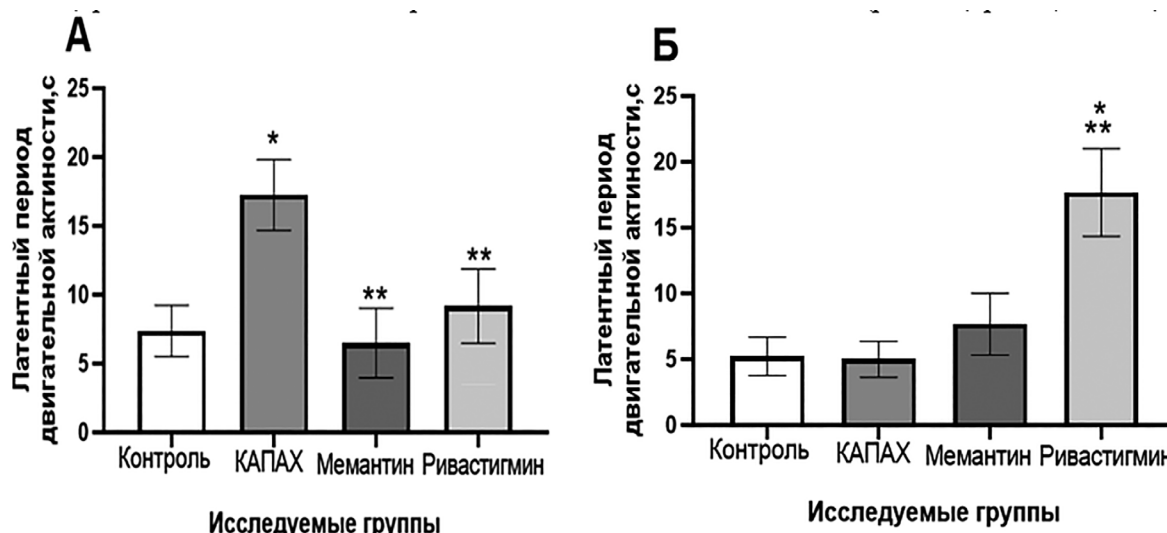


Рис. 5. Влияние КАПАХ, мемантина и ривастигмина на латентный период двигательной активности самцов (А) и самок (Б) крыс в тесте «Экстраполяционное избавление»

Fig. 5. Influence of CAPAH, memantine and rivastigmine on latent period of physical activity of male (A) and female (B) rats in the «Extrapolation escape» test

Примечания: по оси абсцисс — латентный период двигательной активности, с; по оси ординат — группы животных; * ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по отношению к показателям группы контроля; ** ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по отношению к показателям группы КАПАХ.

Notes: on the abscissa axis — the latent period of motor activity, c; on the ordinate axis — groups of animals; * ($p < 0.05$) — statistically significant differences in relation to the indicators of the control group; ** ($p < 0.05$) — statistically significant differences in relation to the indicators of the KAPAH group.

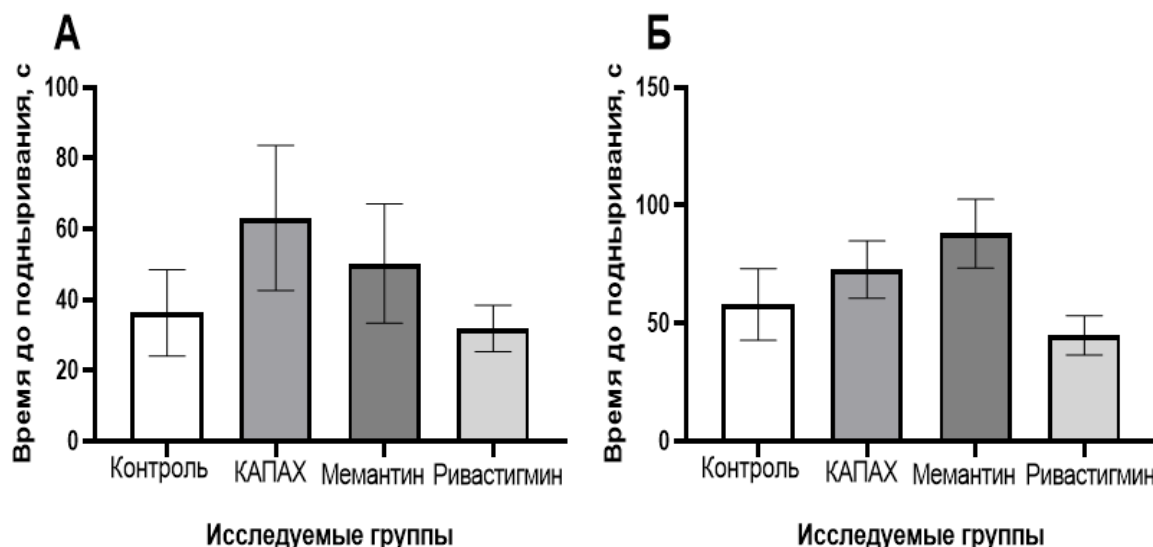


Рис. 6. Влияние КАПАХ, мемантина и ривастигмина на время до подныривания самцов (А) и самок (Б) крыс в тесте «Экстраполяционное избавление»

Fig. 6. Influence of CAPAH, memantine and rivastigmine time to dive of male (A) and female (B) rats in the «Extrapolation escape» test

Примечания: по оси абсцисс — латентный период двигательной активности, с; по оси ординат — группы животных; * ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по отношению к показателям группы контроля; ** ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по отношению к показателям группы КАПАХ.

Notes: on the abscissa axis — the latent period of motor activity, s; on the ordinate axis — groups of animals; * ($p < 0,05$) — statistically significant differences in relation to the indicators of the control group; ** ($p < 0,05$) — statistically significant differences in relation to the indicators of the KAPAH group.

уровня тревожности в условиях повышенной стрессогенности. При введении мемантина и ривастигмина не выявлено статистически значимых отличий по сравнению с контрольными самцами, однако сравнение данного показателя с крысами, получавшими КАПАХ, выявило увеличение количества прыжков в группах — в 5,0 ($p < 0,05$) для мемантина и в 3,5 раза ($p < 0,05$) для ривастигмина (рис. 4А).

В группе самок статистически значимых отличий не обнаружено (рис. 4Б).

При исследовании латентного периода двигательной активности было установлено увеличение данного показателя в группе самцов, получавших КАПАХ в 2,3 раза ($p < 0,05$), по сравнению с контрольными самцами, что может говорить о снижении аффективного статуса животных. При введении мемантина и ривастигмина статистически значимых отличий от показателей контрольных самцов не обнаружено, но показатели данных групп были ниже, по сравнению с таковыми при введении КАПАХ — в 2,6 ($p < 0,05$) и 2,2 ($p < 0,05$) раза, соответственно (рис. 5А).

В случае самок статистически значимые отличия были обнаружены только в группе, получавшей ривастигмин — наблюдалось увеличение латентного периода двигательной активности, превосходящее как показатели контрольных животных в 3,4 ($p < 0,05$) раза, так и показатели крыс после введения КАПАХ в 3,5 ($p < 0,05$) раза (рис. 5Б).

При регистрации периода времени до подныривания в тесте «Экстраполяционное избавление» не выявлено статистически значимых различий ни в одной из исследуемых групп, что может свидетельствовать об отсутствии влияния данных соединений на этот показатель в данной модели (рис. 6А, Б).

Таким образом, анализ поведенческих изменений у крыс при многократном введении исследуемых соединений показал отличительные особенности в поведении у крыс, которым вводили КАПАХ: препарат улучшал пространственную память на модели «Водный лабиринт Морриса», а также снижал выраженность тревожного поведения в стрессогенных условиях на модели «Экстраполяционное избавление».

Обсуждение / Discussion

Нужно понимать, что патогенез БА представляет собой сложную и многокомпонентную проблему. Кроме того, несмотря на прогрессирующую распространённость этого нейродегенеративного заболевания, лекарственная терапия БА остаётся открытым вопросом: на данный момент не существует достаточно эффективных, безопасных и экономически целесообразных подходов к её лечению, что обусловлено несовершенством способов диагностики начальных стадий нейродегенерации и несвоевременным обращением пациента за помощью, гетерогенностью

возникающих патогенетических механизмов, а также необратимостью возникающих дегенеративных изменений [1, 10, 14]. Поэтому эффекты ЛС, применяемых сегодня в терапии данной нозологии, направлены на замедление прогрессирования нейродегенерации, компенсаторное восполнение дисбаланса нейротрансмиттеров в важнейших медиаторных системах (холинергической, ГАМКергической, серотонинергической, глутаматергической), а также нивелирование возникающей симптоматики [2, 14, 15, 18].

Известно, что холинергическая система играет большую роль в развитии и поддержании когнитивных функций и в случае БА поражается одной из первых [15–18]. Поэтому одна из важнейших линий терапии БА основана на использовании центральных ингибиторов холинэстеразы — донепезила, ривастигмина, галантамина. К сожалению, прогрессирующая дегенерация холинергических структур, характерная для БА, приводит к снижению профиля эффективности данной группы лекарственных средств. Поэтому для достижения наибольшей эффективности терапия БА дополняется и другими ЛС. Одним из самых перспективных препаратов считается мемантин, что связано с особенностью его механизма действия: являясь неконкурентным антагонистом NMDA-рецепторного комплекса, он способен нормализовать функциональную активность глутаматергической системы, предупреждая появление эксайтотоксичности или облегчая трансмиссию [16–18]. Известно, что введение мемантина и антихолинэстеразных средств животным способствует снижению выраженности когнитивных нарушений и нормализации поведения [16, 17].

Принимая во внимание важность вышеуказанных систем в патогенезе БА, особый интерес вызывает группа фосфилацетогидразидов, а именно препарат КАПАХ. Ранее было показано, что взаимодействие КАПАХ с глициновыми стрихниннечувствительными участками NMDA-рецепторов повышает связывание с данным комплексом специфического лиганда, предупреждает эксайтотоксичность глутаматного медиатора и, таким образом, оказывает нейропротекторное действие [24–27].

Кроме того, благодаря наличию в фенильном радикале диметиламиногруппы КАПАХ способен взаимодействовать с нейрокининовыми NK1 рецепторами аналогично нейропептиду субстанции Р, улучшать холинергическую передачу и, следовательно, процессы памяти и когнитивные функции. Данное положение подтверждено исследованиями, в которых сравнивались эффекты КАПАХ и субстанции Р на фоне угнетения синаптической передачи в холинергических структурах из-за влияния блокатора NK1-рецепторов Win-51 [25–27].

На основании нейропротекторных и мнемотропных эффектов КАПАХ, обусловленных глутаматергическими и холинергическими влияниями, была проведена оценка его влияния на процессы памяти

и когнитивные функции здоровых крыс в сравнении с лекарственными препаратами, применяемыми в настоящее время в клинической практике при их многократном п/к введении.

Как известно, модель «Водный лабиринт Морриса» позволяет анализировать широкий спектр различных показателей: процессы обучаемости и памяти (пространственной, кратковременной и долгосрочной), а также аспект когнитивных функций, а его эффективность подтверждается многочисленными исследованиями в контексте оценки гиппокамп-зависимой пространственной навигации и «референс-памяти» [29, 30]. Наше исследование показало, что многократное введение КАПАХ способствует улучшению процессов памяти крыс обоего пола. ЛС сравнения несколько уступали КАПАХ по своей эффективности: при введении ривастигмина самкам и самцам, а также мемантина самцам не выявлено статистически значимых отличий от показателей контрольной группы (см. рис. 3А, Б.). Это может объясняться отсутствием влияния мемантина и ривастигмина на нормальную активность когнитивных функций.

Одним из важнейших факторов, определяющих общее состояние когнитивных функций, считается реакция на стресс. Поэтому для изучения данного аспекта использовали модель «Экстраполяционное извлечение», где источником стресса выступал контакт с водой в ограниченном пространстве [29, 32]. Установлено, что КАПАХ снижает тревожное поведение самцов, не влияя на тревожность самок, что может быть связано с более выраженным эмоциональным ответом в случае самок (см. рис. 4А, Б.).

Кроме того, на данной модели было проведено изучение состояния когнитивных функций, т. е. латентного периода двигательной активности. Установлено, что данный показатель был повышен в группах самцов после введения КАПАХ, по сравнению с контрольными самцами, однако в группе самок статистически значимых отличий от контрольной группы не выявлено (см. рис 5А, Б.). Этот аспект может быть связан со склонностью самцов задумываться перед принятием «решения», что указывает на их устойчивость к стрессогенному воздействию [32].

Таким образом, было показано, что благодаря мультитаргетному механизму действия, КАПАХ может оказывать влияние на нормальную активность когнитивных функций, процессы памяти и поведение самцов и самок крыс, что отличает его эффекты от препаратов сравнения.

Выводы / Conclusions

Было показано, что многократное подкожное введение КАПАХ в дозе 10 мг/кг в течение 30 дней способствует улучшению когнитивных функций и процессов памяти здоровых самцов и самок крыс на модели «Водный лабиринт Морриса», увеличивая

время плавания в зоне расположения платформы, а также снижает выраженность тревожного поведения крыс-самцов в тесте «Экстраполяционное избавление», уменьшая количество прыжков, превосходя при этом эффекты препаратов, используемых в настоящее время в клинической практике в терапии

БА — мемантина (10 мг/кг) и ривастигмина (2 мг/кг).

Очевидно, что КАПАХ, как и препараты сравнения, способен оказывать неоднозначное действие на когнитивные функции и поведенческие реакции самок и самцов крыс, что требует дальнейшего изучения.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

Никитин Д. О. — проведение экспериментов, обработка полученных результатов, написание текста; *Семина И. И.* — концепция и дизайн исследования, общий анализ полученных данных, консультация при написании текста статьи; *Валеева Е. В.* — анализ относительного уровня экспрессии генов, написание текста статьи; *Никитина А. В.* — участие в проведении экспериментов и обработке полученных результатов; *Хафизова А. З.* — написание текста статьи; *Овчинникова А. Г.* — анализ и обработка полученных результатов, консультация при написании текста статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

Authors' participation

Nikitin DO — conducting experiments, processing the results obtained, writing the text; *Semina II* — concept and design of the study, general analysis of the data obtained, consultation when writing the text of the article; *Valeeva EV* — analysis of the relative level of gene expression, writing the text of the article; *Nikitina AV* — participation in conducting experiments and processing the results obtained; *Khafizova AZ* — writing the text of the article; *Ovchinnikova AG* — analysis and processing of the results obtained, consultation when writing the text of the article.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Никитин Дмитрий Олегович

Автор, ответственный за переписку

ассистент кафедры фармакологии Казанского ГМУ, Казань, Российская Федерация
e-mail: richard4777@yandex.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5773-867X>

Dmitry O. Nikitin

Corresponding author

Assistant of the Department of Pharmacology of the Kazan SMU, Kazan, Russian Federation
e-mail: richard4777@yandex.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5773-867X>

Семина Ирина Ивановна

д. м. н., профессор кафедры фармакологии, зав. Центральной научно-исследовательской лабораторией Казанского ГМУ, Казань, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3515-0845>

Irina I. Semina

Dr. Sci (Med.), Professor of the Department of Pharmacology, Head of the Central Research Laboratory, Kazan SMU, Kazan, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3515-0845>

Валеева Елена Валерьевна

к. б. н., м. н. с. лаборатории молекулярной генетики Центральной научно-исследовательской лабораторией Казанского ГМУ, Казань, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7080-3878>

Elena V. Valeeva

PhD, Cand. Sci. (Biol.), Junior Researcher of Laboratory of Molecular Genetics, Central Scientific Research Laboratory, Kazan SMU, Kazan, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7080-3878>

Никитина Анастасия Вадимовна

ассистент кафедры фармакологии Казанского
ГМУ, Казань, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6219-6246>

Anastasiya V. Nikitina

Assistant of the Department of Pharmacology of the
Kazan SMU, Kazan, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6219-6246>

Хафизова Айгуль Зульфаровна

аспирант кафедры фармакологии Казанского
ГМУ, Казань, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7690-7341>

Aigul Z. Khafizova

PhD student, Department of Pharmacology, Kazan,
Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7690-7341>

Овчинникова Амина Гаязовна

к. м. н., доцент кафедры фармакологии
Казанского ГМУ, Казань, Российская
Федерация

Amina G. Ovchinnikova

PhD, Cand. Sci. (Med), Associate Professor of the
Department of Pharmacology, Kazan, Russian Fed-
eration

Список литературы / References

1. Кичерова О.А., Рейхерт Л.И. Болезнь Альцгеймера. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2018;118(1):77-81. [Kicherova OA, Reikher L.I. Alzheimer's disease. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2018;118(1):77-81. (In Russ.)]. doi: 10.17116/jnevro20181181177-81.
2. Васенина Е.Е., Левин О.С., Сонин А.Г. Современные тенденции в эпидемиологии деменции и ведении пациентов с когнитивными нарушениями. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. Спецвыпуски. 2017;117(6-2):87-95. [Vasenina EE, Levin OS, Sonin AG. Modern trends in epidemiology of dementia and management of patients with cognitive impairment. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2017;117(6-2):87-95. (In Russ.)]. doi: 10.17116/jnevro20171176287-95.
3. Коберская Н.Н. Болезнь Альцгеймера : новые критерии диагностики и терапевтические аспекты в зависимости от стадии болезни. *Медицинский совет*. 2017;10:18-24. [Koberskaya NN. Alzheimer's disease: new diagnostic criteria and therapeutic aspects depending on the stage of the disease. *Meditsinskiy sovet*. 2017;10:18-24. (In Russ.)]. doi: 10.21518/2079-701X-2017-10-18-24.
4. Сахаров А.В., Мындускин И.В., Терешков П.П. Изменение некоторых показателей нейрорепарации у пациентов с первым эпизодом шизофрении при терапии антипсихотиками. *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2020;4(109):15-20. [Sakharov AV, Mynduskin IV, Tereshkov PP. Indicators of neuro-repair in patients with the first episode of schizophrenia during antipsychotic therapy. *Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry*. 2020;4(109):15-20. (In Russ.)]. doi: 10.26617/1810-3111-2020-4(109)-15-20.
5. Тювина Н.А., Прохорова С.В., Максимова Т.Н., Вербицкая М.С. Когнитивные нарушения при депрессии и болезни Альцгеймера : дифференциальная диагностика и подходы к терапии. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2019;11(3):116-123. [Tyuvina NA, Prokhorova SV, Maksimova TN, Verbitskaya MS. Cognitive impairments in depression and Alzheimer's disease: differential diagnosis and approaches to therapy. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2019;11(3):116-123. (In Russ.)]. doi: 10.14412/2074-2711-2019-3-116-123.
6. Пономарева Е.В. Депрессивные расстройства при болезни Альцгеймера. *Психиатрия*. 2008;4(6):85-91. [Ponomareva EV. Depressive disorders in Alzheimer's disease. *Psikhiatriya*. 2008;4(6):85-91. (In Russ.)].
7. Пономарева Е.В. Депрессия при болезни Альцгеймера. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2008;108(2):4-11. [Ponomaryova EV. Depression in Alzheimer's disease. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2008;108(2):4-11. (In Russ.)].
8. Левин О.С., Ляшенко Е.А. Тревога и коморбидные состояния. *Нервные болезни*. 2016;(1):28-34. [Levin OS, Lyashenko EA. Anxiety and comorbid conditions. *Nervous diseases*. 2016;(1):28-34. (In Russ.)].
9. Григоренко А.П., Рогаяев Е.И. Молекулярные основы болезни Альцгеймера. *Молекулярная биология*. 2007;41(2):331-345. [Grigorenko AP, Rogaev EI. Molecular basics of alzheimer's disease. *Molekulyarnaya biologiya*. 2007;41(2):331-345. (In Russ.)].
10. Науменко А.А., Преображенская И.С. Патогенез, диагностика и терапия болезни Альцгеймера. *Медицинский совет*. 2015;(5):46-54. [Naumenko AA, Preobrazhenskaya IS. Patogenez, diagnostika i terapiya bolezni Al'cgejmera. *Meditsinskiy sovet*. 2015;(5):46-54. (In Russ.)]. doi: 10.21518/2079-701X-2015-5-46-54.
11. Лобзин В.Ю., Колмакова К.А., Емелин А.Ю. Новый взгляд на патогенез болезни Альцгеймера: современные представления о клиренсе амилоида. *Обзор психиатрии и медицинской психологии имени В.М. Бехтерева*. 2018;(2):22-28. [Lobzin VYu, Kolmakova KA, Emelin AYU. A novel view on Alzheimer's disease pathogenesis: modern concept of amyloid clearance. *V.M. Bekhterev review of psychiatry and medical psychology*. 2018;(2):22-28. (In Russ.)]. doi: 10.31363/2313-7053-2018-2-22-28.
12. Полунина А.Г., Брюн Е.А. Эпизодическая память: неврологические и нейромедиаторные механизмы. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2012;6(3):53-60. [Polunina AG, Bryun EA. Episodic memory: neurological and neuromediator mechanisms. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2012;6(3):53-60. (In Russ.)].
13. Шмакова А.А., Андросова Л.В. Моделирование болезни Альцгеймера на животных. *Психиатрия*. 2018;1(77):97-108. [Shmakova AA, Androsova LV. Modeling Alzheimer's disease in animals. *Psikhiatriya*. 2018;1(77):97-108. (In Russ.)]. doi: 10.2618-6667-2018-77-97-108.
14. Маньковский Н.Б., Кузнецова С.М. Возрастные изменения нейротрансмиттерных систем мозга как фактор риска цереброваскулярной патологии. *The Journal of Neuroscience*. 2013;1(2):5-13. [Mankovsky NB, Kuznetsova SM. Age-related changes in brain neurotransmitter systems as a risk factor for cerebrovascular pathology. *The Journal of Neuroscience*. 2013;1(2):5-13. (In Russ.)].
15. Васенина Е.Е., Левин О.С. Особенности применения трансдермальной формы ривастигмина при болезни Альцгеймера. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2012;(3):96-99. [Vasenina EE, Levin OS. The specific features of using a rivastigmine transdermal formulation in Alzheimer's disease. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2012;(3):96-99. (In Russ.)].
16. Лемина Е.Ю., Чурюканов В.В. Антихолинэстеразные средства: современная оценка. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2019;82(5):40-44. [Lemina EY, Churyukanov VV. Anticholinesterase agents: current evaluation. *Experimental and clinical pharmacology*. 2019;82(5):40-44. (In Russ.)]. doi: 10.30906/0869-2092-2019-82-5-40-44.
17. Тювина Н.А., Балабанова В.В. Лечение болезни Альцгеймера. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2015;7(3):80-85. [Tyuvina NA, Balabanova VV. Treatment for Alzheimer's diseases. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2015;7(3):80-85. (In Russ.)]. doi: 10.14412/2074-2711-2015-3-80-85.
18. Дамулин И.В. Использование ривастигмина при деменциях: от симптоматического эффекта к нейропротекции. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2010;110(9):76-82. [Damulin IV. Rivastigmine in the treatment of dementia: from the symptomatic effect to neuroprotection. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2010;110(9):76-82. (In Russ.)].

19. Колыхалов И.В. Лечение поведенческих и психотических симптомов болезни Альцгеймера: вклад мемантина. *Современная терапия в психиатрии и неврологии*. 2013;3(4):17-20. [Kolykhalov IV. Treatment of behavioral and psychotic symptoms of Alzheimer's disease: the contribution of memantine. *Modern therapy in psychiatry and neurology*. 2013;3(4):17-20. (In Russ.)].
20. Folch J, Busquets O, Etcheto M, et al. Memantine for the Treatment of Dementia: A Review on its Current and Future Applications. *J Alzheimers Dis*. 2018;62(3):1223-1240. doi: 10.3233/JAD-170672.
21. Гаврилова С.И. Мемантин в лечении болезни Альцгеймера: 20 лет клинического применения. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. Спецвыпуски. 2016;116(6-2):10-18. [Gavrilova SI. Memantine in treatment of Alzheimer's disease: 20 years of clinical use. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2016;116(6-2):10-18. (In Russ.)]. doi: 10.17116/jnevro20161166210-18.
22. Науменко А.А., Преображенская И.С. Патогенез, диагностика и терапия болезни Альцгеймера. *Медицинский совет*. 2015;(5):46-54. [Naumenko AA, Preobrazhenskaya IS. Pathogenesis, diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Meditsinskiy sovet*. 2015;(5):46-54. (In Russ.)].
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 Jul;34(8):1296-306. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.04.002.
24. Семина И.И., Шиловская Е.В., Тарасова Р.И. и др. Механизмы психотропного действия гидразидов фосфорилированных карбоновых кислот. *Химико-фармацевтический журнал*. 2002;36(4):3-6. [Semina II, Shilovskaya EV, Tarasova RI, et al. Mekhanizmy psihotropnogo dejstviya gidrazidov fosforilirovannyh karbonovyh kislot. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2002;36(4):3-6. (In Russ.)]. doi: 10.30906/0023-1134-2002-36-4-3-6.
25. Никитина А.В., Семина И.И., Байчурина А.З. и др. Новые производные фосфорсодержащих соединений с аминокислотными и триазолтионными фрагментами — потенциальные лекарственные средства, улучшающие память и когнитивные функции. *Казанский медицинский журнал*. 2023;104(1):72-80. [Nikitina AV, Semina II, Baychurina AZ, et al. New derivatives of phosphorus-containing compounds with amino acid and triazolethione fragments are potential drugs that improve memory and cognitive functions. *Kazan medical journal*. 2023;104(1):72-80. (In Russ.)]. doi: 10.17816/KMJ108603.
26. Семина И.И., Байчурина А.З., Шиловская Е.В. и др. Исследование метаболических нарушений у крыс при воздействии гипобарической гипоксии и разработка подходов коррекции путём одновременного воздействия на разные звенья патогенеза. *Казанский медицинский журнал*. 2021;102(5):654-662. [Semina II, Baychurina AZ, Shilovskaya EV, et al. Study of metabolic disorders in rats under exposure to hypobaric hypoxia and development of correction approaches by simultaneous action on different elements of pathogenesis. *Kazan medical journal*. 2021;102(5):654-662. (In Russ.)]. doi: 10.17816/KMJ2021-654.
27. Семина И.И., Байчурина А.З. Разработка новых потенциальных лекарственных средств с психотропной активностью среди фосфориллацетогидразидов и других производных фосфорилированных карбоновых кислот — приоритетное направление Казанской школы психофармакологов. *Казанский медицинский журнал*. 2016;97(1):148-155. [Semina II, Baychurina AZ. Development of new potential drugs with psychotropic activity among phosphorylacetohydrazides and other phosphorylated carboxylic acids derivatives — priority area of Kazan school of psychopharmacologists. *Kazan medical journal*. 2016;97(1):148-155. (In Russ.)]. doi: 10.17750/KMJ2016-148.
28. Колобов В.В., Сторожева З.И. Современные фармакологические модели болезни Альцгеймера. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2014;8(3):38-44. [Kolobov VV, Storozheva ZI. Modern pharmacological models of Alzheimer's disease. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2014;8(3):38-44. (In Russ.)]. doi: 10.17816/psaic173.
29. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. / под ред. А.Н. Миронова — М.: Гриф и К; 2012. [Mironov AN, Bunyatyan ND, Vasiliev AN, et al. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part 1 / Ed by AN Mironova. Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ.)].
30. Svensson M, Hallin T, Broms J, et al. Spatial memory impairment in Morris water maze after electroconvulsive seizures. *Acta Neuropsychiatr*. 2017 Feb;29(1):17-26. doi: 10.1017/neu.2016.22.
31. Ивлиева А.Л., Петрицкая Е.Н., Рогаткин Д.А., Демин В.А. Методические особенности применения водного лабиринта Морриса для оценки когнитивных функций у животных. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2016;102(1):3-17. [Ivlieva AL, Petrinskaya EN, Rogatkin DA, Demin VA. Methodological Characteristics of the Use of the Morris Water Maze for Assessment of Cognitive Functions in Animals. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2017;47(4):484-493. (In Russ.)]. doi: 10.1007/s11055-017-0425-z.
32. Якимова Н.Л., Соседова Л.М. Дофамин-зависимое нарушение поведения белых крыс с интоксикацией сулемой в тесте экстраполяционного извлечения. *БЮЛЛЕТЕНЬ ВСНЦ СО РАМН*. 2013;1(89):130-133. [Yakimova NL, Sosedova LM. Dopamine-dependent disorder of conduct of albino rats with sublimate intoxication in the test of extrapolation deliverance. *Acta Biomedica Scientifica*. 2013;1(89):130-133. (In Russ.)].
33. Sabatos-DeVito M, Murias M, Dawson G, et al. Methodological considerations in the use of Noldus EthoVision XT video tracking of children with autism in multi-site studies. *Biol Psychol*. 2019 Sep;146:107712. doi: 10.1016/j.biopsycho.2019.05.012.



Противоопухолевые эффекты антагониста тирозинкиназных TrkA рецепторов соединения ГК-1 у мышей с перевиваемой аденокарциномой молочной железы Ca755

Коваленко Л. П., Поварнина П. Ю., Журиков Р. В., Алексеева С. В., Колик Л. Г.,
Гудашева Т. А., Дурнев А. Д., Дорофеев В. Л.

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

Аннотация

Целью настоящей работы явилась оценка влияния оригинального антагониста тирозинкиназных TrkA рецепторов соединения ГК-1 на показатели торможения роста опухоли (ТРО), среднюю продолжительность жизни и гематологические показатели у самок мышей линии C57Bl/6 с перевиваемой аденокарциномой молочной железы Ca755. В качестве препарата сравнения и для подтверждения валидности модели использовали доксорубицин. Соединение ГК-1, вводимое внутривенно в дозе 10 мг/кг в течение 14 дней, вызывало значимое торможение роста опухоли (ТРО) на 9-, 15- и 21-е сутки развития аденокарциномы Ca755, на 21-е сутки ТРО составило 60 %. Введение соединения ГК-1 в дозах 1 и 10 мг/кг привело к значимому увеличению средней продолжительности жизни животных (УПЖ), соответственно, на 53 и 47 %. Медиана выживаемости, оцениваемая по методу Каплана–Мейера у животных активного контроля, составила 18 дней, а при введении ГК-1 в дозах 1 и 10 мг/кг — 30 дней. Положительных изменений гематологических показателей после введения ГК-1 отмечено не было. Доксорубицин, вводимый на 2- и 4-е сутки развития опухоли в дозе 4 мг/кг, вызывал торможение роста опухоли на 73 % на 21-е сутки наблюдений, УПЖ — 58 % при медиане выживаемости равной 31 дню. Полученные данные указывают на перспективность дальнейшего изучения противоопухолевых свойств соединения ГК-1.

Ключевые слова: ГК-1; аденокарцинома молочной железы; тирозинкиназные рецепторы; торможение роста опухоли; Ca755

Для цитирования:

Коваленко Л. П., Поварнина П. Ю., Журиков Р. В., Алексеева С. В., Колик Л. Г., Гудашева Т. А., Дурнев А. Д., Дорофеев В. Л. Противоопухолевые эффекты антагониста тирозинкиназных TrkA рецепторов соединения ГК-1 у мышей с перевиваемой аденокарциномой молочной железы Ca755. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(3):49-56. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-3-49-56>. EDN: IAGKGA

Поступила: 03.08.2024. **В доработанном виде:** 05.09.2024. **Принята к печати:** 24.09.2024. **Опубликована:** 30.09.2024.

Anticancer activity of tyrosine kinase TrkA receptors antagonist GK-1 in experiment on mice with mammary gland adenocarcinoma Ca755

Larisa P. Kovalenko, Polina Yu. Povarnina, Ruslan V. Zhurikov, Svetlana V. Alekseeva, Larisa G. Kolik, Tatiana A. Gudasheva, Andrei D. Durnev, Vladimir L. Dorofeev
Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of original tyrosine kinase TrkA antagonist GK-1 on tumor growth, median lifespan and hematological parameters in experiment on female mice C57Bl/6 with mammary gland adenocarcinoma Ca755. 14-day intraperitoneal administration of GK-1 at a dose of 10 mg/kg resulted in a significant tumor growth inhibition (TGI) on the 9th, 15th, and 21st day of adenocarcinoma Ca755 development. TGI on the 21st day was 60 %. Administration of GK-1 at doses of 1 mg/kg and 10 mg/kg significantly increased median lifespan of experimental animals by 53 % and 47 % respectively. Median lifespan was calculated using the Kaplan-Meier survival analysis. Median lifespan of active control group was 18 days, in groups that received GK-1 at doses of 1 mg/kg and 10 mg/kg median lifespan was 30 days. Hematological parameters of experimental animals were not altered by administration of GK-1. Double injection of the doxorubicin on the 2nd and the 4th day of tumor development at dose of 4 mg/kg resulted in TGI by 73 % on the 21st day of experiment, increase in lifespan was 58% and median lifespan was 31 days. Our data show that further investigation of the antitumor activity of GK-1 may bring promising results.

Keywords: GK-1; mammary gland adenocarcinoma; tyrosine kinase receptors; tumor growth inhibition; Ca755

For citations:

Kovalenko LP, Povarnina PYu, Zhurikov RV, Alexeeva SV, Kolik LG., Gudasheva TA, Durnev AD, Dorofeev VL. Anticancer activity of tyrosine kinase TrkA receptors antagonist GK-1 in experiment on mice with mammary gland adenocarcinoma Ca755. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(3):49-56. (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-3-49-56>. EDN: IAGKGA

Received: 03.08.2024. **Revision received:** 05.09.2024. **Accepted:** 24.09.2024. **Published:** 30.09.2024.

Введение / Introduction

Рак является одним из самых тяжёлых заболеваний с высокой вероятностью летального исхода, поэтому актуален поиск новых направлений и способов лечения раковых заболеваний. Среди женской популяции мира в большинстве стран, особенно в развитых и развивающихся, наиболее часто встречается рак молочной железы: из 180 стран мира в 154. Как причина смертности у женщин на первом месте в большинстве стран также находятся рак молочной железы и рак шейки матки. Такая ситуация прослеживается в 105 странах из 180 [1].

Известно, что клетки опухолей различного происхождения экспрессируют нейротрофины и их тирозинкиназные Trk рецепторы, которые оказывают стимулирующее влияние на разные аспекты канцерогенеза [2]. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF) улучшает выживаемость опухолевых клеток и стимулирует их пролиферацию [3], способствует росту и метастазированию опухолей [4], стимулирует нейро- и ангиогенез в микроокружении опухоли [5, 6], оказывает провоспалительное действие [7]. Для NGF доказана негативная роль в патогенезе таких распространённых онкологических заболеваний, как рак лёгких, поджелудочной железы, рак молочной железы, толстого и тонкого кишечника, предстательной железы [8].

В связи с этим блокирование NGF/TrkA сигнального с помощью низкомолекулярных ингибиторов или антител рассматривается как перспективная стратегия терапии онкологических заболеваний [9–11].

В ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» в отделе химии лекарственных средств создан дипептидный миметик 4-й петли фактора роста нервов ГК-1 (амид N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина), который обладает свойствами антагониста специфических для полноразмерного нейротрофина тирозинкиназных TrkA рецепторов [12].

Целью настоящей работы является оценка влияния ГК-1 на рост опухоли, выживаемость и гематологические показатели на модели аденокарциномы молочной железы Ca755 в опытах на самках мышей линии C57Bl/6.

Материалы и методы/ Materials and methods

Изучение противоопухолевой активности соединения ГК-1 было проведено на модели аденокарциномы молочной железы Ca755, полученной из банка клеточных культур ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Стандартная прививочная

доза составляла не менее одного миллиона клеток на мышь, что проверялось на счётчике клеток (BIO-RAD TC-10. Automated Cell Counter). Затем взвесь опухолевых клеток (10 мг в 0,1 мл раствора Хэнкса на мышь) аденокарциномы Ca755 имплантировали самкам мышей линии C57Bl/6 подкожно в область подмышечной впадины. День подкожной прививки клеток опухолевого штамма считается нулевым днем развития опухоли. В качестве позитивного контроля и для верификации модели был использован доксорубин (Doxorubicin Ebewe, Sandoz) который вводили в дозе 4 мг/кг в/б на 2-й и 4-й день развития опухоли. Животным опытных групп вводили ГК-1 в течение 14 дней в двух дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг в/б.

90 самок мышей линии C57Bl/6 были распределены на 5 групп: 1) группа интактного контроля — 10 голов для гематологических исследований; 2) группа животных-опухоленосителей активного контроля — 20 голов, 3) группа препарата сравнения, доксорубин вводили дважды в дозе 4 мг/кг — 20 голов; 4) группа, которой ГК-1 вводили в дозе 1 мг/кг — 20 голов; 5) группа, которой ГК-1 вводили в дозе 10 мг/кг — 20 голов. На 22-й день опыта по 10 животных из групп интактного и активного контроля и каждой опытной группы были использованы для оценки гематологических показателей. Кровь для исследования получали методом декапитации.

Согласно методическим рекомендациям по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств [13], у 40 мышей-опухоленосителей контрольной и опытных групп были изучены следующие параметры: степень торможения роста опухоли по объёму (ТРО) и увеличение средней продолжительности жизни (УПЖ) по сравнению с активным контролем. Противоопухолевый эффект регистрировали на 9-, 15-й, а также 21-е сутки развития опухоли (7-е сутки после окончания 2-недельного введения ГК-1). Расчёт объёма опухоли проводили после измерения 3 её размеров по формуле: $V = A \times B \times C$ на 9-, 15-й, а также на 21-е сутки развития аденокарциномы Ca755. Измерение объёма опухоли проводили инженерным микрометром. Торможение роста опухоли (ТРО %) вычисляли по формуле: $\text{ТРО \%} = (V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}) / V_{\text{контроля}} \times 100 \%$, анализ выживаемости проводился с использованием метода Каплана–Майера [14].

Для изучения влияния ГК-1 и доксорубина на гематологические показатели крови на 22-й день у 10 животных интактного контроля, 10 животных активного контроля и 30 животных опытных групп брали кровь путём декапитации. Подсчёт форменных элементов крови и гемоглобина у мышей проводили на автоматическом гематологическом анализаторе BC-2800 («MINDRAY», Китай). Соотношение различных видов лейкоцитов (окраска мазков крови по Романовскому) было проанализировано на компьютеризированной микроскопической системе МЕКОС-Ц2 (Мекос,

Россия), микроскоп «Nikon Eclipse E200» (Nikon, Япония). Для стандартизации процесса приготовления мазков крови использовали автоматическое устройство для приготовления мазков крови V-SAMPLER (Vision, Австрия). Препараты крови фиксировали и окрашивали автоматически на приборе-автомате ЭМКОСТЕЙНЕР-АВТО АФОМК8-В-01 (ЭМКО, Россия).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения STATISTICA 12. Проверка на нормальность распределения проводилась с применением критерия Шапиро—Уилка. Все регистрируемые характеристики животных представлены в таблицах в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$) либо медианы и квартилей Me ($Q1 \div Q3$). Для проверки гипотезы об однородности групп исследования с нормальным распределением в исследуемой популяции проводили тестирование отсутствия различий между группами при помощи t -критерия Стьюдента. В случае рас-

пределения, отличающегося от нормального, для сравнения показателей использовались непараметрический критерий Манна—Уитни. Оценку гомогенности дисперсий проводили по тесту Левена. Значимость влияния факторов при гомогенной дисперсии определялась с помощью дисперсионного анализа ANOVA, с последующей обработкой методом множественных сравнений по Тьюки. Анализ выживаемости проводился с использованием метода Каплана—Мейера, для оценки достоверности различий между кривыми выживаемости использовался F -критерий Кокса. Результаты считались статистически достоверными, если значение p было меньшим или равным 0,05.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Результаты опыта представлены в табл. 1–3 и рисунке. Согласно данным представленным в табл. 1, при подкожной имплантации 10^6 клеток аденокарци-

Таблица 1

Оценка влияния 14-дневного введения ГК-1 и двукратного введения доксорубина на торможение роста опухоли самок мышей линии C57Bl/6 с аденокарциномой Ca755

Table 1

Effect of 14-day administration of GK-1 and double injection of doxorubicin on tumor growth of C57BL/6 female mice with adenocarcinoma Ca755

Группы / Groups	Средний объём опухоли, мм Average tumor volume, mm					
	9-е сутки / 9th day	ТРО на 9-е сутки, % / TGI on 9th day, %	15-е сутки / 15th day	ТРО на 15-е сутки, % / TGI on 15th day, %	21-е сутки / 21st day	ТРО на 21-е сутки, % / TGI on 21st day, %
Контроль	302,9±79,1		5353,8±930,9		10908,7±1307,8	
Доксорубин 4 мг/кг	7,5±6,2*	98	462,4±122,9*	91	2951,1±608,4*	73
ГК-1 1 мг/кг	59,8±16,6	81	2382,2±619,7	56	5794,4±1222,4	47
ГК-1 10 мг/кг	72,9±44,4*	76	1731,7±683,5*	68	4409,4±928,7*	60

Примечания: ТРО — торможение роста опухоли; * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, критерий Краскела—Уоллеса.
Notes: TGI — Tumor growth inhibition; * — $p < 0,05$ compared to control group, Kruskal–Wallis test.

Таблица 2

Оценка влияния 14-дневного введения ГК-1 и двукратного введения доксорубина на выживаемость самок мышей линии C57Bl/6 с аденокарциномой Ca755

Table 2

Effect of 14-day administration of GK-1 and double injection of doxorubicin on average lifespan and overall survival of C57BL/6 female mice with adenocarcinoma Ca755

Группы / Groups	Средняя продолжительность жизни, сутки / Average lifespan, days	УПЖ, % / IL, %
Контроль	19	
Доксорубин 4 мг/кг	30*	58
ГК-1 1 мг/кг	29*	53
ГК-1 10 мг/кг	28*	47

Примечания: УПЖ — увеличение продолжительности жизни; * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем по F -тесту Кокса.
Notes: IL — increase in lifespan; * — $p < 0,05$ compared to control group, Cox's F -test.

Таблица 3

Оценка влияния 14-дневного введения ГК-1 и двукратного введения доксорубина на показатели периферической крови самок мышей линии C57Bl/6 с аденокарциномой Ca755

Table 3

Effect of 14-day administration of GK-1 and double injection of doxorubicin on hematological parameters of C57BL/6 female mice with adenocarcinoma Ca755

Группа/ Параметр / Group/ Parameter		1-я группа интактный контроль / 1 group Intact control	2-я группа активный контроль / 2 group Active control	3-я группа Доксорубин / 3 group Doxorubicin	4-я группа ГК-1 1 мг/кг / 4 group GK-1 1 mg/kg	5-я группа ГК-1 10 мг/кг / 5 group 10 mg/kg
HGB г/л		141,0 ²³⁴⁵ 131,0÷146,0	75,5 ¹ 73,0÷93,0	92,0 ¹ 88,0÷109,0	89,5 ¹ 78,0÷102,0	89,5 ¹ 79,0÷102,0
RBC млн		9,8 ²³⁴⁵ 9,1÷11,0	5,8 ¹ 5,4÷6,5	7,3 ¹ 6,3÷8,2	6,2 ¹ 5,5÷7,5	6,5 ¹ 5,7÷7,4
HCT %		42,5 ²³⁴⁵ 41,4÷44,4	21,7 ¹ 21,3÷26,3	27,6 ¹ 24,4÷32,0	27,2 ¹ 22,1÷30,1	25,9 ¹ 23,0÷30,3
MCV фл		41,0 39,0÷49,0	40,0 38,0÷41,0	41,0 40,0÷42,0	41,0 40,0÷41,0	41,5 40,0÷43,0
MCH пг		14,5 12,9÷14,5	13,9 12,9÷14,4	14,1 13,8÷14,2	13,8 13,6÷14,9	14,4 13,6÷15,0
MCHC		343,0 301,0÷357,0	347,5 342,0÷354,0	342,5 341,0÷350,0	338,5 333,0÷347,0	341,0 336,0÷346,0
PLT тыс.		637,0 ³⁵ 615,0÷688,0	560,5 392,0÷611,0	494,0 ¹ 352,0÷596,0	500,0 423,0÷590,0	319,5 ¹ 290,0÷390,0
PCT %		0,3 0,3÷0,3	0,3 0,2÷0,3	0,2 0,2÷0,3	0,2 0,2÷0,3	0,2 0,2÷0,3
MPV фл		4,5 ²⁵ 4,4÷4,6	5,0 ¹ 4,8÷5,1	4,6 4,3÷4,8	4,7 4,5÷4,9	4,7 ¹ 4,7÷4,8
WBC тыс.		9,9 ²⁴ 7,7÷11,9	37,8 ¹³ 24,6÷48,5	11,6 ² 9,3÷14,1	18,4 ¹ 14,9÷40,3	17,1 7,7÷25,9
ЛЕЙКОГРАММА	П	1,0 ² 1,0÷1,0	2,0 ¹ 2,0÷3,0	1,0 0,0÷2,0	2,0 1,0÷3,0	2,0 1,0÷4,0
	С	12,5 ²³⁴⁵ 11,0÷14,0	52,5 ¹ 47,0÷60,0	35,0 ¹⁵ 31,0÷40,0	57,5 ¹ 38,0÷66,0	54,5 ¹³ 45,0÷63,0
	Э	3,0 ⁴ 1,0÷3,0	1,5 0,0÷2,0	2,5 ⁴ 1,0÷5,0	1,0 ¹ 0,0÷1,0	1,0 1,0÷1,0
	Б	0,0 0,0÷0,0	0,0 0,0÷0,0	0,0 0,0÷0,0	0,0 0,0÷0,0	0,0 0,0÷0,0
	М	6,0 5,0÷9,0	8,0 4,0÷10,0	5,5 ⁵ 5,0÷8,0	4,5 4,0÷5,0	3,5 ³ 3,0÷4,0
	Л	79,0 ²³⁴⁵ 77,0÷80,0	36,5 ¹ 35,0÷39,0	50,5 ¹ 39,0÷59,0	35,0 ¹ 22,0÷56,0	39,0 ¹ 30,0÷49,0

Примечания: данные представлены в виде медиан групп и верхних и нижних процентилей; 1–5 — статистически значимые различия ($p < 0,05$) опытных групп (номера групп) по сравнению с указанной группой по критерию Манна–Уитни.

Notes: data are presented as median and upper and lower quartiles; 1–5 — statistically significant difference ($p < 0.05$) compared to group (grouping number), Mann–Whitney test.

номы Ca755 животным активного контроля и опытных групп и затем при курсовом 14-дневном введении ГК-1 в дозе 10 мг/кг, у животных опытной группы было определено достоверное торможение роста опухоли (ТРО) на 9- и 15-е сутки после введения ГК-1 и на 21-е сутки развития опухоли, через 7 дней после окончания введения препарата. При введении ГК-1 в дозе 10 мг/кг ТРО на 21-й день опыта составило 60 %. При введении доксорубина на 2- и 4-е сутки раз-

вития аденокарциномы Ca755 определено значимое торможение роста опухоли (ТРО) на 9-, 15-й и 21-е сутки развития опухоли, на 21-й день опыта ТРО составило 73 % (табл. 1). Введение ГК-1 в дозе 1 мг/кг не вызывало значимого торможения роста опухоли. Анализ выживаемости мышей с аденокарциномой методом Каплана–Мейера представлен на рис. 1, средняя продолжительность жизни — в табл. 2. Согласно полученным данным, увеличение средней

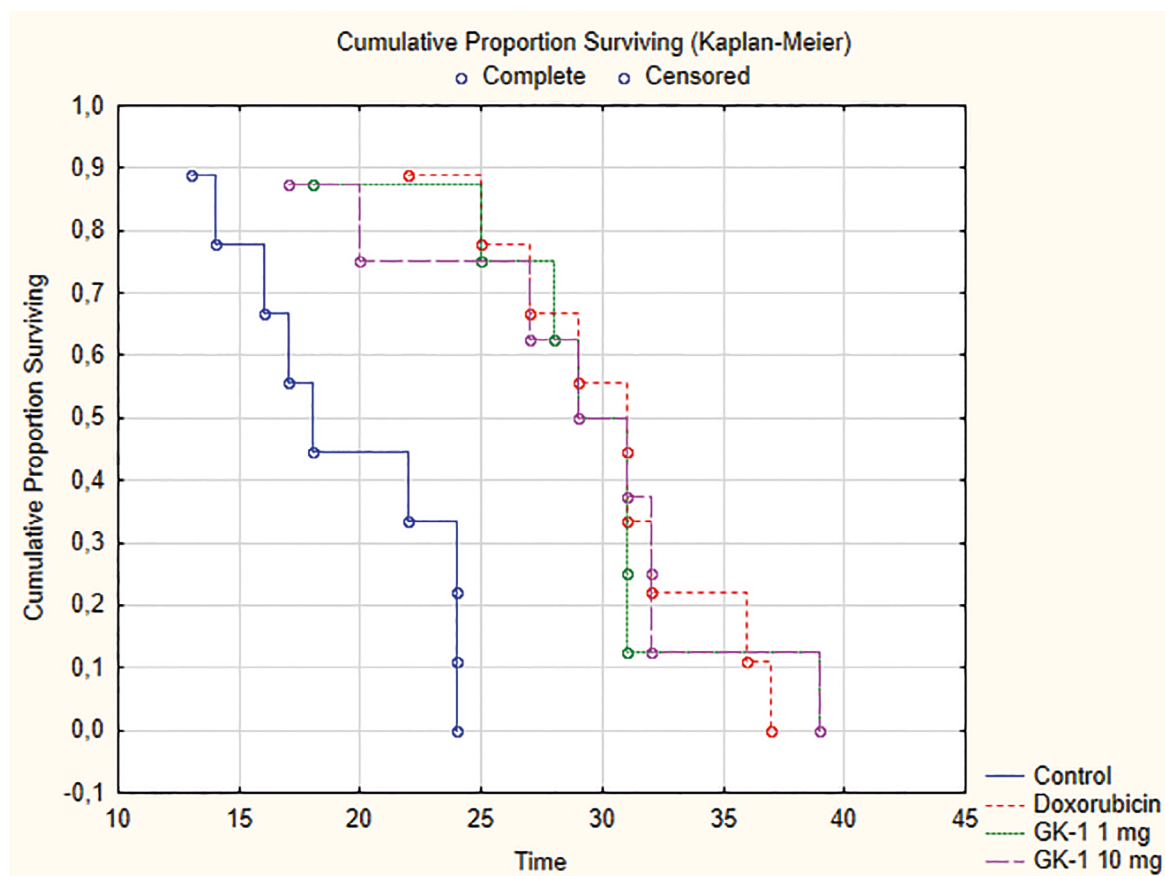


Рис. 1. Влияние доксорубицина и ГК-1 при 14-дневном внутрибрюшинном введении на продолжительность жизни у самок мышей C57BL/6 с аденокарциномой Ca755

Fig. 1. Effect of 14-day administration of GK-1 and double injection of doxorubicin on median lifespan of C57BL/6 female mice with adenocarcinoma Ca755

продолжительности жизни при введении ГК-1 в дозе 1 мг/кг составило 53 %, при введении в дозе 10 мг/кг УПЖ составило 47 %. При введении препарата сравнения доксорубицина УПЖ составило 58 % по сравнению с активным контролем. Медиана выживаемости по методу Каплана–Мейера (рисунок) у животных активного контроля составила 18 дней, при введении доксорубицина — 31 день. При введении ГК-1 в дозе 1 мг/кг медиана выживаемости составила 30 дней, при введении ГК-1 в дозе 10 мг/кг — также 30 дней. Полученные данные указывают на наличие достоверной противоопухолевой активности ГК-1 при его 14-дневном введении в дозе 10 мг/кг и перспективность дальнейшего изучения противоопухолевых свойств ГК-1.

Данные гематологических показателей мышей представлены в табл. 3. Установлено, что во всех экспериментальных группах, кроме 1-й группы интактного контроля, показатели красной крови были ниже их референсных пределов. Диапазон значимых различий с контролем варьировал по количеству эритроцитов от 40 % (2 группа — активный контроль) до 25 % (3 груп-

па — доксорубин), по содержанию гемоглобина от 47 % (2 группа) до 35 % (3 группа). В 4- и 5-й группах, мышам которых вводили ГК-1, данные показатели были ближе по своим значениям к 3-й группе, которой вводили доксорубин. Выявленные групповые различия содержания тромбоцитов не выходили за пределы референсных значений за исключением 5-й группы, где после введения ГК-1 в дозе 10 мг/кг количество тромбоцитов $\approx$ на 40 % выходило за нижние границы нормы и было в 2 раза меньше данного показателя в контроле (1-я группа).

Значимые различия с интактным контролем в содержании лейкоцитов регистрировали в 2 группах ($p < 0,05$): во 2-й группе активного контроля количество лейкоцитов почти в 4 раза превышало интактный показатель, в 4-й группе после введения ГК-1 в дозе 1 мг/кг данный показатель был в 2 раза выше, чем в группе интактного контроля. Следует отметить, что во всех группах, кроме группы активного контроля, лейкоцитарный показатель не выходил за референсные интервалы для данного вида животных. Во всех экспериментальных группах в лейкограмме отмечено

различие с интактным контролем. А именно: число сегментоядерных нейтрофилов было выше контрольного показателя в среднем в 3–4 раза и, соответственно, количество лимфоцитов было в среднем в 2–3 раза ниже, чем в контроле.

Заключение / Conclusion

Ранее при изучении противоопухолевой активности ГК-1 на модели эпидермальной карциномы лёгкого Levis (LLC) было показано, что ГК-1 при введении мышам с LLC обладает выраженной анти-метастатической активностью [15]. Индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) при курсовом в/б введении ГК-1 в дозе 10 мг/кг составил 44,9 %, в дозе 30 мг/кг — 47,7 %. Согласно «Методическим указаниям по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии злокачественных опухолей» [16], соединения, перспективные для апробации в клинике, должны эффективно ингибировать процесс метастазирования перевиваемых опухолей в присутствии первичного опухолевого узла на 35–75 %.

В настоящем исследовании при введении ГК-1 в дозе 10 мг/кг достоверное торможение роста опухоли было определено на 9-, 15- и 21-е сутки развития аденокарциномы Ca755, на 15-е сутки торможение роста опухоли (ТРО) составило 68 %, на 21-е сутки — 60 %.

Согласно данным литературы, гемолитическая анемия встречается более чем в 30 % случаев у онкологических больных до начала противоопухолевой терапии и увеличивается до 70 % при лечении цитостатиками [17]. В нашем предыдущем исследовании

курсовое введение производных 5-оксипиридина совместно с двукратным введением гемцитабина препятствовало развитию анемии у мышей с аденокарциномой Ca755 [18], в связи с этим было изучено влияние ГК-1 на гематологические показатели у мышей-опухоленосителей рака молочной железы. При изучении гематологических показателей было установлено, что во всех экспериментальных группах, кроме группы интактного контроля, показатели красной крови были ниже их референсных значений, что характерно для животных-опухоленосителей. Таким образом, в данной работе не было выявлено улучшение гематологических показателей под влиянием ГК-1.

Увеличение средней продолжительности жизни при введении ГК-1 в дозе 1 мг/кг составило 53 %, при введении в дозе 10 мг/кг УПЖ составило 47 %, разница между ними не была статистически значима. При введении препарата сравнения доксорубицина УПЖ составило 58 % по сравнению с активным контролем. Согласно методическим указаниям по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ [13], соединения нового класса, рекомендуемые для клинического изучения, должны соответствовать одному из критериев эффективности: увеличение продолжительности жизни животных с солидной опухолью на 50 % и более.

Таким образом, при курсовом двухнедельном введении соединения ГК-1 мышам-опухоленосителям аденокарциномы Ca755 в дозе 10 мг/кг определено достоверное торможение роста опухоли и значимое увеличение средней продолжительности жизни по сравнению с активным контролем. Полученные данные указывают на перспективность дальнейшего изучения противоопухолевых свойств соединения ГК-1 на других перевиваемых опухолях мышей и крыс.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Коваленко Лариса Петровна

Автор, ответственный за переписку

д. б. н., в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Россия
e-mail: kovalenko_lp@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2083-0832>
РИНЦ SPIN код: 5185-4250

Larisa P. Kovalenko

Corresponding author

PhD, Dr. Sci. (Biology), Leading researcher of laboratory of Drug Toxicology, Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russia.
e-mail: kovalenko_lp@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2083-0832>
RSCI SPIN code: 5185-4250

Поварнина Полина Юрьевна

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
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>
РИНЦ SPIN-код: 5498-6724

Polina Yu. Povarnina

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
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>
RSCI SPIN code: 5498-6724

Журиков Руслан Владимирович

м. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1084-690X>
РИНЦ SPIN-код: 6648-1794

Ruslan V. Zhurikov

Junior researcher scientist of the department of drug toxicology, Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1084-690X>
RSCI SPIN code: 6648-1794

Алексеева Светлана Витальевна

с. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1262-6997>
РИНЦ SPIN-код: 8985-3418

Svetlana V. Alekseeva

Senior researcher of the laboratory of drug toxicology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1262-6997>
RSCI SPIN code: 8985-3418

Колик Лариса Геннадьевна

д. б. н., профессор РАН, руководитель лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-8058>
РИНЦ SPIN-код: 9126-6922

Larisa G. Kolik

PhD, Dr. Sci. (Biology), Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of laboratory of medicinal toxicology Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-8058>
RSCI SPIN code: 9126-6922

Гудашева Татьяна Александровна

д. б. н., профессор, член-корреспондент РАН, руководитель отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «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

Дурнев Андрей Дмитриевич

д. м. н., профессор, член-корр. РАН, зав. отделом лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>
РИНЦ SPIN-код: 8426-0380

Andrei D. Durnev

Dr. Sci. (Med.), professor, corresponding member RAS, Head of the department of drug toxicology, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>
RSCI SPIN code: 8426-0380

Дорофеев Владимир Львович

д. фарм. н., профессор, и/о генерального директора ФГБНУ «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. Макимбетов Э.К., Салихар Р.И., Туманбаев А.М., и др. Эпидемиология рака в мире. Современные проблемы науки и образования. 2020;2. [Makimbetov EK, Salikhar RI, Tumanbaev AM, et al. Cancer epidemiology. *Modern problems of science and education*. 2020;2. (In Russ.)]. doi: 10.17513/spno.29718.
2. Meldolesi J. Neurotrophin Trk Receptors: New targets for cancer therapy. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2018;174:67-79. doi: 10.1007/112_2017_6.
3. Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, et al. Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem*. 2001;276(21):17864-70. doi: 10.1074/jbc.M010499200.
4. Wu R, Li K, Yuan M, Luo KQ. Nerve growth factor receptor increases the tumor growth and metastatic potential of triple-negative breast cancer cells. *Oncogene*. 2021 Mar;40(12):2165-2181. doi: 10.1038/s41388-021-01691-y.
5. Romon R, Adriaenssens E, Lagadec C, et al. Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways. *Mol Cancer*. 2010 Jun 22;9:157. doi: 10.1186/1476-4598-9-157.
6. Wang W, Li L, Chen N, et al. Nerves in the Tumor Microenvironment: Origin and Effects. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Dec 17;8:601738. doi: 10.3389/fcell.2020.601738.
7. Ferraguti G, Terracina S, Tarani L, et al. Nerve Growth Factor and the Role of Inflammation in Tumor Development. *Curr Issues Mol Biol*. 2024 Jan 23;46(2):965-989. doi: 10.3390/cimb46020062.
8. Demir IE, Tieftrunk E, Schorn S, et al. Nerve growth factor & TrkA as novel therapeutic targets in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Aug;1866(1):37-50. doi: 10.1016/j.bbcan.2016.05.003.
9. Bruno F, Arcuri D, Vozzo F, et al. Expression and Signaling Pathways of Nerve Growth Factor (NGF) and Pro-NGF in Breast Cancer: A Systematic Review. *Curr Oncol*. 2022 Oct 27;29(11):8103-8120. doi: 10.3390/curroncol29110640.
10. Trouvilliez S, Lagadec C, Toillon RA. TrkA Co-Receptors: The Janus Face of TrkA? *Cancers (Basel)*. 2023;15(7):1943. doi: 10.3390/cancers15071943.
11. Lee HJ, Moon Y, Choi J, et al. Characterization of KRC-108 as a TrkA Kinase Inhibitor with Anti-Tumor Effects. *Biomol Ther (Seoul)*. 2022 Jul 1;30(4):360-367. doi: 10.4062/biomolther.2021.195.
12. Gudasheva TA, Antipova TA, Seredenin SB. Novel low-molecular-weight mimetics of the nerve growth factor. *Dokl Biochem Biophys*. 2010 Sep-Oct;434:262-5. doi: 10.1134/S160767291005011X.
13. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. Руководство по проведению

доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. — С. 642-656. [Treschalina EM, Zhukova OS, Gerasimova GK et al. Methodical recommendations for the preclinical study of the antitumor activity of drugs. In the book: Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. Ed by AN Mironov. Moscow: Grif i K, 2012. P. 642-656. (In Russ.)].

14. Jager KJ, van Dijk PC, Zoccali C, Dekker FW. The analysis of survival data: the Kaplan-Meier method. *Kidney Int*. 2008 Sep;74(5):560-5. doi: 10.1038/ki.2008.217.

15. Коваленко Л.П., Журиков Р.В., Поварнина П.Ю., Тарасюк А.В. Влияние дипептидного миметика 4-й петли NGF ГК-1 на рост опухоли и метастазирование эпидермоидной карциномы лёгкого Lewis у самцов мышей линии C57BL/6. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2023;(1):45-50. [Kovalenko LP, Zhurikov RV, Povarnina PYu, Tarasiuk AV. Effect of GK-1 NGF Loop 4 Dipeptide Mimetic on tumor growth and metastasis of Lewis lung carcinoma in experiment on male C57BL/6 mice. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(1):45-50. (In Russ.)]. doi: 10.37489/2587-7836-2023-1-45-50.

16. Зуева Е.П., Козлов А.М., Герасимова Г.К., и др. Методическим указаниям по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии злокачественных опухолей. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / ред. Р.У. Хабриев — М.: 2005. — С. 674-682. [Zueva EP, Kozlov AM, Gerasimova GK, et al. Methodical recommendations for the preclinical study of substances capable of enhancing antitumor activity of chemotherapy and inhibiting metastases. In the book: Guidelines for conducting preclinical studies of new pharmacological substances. Ed by Khabriev RU. Moscow: Medicine; 2005. P. 642-656. (In Russ.)].

17. Madeddu C, Gramignano G, Astara G, et al. Pathogenesis and Treatment Options of Cancer Related Anemia: Perspective for a Targeted Mechanism-Based Approach. *Front Physiol*. 2018 Sep 20;9:1294. doi: 10.3389/fphys.2018.01294.

18. Журиков Р.В., Коваленко Л.П., Алексеева С.В., и др. Влияние производных 5-оксипиримидина на противоопухолевый эффект гемцитабина, гематологические показатели и продолжительность жизни у мышей с аденокарциномой Ca755. *Вопросы Онкологии*. 2023;69(2):238-245. [Zhurikov RV, Kovalenko LP, Alexeeva SV, et al. The effect of 5-hydroxypyrimidine derivatives on the antitumor effect of gemcitabine, hematological parameters, and survival of mice with adenocarcinoma Ca755. *Voprosi Onkologii*. 2023; 69(2):238-245. (In Russ.)]. doi: 10.37469/0507-3758-2023-69-2-238-245.



Влияние цикло-L-пролилглицина на пороги болевой реакции и морфин-индуцированную анальгезию у инбредных мышей линий BALB/c и C57Bl/6

Надорова А. В., Колясникова К. Н., Чернякова И. В., Колик Л. Г.

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

Аннотация

Актуальность. Цикло-L-пролилглицин (ЦПГ), обнаруженный как эндогенное соединение в ЦНС, вовлечён в формирование реакции на эмоционально-стрессовое воздействие у животных с выраженной реакцией страха и обладает анальгетическим действием в опытах *in vivo*, однако данные о зависимости антиноцицептивного действия ЦПГ от генотипа в настоящее время отсутствуют.

Цель работы — оценить влияние экзогенного ЦПГ на пороги острой болевой реакции и вызываемую морфином анальгезию у мышей с противоположной реакцией на эмоциональный стресс.

Методы. Эксперименты выполнены на инбредных мышах-самцах линий BALB/c ($n = 207$) и C57Bl/6 ($n = 204$). Для оценки анальгетического действия ЦПГ использовали тест «уксусные корчи» (0,75 % раствор уксусной кислоты, в/б) и тест «горячая пластина» ($55 \pm 0,5$ °C).

Результаты. ЦПГ в дозах 1, 2 и 4 мг/кг, в/б, статистически значимо снижал количество корчей у мышей BALB/c и C57Bl/6, при этом действие ЦПГ было сопоставимо с эффектом диклофенака в дозе 10 мг/кг, в/ж. При термической стимуляции выявлены межлинейные различия в антиноцицептивном действии ЦПГ, которое в максимально эффективной дозе 2 мг/кг было более выраженным у «стресс-неустойчивых» мышей BALB/c по сравнению с мышами C57Bl/6. ЦПГ в дозе 2 мг/кг ослаблял морфин-индуцированную анальгезию при термической стимуляции у мышей BALB/c и C57Bl/6 на 30, 60 и 90 мин наблюдения.

Заключение. Установленная зависимость центрального антиноцицептивного эффекта ЦПГ от генотипа имеет важное значение в контексте биомедицинских исследований выявления боли и обеспечения контроля над ней с помощью фармакологических корректоров.

Ключевые слова: цикло-L-пролилглицин; болевая реакция; морфин; анальгезия; мыши BALB/c и C57Bl/6

Для цитирования:

Надорова А. В., Колясникова К. Н., Чернякова И. В., Колик Л. Г. Влияние цикло-L-пролилглицина на пороги болевой реакции и морфин-индуцированную анальгезию у инбредных мышей линий BALB/c и C57Bl/6. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(3):57-66. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-3-57-66>. EDN: LOMGYE

Поступила: 20.08.2024. В доработанном виде: 20.09.2024. Принята к печати: 27.09.2024. Опубликовано: 30.09.2024.

Effect of cyclo-L-prolylglycine on pain response thresholds and morphine-induced analgesia in inbred BALB/c and C57Bl/6 mice

Anna V. Nadorova, Ksenia N. Koliasnikova, Irina V. Chernyakova, Larisa G. Kolik

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

Abstract

Relevance. Cyclo-L-prolylglycine (CPG), discovered as an endogenous compound in the central nervous system, is involved in the formation of a reaction to emotional stress in rodents with a pronounced fear reaction and has an analgesic effect *in vivo*. However, data on the dependence of the antinociceptive effect of CPG on genotype are currently unavailable.

Objective. To evaluate the effect of exogenous CPG on the thresholds of acute pain response and morphine-induced analgesia in mice with an opposite reaction to emotional stress.

Methods. The experiments were performed on inbred male mice BALB/c ($n = 207$) and C57Bl/6 ($n = 204$). To assess the analgesic effect of CPG, the "writhing test" (0.75 % acetic acid solution, i.p.) and the "hot plate" (55 ± 0.5 °C).

Results. CPG at doses of 1, 2, and 4 mg/kg, i.p., significantly reduced the number of writhings in BALB/c and C57Bl/6 mice, whereas the effect of CPG was comparable to that of diclofenac at a dose of 10 mg/kg per os. During thermal stimulation, interline differences in the antinociceptive effect of CPG were revealed, which was more pronounced at a maximum effective dose of 2 mg/kg in "stress-non-resistant" BALB/c mice compared with C57Bl/6 mice. CPG at a dose of 2 mg/kg weakened morphine-induced analgesia during thermal stimulation in BALB/c and C57Bl/6 mice for 30, 60, and 90 minutes of observation.

Conclusion. The established dependence of the central antinociceptive effect of CPGs on genotype is important in the context of biomedical research on pain detection and control using pharmacological correctors.

Keywords: cyclo-L-prolylglycine; pain response; morphine; analgesia; BALB/c and C57Bl/6 mice

For citations:

Nadorova AV, Koliasnikova KN, Chernyakova IV, Kolik LG. Effect of cyclo-L-prolylglycine on pain response thresholds and morphine-induced analgesia in inbred BALB/c and C57Bl/6 mice. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(3):57-66. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-3-57-66>. EDN: LOMGYE

Received: 20.08.2024. Revision received: 20.09.2024. Accepted: 27.09.2024. Published: 30.09.2024.

Введение / Introduction

Согласно клиническим исследованиям, пациенты нередко проявляют разную чувствительность к боли, включая неодинаковые реакции на сходные травмы или патологические состояния, что подтверждается многочисленными данными об общих генетических факторах, лежащие в основе фенотипов боли [1–4], и предполагает наличие зависимости отдельных компонентов болевой реакции от генетических вариаций.

Под острой ноцицепцией обычно понимают передачу ноцицептивных сигналов от периферических нервных окончаний (ноцицепторов) к ЦНС, сообщаящую о наличии, типе, локализации и величине ноцицептивного раздражителя [5, 6], и имеет решающее значение для выживания, поскольку предупреждает о возможном повреждении тканей. Доступная литература указывает на важность генотипа в опосредовании базальной ноцицептивной реакции и определении чувствительности к фармакологическим препаратам у лабораторных животных [7, 8]. В работе *Mogil JS et al.* охарактеризована генетическая изменчивость ноцицепции у домового мыши (*Mus musculus*). Авторы протестировали 11 инбредных линий мышей (129/J, A/J, AKR/J, BALB/cJ, C3H/HeJ, C57BL/6J, C58/J, CBA/J, DBA/2J, RIIS/J и SM/J), используя 12 общепринятых методов оценки ноцицептивной реакции, которые показали наличие межлинейных различий в каждом тесте и наследуемость от умеренной до высокой ($h^2 = 0,30 - 0,76$) [7]. Последующие исследования, расширив число используемых тестов ноцицептивной реакции, в конечном итоге выявили 5 основных «кластеров» или «типов» ноцицепции и обработки боли, включая базовые значения термической ноцицепции, спонтанной реакции на химические раздражители, термической гиперчувствительности, механической гиперчувствительности и афферентно-зависимой гиперчувствительности [9, 10]. Аналогичным образом, исследования инбредных мышей выявили различия в чувствительности к анальгетическим средствам [11]. Учитывая значительные межлинейные отличия в ответ на стимуляцию ноцицепторов [12], можно было бы предположить, что наиболее чувствительные к боли мыши должны быть менее чувствительны к обезболивающим средствам, однако результаты исследования продемонстрировали противоположный эффект [13]. Линии мышей, которые имели более низкий болевой порог, оказались менее чувствительны к морфину, а линии мышей с высоким болевым порогом продемонстрировали большую чувствительность к обезболивающему действию морфина [13, 14], что подтверждает роль генотипа в различной чувствительности к боли и/или антиноцицепции [14].

Повышенная чувствительность к острой боли считается фактором риска развития хронической боли [15, 16], поэтому понимание и учёт генетического компонента, опосредующего биологическую природу

термической и химической болевой чувствительности, крайне важно, в том числе при поиске новых обезболивающих средств для формирования персонализированного подхода к фармакологической коррекции боли разного происхождения.

Сконструированный в начале 90-х годов предполагаемый пептидный прообраз пиретама — цикло-L-пролилглицин (ЦПГ) [17] впоследствии был обнаружен как эндогенное соединение в головном мозге крыс [18]. Согласно результатам исследований *in vivo*, ЦПГ вовлечён в формирование реакции на эмоционально-стрессовое воздействие у животных с выраженной реакцией страха [19], при этом проявление антигипоксических, нейропротективных и антидепрессантоподобных эффектов ЦПГ регистрируется в большей степени у «стресс-неустойчивых» мышей BALB/c, характеризующихся низким содержанием эндогенного ЦПГ в целом мозге и его структурах по сравнению со «стресс-устойчивыми» мышами C57Bl/6 [20, 21].

При изучении спектра фармакологической активности ЦПГ в работе *Ferro JN et al.* впервые было показано, что ЦПГ при системном введении обладает анальгетическим действием *per se* при стимуляции ноцицепторов у мышей [22], однако данные о зависимости антиноцицептивного действия ЦПГ от генотипа в настоящее время отсутствуют.

Цель / Objective — оценить влияние ЦПГ на пороги болевой реакции при химической и термической стимуляции, а также на вызываемую морфином анальгезию у инбредных мышей BALB/c и C57Bl/6.

Материалы и методы/ Materials and methods

Животные / Animals. Эксперименты выполнены на инбредных мышах-самцах линий BALB/c ($n = 207$) и C57Bl/6 ($n = 204$) с массой тела 20–24 г (филиал «Столбовая» ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»). Животных содержали по 15 особей в клетке в условиях вивария ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (температура 21–23 °C, относительная влажность воздуха 40–60 %) при естественной освещённости и свободном доступе к воде и брикетированному корму в течение 10 суток до начала тестирования. Проведение экспериментов одобрено комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (протокол № 10 от 10.06.24 г.).

Препараты / Medication. Цикло-L-пролилглицин синтезирован в лаборатории пептидных биорегуляторов ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», как описано ранее [23], т. пл. 204–207 °C, $[\alpha]_D^{20} -202^\circ$

(с 1, вода). ЦПГ в дозе 1, 2 и 4 мг/кг (внутрибрюшинно, в/б), морфина гидрохлорид (Минмедбиопроект объединение «Чимкентбиофарм», субстанция) в дозе 3 мг/кг (подкожно, п/к) и диклофенак 10 мг/кг (внутрижелудочно, в/ж) растворяли в воде для инъекций и вводили из расчёта 0,1 мл/10 г массы животного согласно схеме эксперимента. Для моделирования висцеральной боли использовали 0,75 % раствор уксусной кислоты. Контролем служили животные, получавшие воду для инъекций (ОАО «Дальхимфарм», ампулы по 5 мл) в эквивалентном объёме.

Тест «уксусные корчи» предназначен для выявления острой висцеральной и соматической боли с помощью введения 0,75 % раствора уксусной кислоты в объёме 10 мл/кг, в/б. Болевую реакцию «корчи» оценивали в течение 15 минут по количеству лордозов (специфических движений животных — чередующихся сокращений и расслаблений брюшных мышц с характерным выгибанием спины). Данные представлены в виде количества лордозов и относительных единиц — выраженности эффектов относительно контроля в процентах.

Для теста «уксусные корчи» использовали схему эксперимента:

- «Контроль, в/ж» — вода для инъекций, в/ж + через 60 минут 0,75 % уксусная кислота, в/б;
- «Диклофенак 10» — диклофенак в дозе 10 мг/кг, в/ж + через 60 минут 0,75 % уксусная кислота, в/б;
- «Контроль, в/б» — вода для инъекций, в/б + через 30 минут 0,75 % уксусная кислота, в/б;
- «ЦПГ 1» — ЦПГ в дозе 1 мг/кг, в/б + через 30 минут 0,75 % уксусная кислота, в/б;
- «ЦПГ 2» — ЦПГ в дозе 2 мг/кг, в/б + через 30 минут 0,75 % уксусная кислота, в/б;
- «ЦПГ 4» — ЦПГ в дозе 4 мг/кг, в/б + через 30 минут 0,75 % уксусная кислота, в/б.

Тест «горячая пластина» используется для оценки реакции мелких лабораторных животных при термическом раздражении ноцицепторов. С помощью анальгезиметра «Ugo Basile» (Италия) регистрировали латентное время реакции (лизание, отдергивание лапы или прыжок). До начала опыта отбирали животных на основе базовой реактивности в условиях экспериментальной модели, исключая мышей, остававшихся на нагретой до $55 \pm 0,5$ °C пластине дольше 16 секунд (для BALB/c) и 10 секунд (для C57Bl/6). Латентный период в 30 с (максимальное время экспозиции) расценивали как 100 % анальгезию. Фиксировали время появления реакции у мышей через 30, 60, 90 и 120 мин после введения изучаемых препаратов. Для выявления морфин-индуцированной анальгезии использовали схему:

- «Контроль» — вода для инъекций + через 30 минут вода для инъекций;
- «Морфин» — вода для инъекций + через 30 минут раствор морфина;
- «ЦПГ» — ЦПГ 2 или 4 мг/кг + через 30 минут вода для инъекций;

— «ЦПГ + Морфин» — ЦПГ 2 или 4 мг/кг + через 30 минут раствор морфина.

Полученные результаты представлены в виде максимального возможного эффекта (МВЭ) в процентах. МВЭ, %, равен разнице между латентным периодом реакции после введения препарата (Т опытный, с) и фоновым латентным периодом реакции (Т фоновый, с) делёной на максимальное время экспозиции (30 с) минус фоновый латентный период реакции (Т фоновый, с) и умноженное на 100 %:

$$\text{МВЭ, \%} = (\text{Т опытный, с} - \text{Т фоновый, с}) / (30 \text{ с} - \text{Т фоновый, с}) \times 100 \%$$

Выраженность МВЭ относительно контроля (%) рассчитывали по формуле:

$$\text{Выраженность МВЭ относительно контроля, \%} = (\text{Опытное значение (МВЭ, \% + 100)}) / (\text{Среднее значение контроля (МВЭ, \% + 100)}) \times 100 \%,$$

где 100 — коэффициент нормализации данных.

Статистический анализ / Statistical analysis проводили при помощи t-критерия Стьюдента и анализа ANOVA с последующим применением критерия Дункана. Критический уровень значимости $\alpha = 0,05$. Данные представлены в виде М — средних значений и SEM — ошибки среднего значения ($M \pm \text{SEM}$).

Результаты / Results

На первом этапе исследования показаны межлинейные различия между мышами инбредных линий BALB/c и C57Bl/6 (рис. 1А) в тесте «уксусные корчи», поскольку количество лордозов при химическом раздражении у мышей BALB/c оказалось ниже ($13,2 \pm 1,1$), чем у мышей C57Bl/6 ($17,7 \pm 1,3$), что согласуется с данными литературы [7]. ЦПГ в дозах 1, 2 и 4 мг/кг статистически значимо снижал количество корчей у мышей BALB/c и C57Bl/6 (рис. 1Б), при этом действие ЦПГ в спектре изученных доз было сопоставимо с эффектом диклофенака в дозе 10 мг/кг (рис. 1Б).

Также зарегистрированы базовые межлинейные различия в латентном периоде реакции у мышей BALB/c ($13,3 \pm 0,5$) и C57Bl/6 ($8,0 \pm 0,2$) в тесте «горячая пластина» (рис. 2А), что также не противоречит данным литературы о более низком пороге ноцицептивной реакции у мышей C57Bl/6 [7]. Из-за повышенных порогов болевой реакции на термическое раздражение при первом предъявлении нагретой пластины (фоновые значения) у мышей BALB/c существенно изменился расчётный показатель МВЭ (%), что отразилось на динамике изменения реакции при повторных предъявлениях теплового раздражителя (рис. 2Б).

В тесте «горячая пластина» установлен эффект ЦПГ в дозе 2 мг/кг на протяжении всего времени наблюдения (с 30 по 120 минуту) как у мышей BALB/c, так и у C57Bl/6 (рис. 3А). Эффект ЦПГ в дозе 4 мг/кг

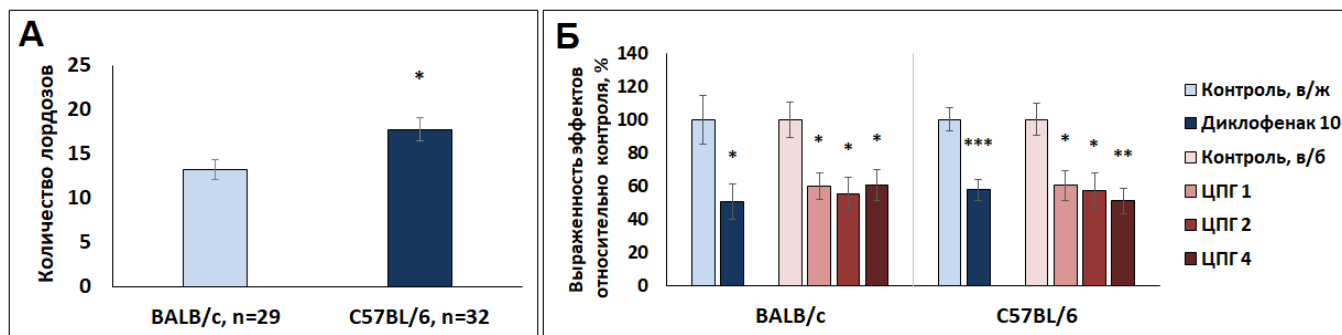


Рис. 1. Межлинейные различия реакции на химическое раздражение (количество лордозов) (А) и эффекты ЦПГ в дозах 1, 2 и 4 мг/кг (Б) в тесте «Укусные корчи» у инбредных мышей BALB/c и C57BL/6. М±SEM

Fig. 1. Strain differences in the response to chemical irritation (number of writhings) (A) and the effects of CPG at doses of 1, 2 and 4 mg/kg (B) in «writhing test» in inbred BALB/c and C57BL/6 mice. M±SEM

Примечания: А. * — $p < 0,05$ — статистически значимо по отношению к группе «BALB/c», согласно критерию Стьюдента. Б. По оси ординат — выраженность эффектов относительно соответствующего контроля, %; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ — статистически значимо по отношению к соответствующему контролю, согласно критерию Дункана. Число животных в группах $n = 10-20$.

Notes: А. * — $p < 0.05$ — statistically significant in relation to the BALB/c group according to Student's t-test. B. The ordinate axis shows the severity of effects relative to the corresponding control, %; * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$ — statistically significant in relation to the corresponding control according to Duncan's test. The number of animals in groups $n = 10-20$.

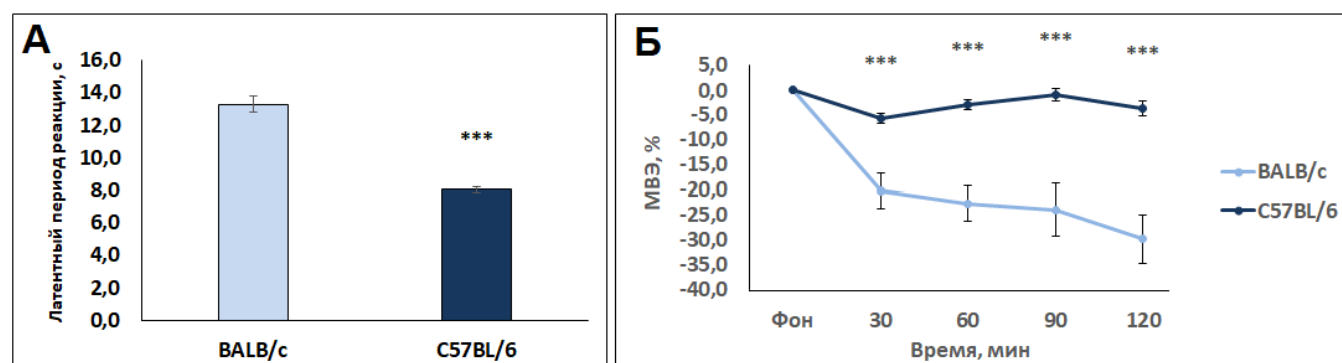


Рис. 2. Межлинейные различия латентного периода при термическом раздражении ноцицепторов при первой посадке в установку (А) и динамики изменения реакции (Б) у инбредных мышей BALB/c и C57BL/6 в тесте «горячая пластина». М±SEM

Fig. 2. Strain differences in the latent period during thermal stimulation of nociceptors during the first landing in the setup (A) and the dynamics of response changes (B) in inbred BALB/c and C57BL/6 mice in the «hot plate» test. M±SEM

Примечания: А. По оси ординат — латентный период реакции (фоновые значения) в секундах; *** — $p < 0,001$ — статистически значимо по отношению к группе «BALB/c», согласно критерию Стьюдента. Б. По оси абсцисс — время развития эффекта (мин); по оси ординат — максимально возможный эффект (МВЭ), %; *** — $p < 0,001$ — статистически значимо по отношению к группе «BALB/c», согласно критерию Стьюдента; число животных в группах $n = 30-33$.

Notes: А. The ordinate axis shows the latent period of the response (background values) in seconds; *** — $p < 0.001$ — statistically significant in relation to the BALB/c group according to Student's t-test. B. The abscissa axis shows the time of effect development (min); the ordinate axis shows the maximum possible effect (MPE), %; *** — $p < 0.001$ — statistically significant in relation to the BALB/c group according to Student's t-test; the number of animals in groups $n = 30-33$.

регистрировали через 30 мин после введения у BALB/c, а у C57BL/6 в дозах 1 и 4 мг/кг — через 120 мин после введения (рис. 3А). При межлинейном сравнении максимально возможных эффектов ЦПГ относительно соответствующего контроля (%) установлено, что выраженность эффекта ЦПГ в максимально эффективной дозе 2 мг/кг существенно выше у BALB/c по сравнению с C57BL/6 на 30-, 60- и 120-й минуте наблюдений (рис. 3Б).

На следующем этапе исследования при изучении влияния ЦПГ (2 и 4 мг/кг, в/б) на вызываемую морфином анальгезию в тесте «горячая пластина» установлено, что ЦПГ в эффективной дозе 2 мг/кг препятствовал реализации действия морфина у мышей BALB/c и C57BL/6 на 30-, 60- и 90-й минуты наблюдения (рис. 4А), однако с увеличением дозы до 4 мг/кг ЦПГ не влиял на обезболивающее действие морфина (рис. 4Б). Следует подчеркнуть, что влияние ЦПГ на

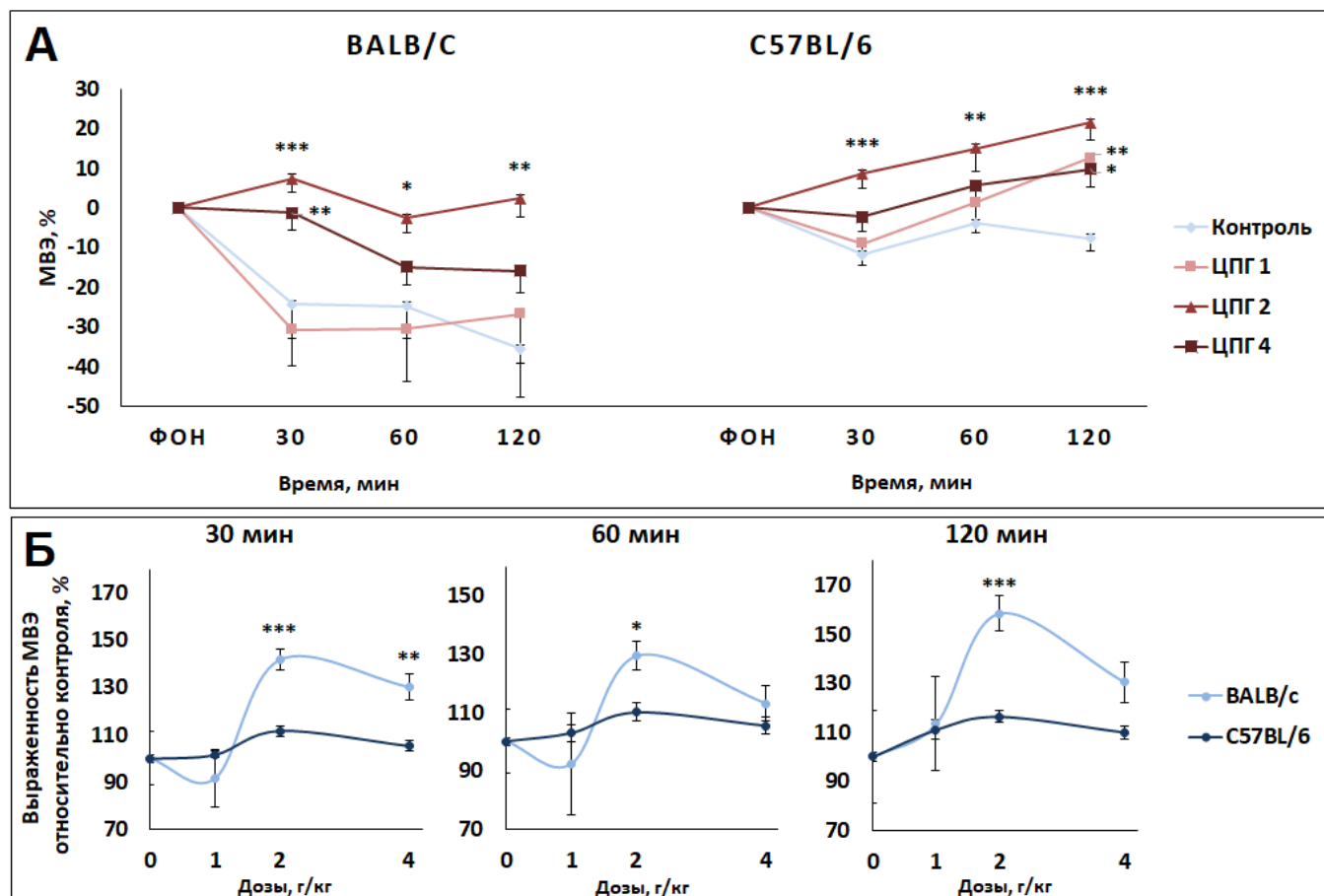


Рис. 3. Влияние ЦПГ в дозах 1, 2 и 4 мг/кг на ноцицептивную реакцию инбредных мышей BALB/c и C57Bl/6 (А) и межлинейные различия по степени выраженности эффекта (Б) в тесте «горячая пластина». М±SEM

Fig. 3. Effect of CPG at doses of 1, 2 and 4 mg/kg on the nociceptive response of inbred BALB/c and C57Bl/6 mice (A) and strain differences in the degree of effect expression (B) in the «hot plate» test. M±SEM

Примечания: А. По оси абсцисс — время развития эффекта (мин); по оси ординат — максимально возможный эффект (МВЭ), %; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ — статистически значимо по отношению к соответствующей точке «Контроля», согласно критерию Дункана. Б. По оси абсцисс — дозы (г/кг); по оси ординат — выраженность максимально возможного эффекта (МВЭ) относительно соответствующего контроля, %; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ — статистически значимо по отношению к «C57Bl/6», согласно критерию t-Стьюдента. Число животных в группах $n = 10-23$.

Notes: A. Abscissa axis — effect development time (min); ordinate axis — maximum possible effect (MPE), %; * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$ — statistically significant in relation to the corresponding point of the "Control" according to the Duncan criterion. B. Abscissa axis — doses (g/kg); ordinate axis — expression of the maximum possible effect (MPE) relative to the corresponding control, %; * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$ — statistically significant in relation to "C57Bl/6" according to Student's t-test. Number of animals in groups $n = 10-23$.

ослабление морфин-индуцированной анальгезии у BALB/c и C57Bl/6 не зависело от генотипа мышей.

Обсуждение / Discussion

Учитывая многообразие нейрохимических механизмов, участвующих в проявлении висцеральной и соматической боли, исследования в области поиска новых средств для купирования боли и комбинированной терапии остаются актуальными. Инбредные мыши C57Bl/6J и BALB/c наиболее часто используются в биомедицинских исследованиях [24, 25], поскольку генетические факторы, наряду с воздействием

факторов окружающей среды, способствуют значительным индивидуальным различиям в поведении и, как следствие, различным реакциям на болевое и фармакологическое воздействие [26].

Висцеральная боль представляет собой один из наиболее распространенных видов боли в клинической практике, для которой характерна выраженная гипералгезия [27]. Внутривисцеральное введение уксусной кислоты можно рассматривать в качестве модели тонической сомато-висцеральной боли, поскольку вызываемые абдоминальные сокращения представляют собой смешанную модель, подобную острому перитониту, который активирует висцеральные и

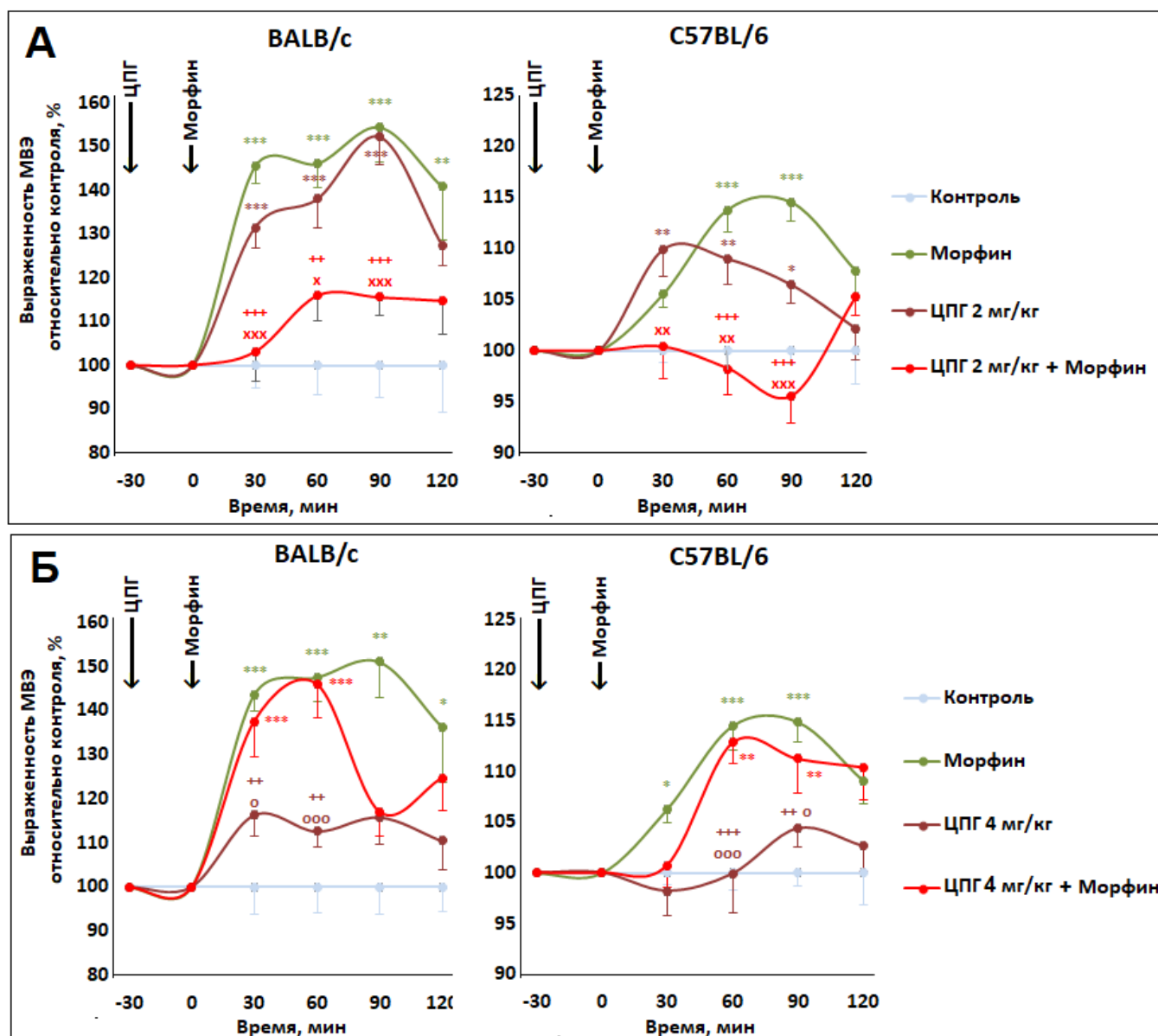


Рис. 4. Влияние ЦПГ в дозах 2 мг/кг (А) и 4 мг/кг (Б) на морфин-индуцированную анальгезию при термическом раздражении ноцицепторов у инбредных мышей BALB/c и C57Bl/6 в тесте «горячая пластина». $M \pm SEM$

Fig. 4. Effect of CPG at doses of 2 mg/kg (A) and 4 mg/kg (B) on morphine-induced analgesia during thermal stimulation of nociceptors in inbred BALB/c and C57Bl/6 mice in the «hot plate» test. $M \pm SEM$

Примечания: По оси абсцисс — время развития эффекта (мин); по оси ординат — выраженность максимально возможного эффекта (МВЭ) относительно контроля, %; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ — статистически значимо по отношению к соответствующей точке «Контроля»; ++ — $p < 0,01$; +++ — $p < 0,001$ — статистически значимо по отношению к соответствующей точке «Морфина»; x — $p < 0,05$; xx — $p < 0,01$; xxx — $p < 0,001$ — статистически значимо по отношению к соответствующей точке «ЦПГ»; o — $p < 0,05$; ooo — $p < 0,001$ — статистически значимо по отношению к соответствующей точке «ЦПГ + Морфин» согласно критерию Дункана; число животных в группах $n = 10$.

Notes: The abscissa axis shows the time of effect development (min); the ordinate axis shows the expression of the maximum possible effect (MPE) relative to the control, %; * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$ — statistically significant in relation to the corresponding point of "Control"; ++ — $p < 0.01$; +++ — $p < 0.001$ — statistically significant in relation to the corresponding point of "Morphine"; x — $p < 0.05$; xx — $p < 0.01$; xxx — $p < 0.001$ — statistically significant in relation to the corresponding point of "CPG"; o — $p < 0.05$; ooo — $p < 0.001$ — statistically significant in relation to the corresponding point of "CPG + Morphine" according to Duncan's criterion; the number of animals in groups $n = 10$.

соматические ноцицепторы брюшины [28, 29] и способствует развитию воспаления в мышечной стенке. Реакция «уксусные корчи» широко используется для оценки и сравнения эффективности новых биологически активных веществ и лекарственных средств с анальгетическим действием [28, 30, 31] и считается простой и валидной моделью клинически значимой боли, позволяющей предсказать реакцию человека. Полученные результаты подтвердили опубликованные ранее данные о способности ЦПГ ослаблять ноцицептивное поведение у мышей на модели тонической висцеральной боли [22]. В работе *Ferro JN et al.* антиноцицептивный эффект ЦПГ в тесте «уксусные корчи» регистрировали у аутбредных мышей Swiss в течение 6 ч после введения [22]. Межлинейных различий в проявлении анальгетического действия ЦПГ, сопоставимого с эффективностью диклофенака натрия, зарегистрировано не было. Учитывая тот факт, что ЦПГ при системном введении значительно подавлял нейрогенную и воспалительные фазы боли, вызванной формалином [22], нельзя исключить потенциальную возможность применения *cyclo-Gly-Pro* и/или его аналогов для ослабления ноцицепции и повреждения, вызванного воспалением.

В настоящей работе впервые показано, что при термической стимуляции анальгетический эффект ЦПГ на супраспинальном уровне (тест «горячая пластина») в зависимости от дозы манере более ярко проявлялся у «стресс-неустойчивых» мышей BALB/c. В исследованиях *Васильевой Е.В. и соавт.* особенность реализации психотропных эффектов ЦПГ у мышей BALB/c и C57Bl/6 показана в зависимости от продолжительности введения циклического дипептида [32]. Более высокая чувствительность мышей BALB/c к антидепрессивному эффекту ЦПГ в дозе 1 мг/кг развивалась через 2 недели, тогда как у мышей C57Bl/6 формирование антидепрессивноподобного поведения отмечали лишь к концу 4-й недели [32]. Анализ поведенческих реакций впервые позволил выявить разную чувствительность инбредных мышей BALB/c и C57Bl/6 к антиноцицептивному действию ЦПГ при однократном введении.

Исследования комбинаций морфина с другими анальгетическими средствами направлены на то, чтобы обеспечить возможность использования более низких доз опиоидов, которые позволили бы преодолеть нежелательные побочные эффекты [33]. При комбинированной терапии каждый компонент может оказывать независимое действие, эффекты которого являются взаимодополняющими, или компоненты могут взаимодействовать, оказывая более сильный или более слабый обезболивающий эффект (синергизм или антагонизм, соответственно) [33]. При оценке влияния ЦПГ на морфин-индуцированную анальгезию при термической стимуляции получен неожиданный результат, свидетельствующий о «налоксоно-подобной» активности ЦПГ, значительно

ослабляющего вызываемую морфином анальгезию у мышей BALB/c и C57Bl/6 вне зависимости от генотипа на супраспинальном уровне. Особенно интригующими выглядят полученные результаты взаимодействия ЦПГ с морфином на фоне опубликованных данных, согласно которым увеличение латентного периода реакции в тесте «горячая пластина», обусловленное действием ЦПГ, блокировалось антагонистом опиоидных рецепторов налоксоном [22].

С другой стороны, экспериментально доказано, что ЦПГ оказывал положительное модулирующее действие на глутаматные α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA-рецепторы) [34]. По данным радиолигандного анализа *in vitro* ЦПГ не влиял на специфическое связывание меченых лигандов серотониновых 5-HT_{2A}-, NMDA-, метаботропных глутаматных mGluR-, ГАМКА- и ГАМКВ-рецепторов в мозге мышей BALB/c [21], что не исключает вовлечённость 4 AMPA-рецепторов при формировании антиноцицептивной реакции под действием ЦПГ.

Ампакины, которые связываются с аллостерическим участком AMPA-рецепторов, потенцируют функционирование уже активированных AMPA-рецепторов, что позволяет им как положительным модуляторам рецепторов усиливать эндогенные функции AMPA-рецепторов в определённых областях мозга. Неоднократно описаны способности ампакинов ослаблять болевую реакцию [35–37]. *Sun Y et al.* установили, что при введении в *префронтальную кору* ампакин CX546 оказывал синергическое действие на морфин-индуцированную анальгезию у крыс [38], что позволило авторам предположить взаимодополняющий и аддитивный анальгетический эффект при совместном использовании ампакинов и опиоидов. Другое соединение LCX001 также оказывало положительное модулирующее воздействие на функцию, опосредованную AMPA-рецепторами, при этом LCX001 с анальгетической активностью *per se* не оказывал влияния на обезболивающий эффект морфина (2,5 мг/кг, п/к) в тесте «горячая пластина», значительно увеличивал экспрессию субъединиц GluA2(R) и сдерживал вызванную опиоидами аномальную внутриклеточную нагрузку Ca^{2+} [39].

Ограничение исследования / Limitation of the study

Работа выполнена только на половозрелых мышаксамцах одного возраста 3 мес. Необходимо проведение дополнительного изучения антиноцицептивной активности ЦПГ с учётом половых и возрастных различий, а также при иных режимах термической стимуляции в тесте «горячая пластина». Взаимодействие ЦПГ и морфина показано только при предварительном введении циклического дипептида (одна схема введения).

Заключение / Conclusion

В целом, анализ данных литературы и собственные исследования указывает на то, что передача сигналов АМРА-рецептором влияет на формирование проноцицептивных и/или антиноцицептивных реакций. Ампакины, усиливающие передачу сигналов глутамата через АМРА-рецепторы, являются эффективными анальгетиками, нейроанатомический субстрат действия которых располагается в головном мозге

[35, 38]. Установленная зависимость собственного антиноцицептивного эффекта ЦПГ на супраспинальном уровне от генотипа имеет важное значение в контексте биомедицинских исследований выявления боли и обеспечения контроля над ней с помощью фармакологических корректоров у лабораторных животных. Выявленный феномен влияния ЦПГ на морфин-индуцированную анальгезию вне зависимости от генотипа требует дополнительных исследований.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

Надорова А. В. — выполнение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов, написание текста; *Колясникова К. Н.* — выполнение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов; *Чернякова И. В.* — выполнение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов; *Колик Л. Г.* — постановка задачи, написание текста, редактирование, финальное утверждение.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

Authors' participation

Nadorova AV — performing experimental work, analyzing and interpreting results, writing text; *Koliasnikova KN* — performing experimental work, analyzing and interpreting results; *Chernyakova IV* — performing experimental work, analyzing and interpreting results; *Kolik LG* — problem statement, writing text, editing, final approval.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Надорова Анна Владимировна

Автор, ответственный за переписку

н. с. лаборатории лекарственной токсикологии
ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация
e-mail: nadorova_av@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0463-2190>

Anna V. Nadorova

Corresponding author

Researcher at the Laboratory of Medicinal Toxicology Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
e-mail: nadorova_av@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0463-2190>

Колясникова Ксения Николаевна

к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных
биорегуляторов отдела химии лекарственных
средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6797-692X>
РИНЦ SPIN-код: 5682-2035

Ksenia N. Koliasnikova

PhD, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher at the
Laboratory of Peptide Bioregulators of the Department of Drug Chemistry Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6797-692X>
RSCI SPIN code: 5682-2035

Чернякова Ирина Владимировна

к. м. н, в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Колик Лариса Геннадьевна

д. б. н., профессор РАН, руководитель лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-8058>
РИНЦ SPIN-код: 9126-6922

Irina V. Chernyakova

PhD, Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher at the Laboratory of Medicinal Toxicology Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation

Larisa G. Kolik

PhD, Dr. Sci. (Biology), Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of laboratory of medicinal toxicology Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-8058>
RSCI SPIN code: 9126-6922

Список литературы / References

1. Reimann F, Cox JJ, Belfer I, et al. Pain perception is altered by a nucleotide polymorphism in SCN9A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar 16; 107(11):5148-53. doi: 10.1073/pnas.0913181107.
2. Holliday KL, Nicholl BI, Macfarlane GJ, et al. Genetic variation in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis influences susceptibility to musculoskeletal pain: results from the EPIFUND study. *Ann Rheum Dis*. 2010 Mar;69(3):556-60. doi: 10.1136/ard.2009.116137.
3. Kim H, Ramsay E, Lee H, et al. Genome-wide association study of acute post-surgical pain in humans. *Pharmacogenomics*. 2009 Feb;10(2):171-9. doi: 10.2217/14622416.10.2.171.
4. Johnston KJA, Adams MJ, Nicholl BI, et al. Genome-wide association study of multisite chronic pain in UK Biobank. *PLoS Genet*. 2019 Jun 13; 15(6):e1008164. doi: 10.1371/journal.pgen.1008164.
5. Willis WD Jr. The somatosensory system, with emphasis on structures important for pain. *Brain Res Rev*. 2007 Oct;55(2):297-313. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.05.010.
6. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009 Oct 16;139(2):267-84. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028.
7. Mogil JS, Wilson SG, Bon K, et al. Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain*. 1999 Mar;80(1-2):67-82. doi: 10.1016/s0304-3959(98)00197-3.
8. Smith JC. A Review of Strain and Sex Differences in Response to Pain and Analgesia in Mice. *Comp Med*. 2019 Dec 1;69(6):490-500. doi: 10.30802/AALAS-CM-19-000066.
9. Mogil JS, Wilson SG, Bon K, et al. Heritability of nociception II. 'Types' of nociception revealed by genetic correlation analysis. *Pain*. 1999 Mar;80(1-2):83-93. doi: 10.1016/s0304-3959(98)00196-1.
10. Lariviere WR, Wilson SG, Laughlin TM, et al. Heritability of nociception. III. Genetic relationships among commonly used assays of nociception and hypersensitivity. *Pain*. 2002 May;97(1-2):75-86. doi: 10.1016/s0304-3959(01)00492-4.
11. Wilson SG, Smith SB, Chesler EJ, et al. The heritability of antinociception: common pharmacogenetic mediation of five neurochemically distinct analgesics. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Feb;304(2):547-59. doi: 10.1124/jpet.102.041889.
12. Young EE, Costigan M, Herbert TA, Lariviere WR. Heritability of nociception IV: neuropathic pain assays are genetically distinct across methods of peripheral nerve injury. *Pain*. 2014 May;155(5):868-880. doi: 10.1016/j.pain.2013.09.018.
13. Mogil JS, Kest B, Sadowski B, Belknap JK. Differential genetic mediation of sensitivity to morphine in genetic models of opiate antinociception: influence of nociceptive assay. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996 Feb;276(2):532-44.
14. Mogil JS. The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 6;96(14):7744-51. doi: 10.1073/pnas.96.14.7744.
15. Althaus A, Arránz Becker O, Neugebauer E. Distinguishing between pain intensity and pain resolution: using acute post-surgical pain trajectories to predict chronic post-surgical pain. *Eur J Pain*. 2014 Apr;18(4):513-21. doi: 10.1002/j.1532-2149.2013.00385.x.
16. Blichfeldt-Eckhardt MR, Ording H, Andersen C, et al. Early visceral pain predicts chronic pain after laparoscopic cholecystectomy. *Pain*. 2014 Nov;155(11):2400-7. doi: 10.1016/j.pain.2014.09.019.
17. Гудашева Т.А., Василевич Н.И., Золотов Н.Н., и др. О механизме ноотропного действия топологических аналогов пирасетама на основе пролина. *Химико-фармацевтический журнал*. 1991;25(6):12-16. [Gudasheva TA, Vasilevich NI, Zolotov NN, et al. O mekhanizme nootropnogo deistviya topologicheskikh analogov pirasetama na osnove prolina. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*. 1991;25(6):12-16. (In Russ.)].
18. Gudasheva TA, Boyko SS, Akparov VKh, et al. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain. *FEBS Lett*. 1996 Aug 5;391(1-2):149-52. doi: 10.1016/0014-5793(96)00722-3.
19. Seredenin SB, Gudasheva TA, Boiko SS, et al. Endogenous dipeptide cycloprolylglycine shows selective anxiolytic activity in animals with manifest fear reaction. *Bull Exp Biol Med*. 2002 Apr;133(4):360-2. doi: 10.1023/a:1016293904149.
20. Жердев В.П., Бойко С.С., Колясникова К.Н. Взаимосвязь между содержанием потенциального психофармакологического средства цикло-Л-пролилглицина в мозге экспериментальных животных и его антигипоксическим эффектом. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2020;(1):25-29. [Zherdev VP, Boyko SS, Kolyasnikova KN. The relationship between the content of the potential psychopharmacological agent cyclo-L-prolylglycine in the brain of experimental animals and its antihypoxic effect. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2020;(1):25-29. (In Russ.)]. doi: 10.37489/2587-7836-2020-1-25-29.
21. Abdullina AA, Vasilyeva EV, Kondrakhin EA, Kovalev GI. The involvement of serotonin, glutamate, and GABA receptors in the manifestation of antidepressant-like effect of cycloprolylglycine. *Neurochemical Journal*. 2019;13(3):249-55. doi: 10.1134/S1819712419030024.
22. Ferro JN, de Aquino FL, de Brito RG, et al. Cyclo-Gly-Pro, a cyclic dipeptide, attenuates nociceptive behaviour and inflammatory response in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015 Dec;42(12):1287-95. doi: 10.1111/1440-1681.12480.
23. Колясникова К.Н., Голубятникова А.К., Ребеко А.Г., и др. Синтез цикло-Л-пролилглицина и изучение его антипаркинсонической активности. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2019;3:19-26. [Kolyasnikova KN, Golubyatnikova AK, Rebebo AG, et al. Synthesis of cyclo-L-prolylglycine and study of its anti-parkinsonian activity. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;3:19-26. (In Russ.)]. doi: 10.24411/2588-0519-2019-10051.
24. Shoji H, Miyakawa T. Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57BL/6J strain maintained under a genetic stability program. *Neuropsychopharmacol Rep*. 2019 Jun;39(2):100-118. doi: 10.1002/npr.12052.

25. Beierle JA, Yao EJ, Goldstein SI, et al. Genetic basis of thermal nociceptive sensitivity and brain weight in a BALB/c reduced complexity cross. *Mol Pain*. 2022 Jan-Dec;18:17448069221079540. doi: 10.1177/17448069221079540.
26. Wahlsten D, Metten P, Phillips TJ, et al. Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction. *J Neurobiol*. 2003 Jan;54(1):283-311. doi: 10.1002/neu.10173.
27. Sengupta JN. Visceral pain: the neurophysiological mechanism. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(194):31-74. doi: 10.1007/978-3-540-79090-7_2.
28. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*. 2001 Dec;53(4):597-652.
29. Stepanovic-Petrovic RM, Tomic MA, Vuckovic SM, et al. The antinociceptive effects of anticonvulsants in a mouse visceral pain model. *Anesth Analg*. 2008 Jun;106(6):1897-903. doi: 10.1213/ane.0b013e318172b993.
30. Satyanarayana PS, Jain NK, Singh A, Kulkarni SK. Isobolographic analysis of interaction between cyclooxygenase inhibitors and tramadol in acetic acid-induced writhing in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004 Jul;28(4):641-9. doi: 10.1016/j.pnpbp.2004.01.015.
31. Shamsi Meymandi M, Keyhanfar F. Assessment of the antinociceptive effects of pregabalin alone or in combination with morphine during acetic acid-induced writhing in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013 Sep;110:249-54. doi: 10.1016/j.pbb.2013.07.021.
32. Васильева Е.В., Абдуллина А.А., Салимов Р.М. и др. Динамика психотропных эффектов циклопролилглицина у мышей BALB/c и C57Bl/6 в зависимости от продолжительности его введения. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2021;84(1):3-7. [Vasil'eva EV, Abdullina AA, Salimov RM, et al. Dynamics of cyclopropylglycine psychotropic effects in balb/c and C57Bl/6 mice depending on treatment duration. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2021;84(1):3-7. (In Russ.)]. doi: 10.30906/0869-2092-2021-84-1-3-7.
33. Raffa RB, Pergolizzi Jr JV, Tallarida RJ. The determination and application of fixed-dose analgesic combinations for treating multimodal pain. *J Pain*. 2010 Aug;11(8):701-9. doi: 10.1016/j.jpain.2009.12.010.
34. Gudasheva TA, Grigoriev VV, Koliashnikova KN, et al. Neuropeptide cyclopropylglycine is an endogenous positive modulator of AMPA receptors. *Dokl Biochem Biophys*. 2016 Nov;471(1):387-389. doi: 10.1134/S160767291606003X.
35. Su C, Lin HY, Yang R, et al. AMPAkinase Target the Nucleus Accumbens to Relieve Postoperative Pain. *Anesthesiology*. 2016 Nov;125(5):1030-1043. doi: 10.1097/ALN.0000000000001336.
36. Le AM, Lee M, Su C, Zou A, Wang J. AMPAkinase have novel analgesic properties in rat models of persistent neuropathic and inflammatory pain. *Anesthesiology*. 2014;121:1080-90. doi: 10.1097/ALN.0000000000000351.
37. Zeng F, Zhang Q, Liu Y, et al. AMPAkinase potentiate the corticostriatal pathway to reduce acute and chronic pain. *Mol Brain*. 2021 Mar 2;14(1):45. doi: 10.1186/s13041-021-00757-y.
38. Sun Y, Liu K, Martinez E, et al. AMPAkinase and morphine provide complementary analgesia. *Behav Brain Res*. 2017 Sep 15;334:1-5. doi: 10.1016/j.bbr.2017.07.020.
39. Dai W, Gao X, Xiao D, et al. The Impact and Mechanism of a Novel Allosteric AMPA Receptor Modulator LCX001 on Protection Against Respiratory Depression in Rodents. *Front Pharmacol*. 2019 Feb 19;10:105. doi: 10.3389/fphar.2019.00105.

ПАМЯТИ

Островской Риты Ушеровны

13 февраля 1931 г. — 22 сентября 2024 г.

In Memory of Rita U. Ostrovskaya

(13.02.1931 — 22.09.2024)



22 сентября 2024 г. на 94-м году ушла из жизни дорогой человек, выдающийся учёный, верный друг, прекрасный педагог, заботливая мать, любящая бабушка и прабабушка.

Рита Ушеровна Островская — советский и российский фармаколог, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник лаборатории психофармакологии НИИ фармакологии им. В.В. Закусова — была фронтменом науки на протяжении более 55 лет. С её именем

связана разработка таких лекарственных препаратов, как ноопепт, дилепт, оксibuтират натрия и лития. За заслуги в развитии психофармакологии была награждена медалью имени А.А. Лихачева.

Рита Ушеровна отличалась неистощимой энергией, трудолюбием, интересом к событиям научной, культурной и общественной жизни, надёжностью и жизнелюбием.

Рита Ушеровна была примером и ориентиром для многих. Нам её будет очень не хватать!

Светлая память

Рите Ушеровне Островской!

УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ



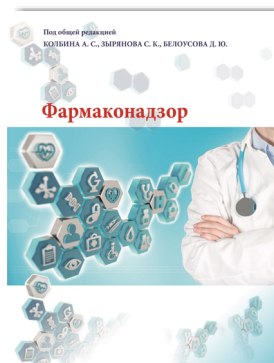
Учебное пособие описывает методологию эффективного управления проектом по изысканию, разработке и выводу на фармацевтический рынок лекарственных средств, начиная с этапа поиска перспективных химических соединений, проведения доклинических испытаний веществ–кандидатов, клинических исследований лекарств–кандидатов, фармаконадзора, управления данными, анализа полученных данных, составления окончательного отчёта об исследовании, получения регистрационного удостоверения, публикации результатов, заканчивая организацией пострегистрационных исследований безопасности, проведением неинтервенционных и фармакоэпидемиологических исследований, а также процесс обеспечения качества, проведения аудита и инспекций уполномоченных органов здравоохранения, создания стандартных операционных процедур, архивирования документов исследования.

Выходные данные: Управление клиническими исследованиями / под общ. ред. Белоусова Д. Ю., Зырянова С. К., Колбина А. С. — 1-е изд. — М.: Буки Веди: Издательство ОКИ, 2017. — 676 с.: ил. ISBN 978-5-4465-1602-5



Это полезный и компактный ресурс, пошаговый алгоритм по подготовке Предложения на включение лекарственных препаратов в ограничительные Перечни с изложением методологии проведения сравнительной оценки эффективности и безопасности, а также экономических последствий их применения. После прочтения книги процесс включения в Перечни сложится из разрозненных пазлов в единую картину.

Выходные данные: Включение лекарственных препаратов в ограничительные перечни: пошаговый алгоритм / под общ. ред. Белоусова Д. Ю., Зырянова С. К., Колбина А. С. — М.: Издательство ОКИ: Буки Веди, 2019. — 252 с.: ил. ISBN 978-5-4465-2555-3



В книге описывается методология фармаконадзора, организация пострегистрационных исследований безопасности, фармакоэпидемиологических и неинтервенционных исследований, организация системы фармаконадзора в фармацевтической компании, чрезвычайные ситуации в клинических исследованиях, особенности фармаконадзора у беременных и кормящих.

Выходные данные: Фармаконадзор / под общ. ред. Колбина А. С., Зырянова С. К., Белоусова Д. Ю. — М.: Издательство ОКИ: Буки Веди, 2019. — 248 с.: ил. ISBN 978-5-4465-2373-3



Рекомендации раскрывают аспекты планирования и проведения исследований реальной клинической практики для формирования основанных на них доказательств. Впервые в России обобщены термины и определения касавшиеся исследований реальной клинической практики. Описаны правовые вопросы, методология планирования и проведения исследований реальной клинической практики, методы сбора данных, этическая экспертиза и статистический анализ таких исследований.

Выходные данные: Исследования реальной клинической практики / под общ. ред. Колбина А. С. — М.: Издательство ОКИ: Буки Веди, 2020. — 208 с.: ил. ISBN 978-5-4465-2902-5.



Руководство предназначено для повседневного использования членами Комитетов по этике, при экспертной оценке биомедицинских исследований; специалистами, занимающимися проведением таких исследований; работающими в клиниках, фармацевтических компаниях, контрактных исследовательских организациях, руководителями научных и клинических проектов, представителями регулирующих органов, научно-исследовательских институтов, высших аттестационных комиссий.

Выходные данные: Этическая экспертиза биомедицинских исследований: руководство для комитетов по этике / под общей ред. А. Л. Хохлова. — 3-е изд., перераб. и доп. — М.: Изд-во ОКИ, 2021. — 792 с.: ил.

Приобрести книги можно по тел. +7 (916) 986-04-65 или e-mail: eva88@list.ru
ООО «Издательство ОКИ», <https://izdat-oki.ru>

