

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Григоревских Екатерина Михайловна

**Экспериментальное изучение нейропсихотропных свойств
низкомолекулярных миметиков мозгового нейротрофического фактора**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Лебедева Светлана Анатольевна

доктор биологических наук,

профессор РАН

Колик Лариса Геннадьевна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. МОЗГОВОЙ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР КАК РЕГУЛЯТОР ПСИХИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	15
1.1. Синтез, накопление и локализация мозгового нейротрофического фактора.....	16
1.2. Рецепторы и сигнальные пути мозгового нейротрофического фактора.....	19
1.3. Нейропротекторные свойства мозгового нейротрофического фактора.....	23
1.3.1. Анксиолитические свойства мозгового нейротрофического фактора..	24
1.3.2. Антиаддиктивные свойства мозгового нейротрофического фактора...	26
1.4. Низкомолекулярные миметики мозгового нейротрофического фактора как регуляторы нейропсихотропных функций.....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	40
2.1. Экспериментальные животные.....	40
2.2. Дизайн экспериментального исследования.....	41
2.3. Исследованные химические соединения, референтные средства и реактивы.....	42
2.4. Методы исследования.....	47
2.4.1. Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт».....	47
2.4.2. Оценка спонтанной двигательной активности.....	48
2.4.3. Тест «Вращающийся стержень».....	48
2.4.4. Тест «Этаноловый наркоз».....	49
2.4.5. Формирование алкогольной мотивации.....	49
2.4.6. Оценка среднесуточного потребления раствора этанола.....	50
2.4.7. Оценка алкоголь-депривационного эффекта.....	50

2.4.8. Оценка этанол-индуцированной гиполокомоторной реакции.....	51
2.4.9. Формирование поведенческой сенсibilизации к этанолу.....	51
2.4.10. Фармакокинетические и метаболомные исследования.....	52
2.4.11. Валидация разработанных методов.....	53
2.4.12. Анализ данных.....	56
2.4.13. Статистическая обработка результатов.....	57
ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ	
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МИМЕТИКОВ МОЗГОВОГО	
НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА.....	
3.1. Изучение анксиолитической активности миметиков мозгового нейротрофического фактора.....	58
3.1.1. Изучение анксиолитической активности низкомолекулярных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель мозгового нейротрофического фактора.....	58
3.1.2. Изучение анксиолитической активности ГТС-201 у животных разных возрастных групп.....	60
3.1.2.1. Оценка анксиолитического действия ГТС-201 у инбредных мышей линии BALB/c	62
3.1.2.2. Оценка зависимости анксиолитического действия ГТС-201 от пола у крыс.....	64
3.2. Оценка влияния миметиков мозгового нейротрофического фактора на координацию движений в тесте «Вращающийся стержень».....	64
3.3. Изучение миметиков мозгового нейротрофического фактора при моделировании алкогольной зависимости у крыс.....	68
3.3.1. Изучение влияния миметиков мозгового нейротрофического фактора на продолжительность «этанолового наркоза» у мышей CD-1.....	68
3.3.2. Изучение влияния миметиков мозгового нейротрофического фактора на сформированную алкогольную мотивацию у крыс.....	68
3.3.3. Изучение влияния миметиков мозгового нейротрофического фактора на среднесуточное потребление этанола у крыс.....	73

3.3.4. Влияние ГТС-201 при остром введении на индуцированное этанолом снижение двигательной активности у мышей линии C57Bl/6.....	77
3.3.5. Влияние ГТС-201 при субхроническом введении на формирование этанол-индуцированной поведенческой сенсibilизации у мышей линии DBA/2.....	80
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДОВ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОГО И МЕТАБОЛОМНОГО АНАЛИЗА.....	
4.1. Разработка и валидация методики определения ГТС-201 в образцах крови и головного мозга крыс.....	85
4.2. Разработка и валидация методики количественного определения эндогенных метаболитов в образцах крови и головного мозга крыс.....	90
4.2.1. Калибровочные кривые.....	91
4.2.2. Правильность и прецизионность.....	91
4.2.3. Оценка степени извлечения, эффекта матрицы и стабильности.....	92
4.3. Фармакокинетические показатели ГТС-201 у крыс после однократного внутривентриального введения.....	92
ГЛАВА 5. МАТЕРИАЛЫ К МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО МИМЕТИКА ГТС-201.....	
5.1. Изучение механизма анксиолитического действия ГТС-201 с помощью фармакологических анализаторов в опытах <i>in vivo</i>	95
5.2. Исследование влияния ГТС-201 на метаболомный профиль у крыс.....	97
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	103
ВЫВОДЫ.....	112
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	116
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	142
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	145
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	148

ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	163
ПРИЛОЖЕНИЕ Д.....	167
ПРИЛОЖЕНИЕ Е.....	174

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и крупным аналитическим исследованиям, к 2050 году число людей, страдающих нейродегенеративными заболеваниями, вырастет в 2-3 раза и составит 100-150 миллионов человек [52, 94, 126, 153]. Ситуацию осложняет тот факт, что ежегодно во всем мире около 70 миллионов человек получают черепно-мозговые травмы [125, 208]. Кроме того, психические и поведенческие расстройства, связанные с употреблением наркотиков и алкоголя, остаются одной из важнейших медико-социальных проблем в мире и России. По данным Роскомстата, смертность, связанная с употреблением алкоголя, составляет около 2,4% от общей смертности в России.

Психические нарушения приводят к социальной дисфункции и снижению качества жизни, вследствие чего являются всемирной проблемой общественного здравоохранения, которая привлекает повышенное внимание. Несмотря на значительный прогресс в понимании лежащих в их основе патогенетических процессов, причины, молекулярные механизмы патогенеза и принципы терапии до сих пор окончательно не изучены. Вследствие этого разработка новых терапевтических подходов и схем лечения заболеваний, сопровождающихся гибелью и дегенерацией нейронов, представляет актуальную и сложную задачу.

Мозговой нейротрофический фактор (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) – полипептидный фактор роста, который оказывает разностороннее влияние на развитие нервной системы, способствует формированию нейронных связей и когнитивных функций, обеспечивает синаптическую пластичность и играет важную роль в процессах выживания, роста и дифференцировки нейрональных клеток. BDNF проявляет нейропротекторный эффект при неблагоприятных условиях, таких как глутаматергическая стимуляция, ишемия головного мозга, гипогликемия, нейротоксичность, окислительный стресс [184]. BDNF в настоящее

время рассматривается как одна из наиболее перспективных молекул для изучения нейробиологических механизмов ассоциативного синаптического обучения, развивающегося при различных тревожных расстройствах, а также как существенный фактор стрессоустойчивости.

BDNF является объектом пристального изучения со стороны специалистов в области нейрогенетики. Согласно исследованиям, мутации в гене BDNF могут быть связаны с повышением вероятности развития депрессии [64, 80, 215], степенью клинической выраженности нейродегенеративных заболеваний [77, 81, 118] и вероятностью развития аддиктивных состояний [82]. При нейродегенеративных заболеваниях, сопровождающихся синаптической дисфункцией и потерей синапсов в тканях головного мозга, происходит снижение уровня BDNF [192]. Кроме того, несколько мета-анализов показали, что существует корреляция между низким уровнем BDNF и развитием депрессии [98, 105, 191], шизофрении [46, 89, 90, 105], биполярных, панических и обсессивно-компульсивных расстройств [87, 89].

Несмотря на потенциальное использование BDNF в качестве фармакологически активного соединения, клинические испытания рекомбинантных белков не увенчались успехом из-за значительных побочных эффектов и фармакокинетических ограничений: слабой проницаемости через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и короткого времени жизни в кровотоке. Создание низкомолекулярных миметиков является одним из альтернативных способов использования терапевтических свойств нейротрофинов и возможностей преодолеть низкую биодоступность зрелого BDNF.

Степень разработанности темы исследования

Существует предположение, что центральные фрагменты β -витков 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF являются основными фармакофорными сайтами нейротрофинов, поскольку эти фрагменты взаимодействуют с рецептором семейства тропомиозинкиназы B (TrkB) [58, 107]. Опираясь на данную гипотезу, были сконструированы и синтезированы димерные дипептидные миметики 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF.

Данные вещества взаимодействуют с TrkB-рецептором, но в опытах *in vitro* по-разному влияют на пострецепторные сигнальные пути: миметик 1-й петли ГСБ-214 активирует сигнальный путь фосфоинозитид-3-киназы/серин-треониновой киназы (PI3K/Akt), миметик 2-й петли ГТС-201 – митоген-активируемой протеинкиназы/киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (MAPK/ERK), а миметик 4-й петли ГСБ-106 влияет на оба пути [20]. В отличие от пептидных миметиков, активирующих пути MAPK/ERK и PI3K/Akt, ГТС-201 не обладал антидепрессивными свойствами [41]. Кроме того, в настоящее время синтезировано 9 других химических соединений с потенциальной антиаддиктивной активностью, влияющих на сигнальные каскады BDNF [22].

Цель и задачи исследования

Изучить нейрпсихотропные свойства низкомолекулярных миметиков мозгового нейротрофического фактора (BDNF).

1. Оценить анксиолитическое действие дипептидных миметиков отдельных петель BDNF у грызунов разного возраста и пола.

2. Изучить особенности влияния дипептидных миметиков отдельных петель BDNF на алкогольную мотивацию у самцов и самок крыс с выявлением наиболее активного соединения.

3. Оценить возможные побочные эффекты соединения-лидера на общую двигательную активность, миорелаксацию, лекарственное взаимодействие с этанолом у грызунов.

4. Разработать и валидировать методику количественного определения соединения-лидера в образцах крови и головного мозга крыс для проведения фармакокинетического анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

5. Определить фармакокинетические параметры соединения-лидера.

6. Разработать и валидировать методику количественного определения эндогенных метаболитов в образцах крови и головного мозга крыс методом ВЭЖХ-МС/МС при внутрибрюшинном (в/б) введении соединения-лидера.

7. Исследовать возможные пути реализации механизма анксиолитического действия соединения-лидера.

Научная новизна

Впервые установлена возможность фармакологической регуляции тревожного поведения с помощью низкомолекулярных миметиков BDNF у «взрослых» (22-недельных) инбредных мышей линии BALB/c с генетически детерминированной повышенной эмоционально-стрессовой реакцией, а также у «взрослых» самок и самцов нелинейных белых крыс в возрасте 34 недели. Впервые показано, что анксиолитический эффект миметика 2-й петли BDNF (соединение ГТС-201) реализуется независимо от активации TrkB-рецепторов и MAPK/ERK сигнального каскада и, по-видимому, связан с увеличением синтеза серотонина и дофамина в головном мозге и снижением кортизола в плазме крови у крыс. Впервые показана зависящая от пола возможность коррекции сформированной алкогольной мотивации у нелинейных белых крыс с помощью ГТС-201.

Впервые разработаны и валидированы методики количественного определения ГТС-201 и эндогенных метаболитов в образцах крови и головного мозга крыс методом ВЭЖХ-МС/МС. Фармакокинетическими методами анализа впервые экспериментально доказана способность ГТС-201 при системном парентеральном введении проникать через ГЭБ и накапливаться в тканях мозга, обеспечивая нейрорепрогенеративное действие.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты расширяют понимание роли BDNF и его низкомолекулярных миметиков в регуляции эмоциональных состояний, что имеет

большое значение для фундаментальных исследований патогенеза тревожных расстройств и нарушений алкогольного поведения. Работа закладывает научную основу для разработки инновационных средств терапии поведенческих расстройств, а также для исследования молекулярных механизмов действия миметиков BDNF.

Разработаны и валидированы современные методы количественного определения миметика 2-й петли BDNF ГТС-201, нейромедиаторов и метаболитов в биологических образцах головного мозга и плазмы крови крыс с использованием ВЭЖХ-МС/МС, что может применяться для мониторинга эффективности и безопасности новых соединений в доклинических испытаниях.

На основании экспериментальных данных представлены практические рекомендации по дальнейшему изучению ГТС-201 с учетом возрастных и половых отличий лабораторных животных. Практическая значимость диссертационного исследования заключается также в возможности использования полученных результатов в учебном процессе, что подтверждается актом внедрения.

Методология и методы исследования

Методы диссертационного исследования описаны в отечественных и зарубежных статьях, методических рекомендациях, патентах.

Дизайн исследования основан на рекомендациях по проведению доклинических исследований и одобрен Локальным Комитетом по этике ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Протокол № 25-22 от 08.12.2022 г.).

Положения, выносимые на защиту

1. Низкомолекулярные миметики 2-й (ГТС-201) и 4-й (ГСБ-106) петель BDNF обладают анксиолитической активностью. Наиболее выраженный эффект продемонстрировал ГСБ-106, что, вероятно, связано с активацией

пострецепторных сигнальных путей MAPK/ERK1/2 и PI3K/Akt. ГТС-201 проявлял выраженное дозозависимое противотревожное действие у «взрослых» мышей-самцов линии BALB/c с генетически детерминированной повышенной тревожной реакцией, а также у «взрослых» самцов и самок нелинейных белых крыс.

2. Дипептидный миметик ГТС-201 уменьшает алкогольную мотивацию у самок крыс с выраженной алкогольной зависимостью, предотвращает индуцированное этанолом снижение спонтанной двигательной активности у мышей-самцов линии C57Bl/6, не влияя на развитие сенсibilизации и спонтанную двигательную активность.

3. Валидационные показатели разработанных аналитических методик количественного определения ГТС-201 и эндогенных метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС соответствуют характеристикам, установленным Евразийским экономическим союзом (ЕАЭС), Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (FDA) и Европейским медицинским агентством (EMA).

4. Дипептидный миметик ГТС-201 обладает умеренной биодоступностью, проникает через ГЭБ и детектируется в тканях мозга после однократного системного введения.

5. Реализация анксиолитического эффекта ГТС-201 связана с увеличением синтеза серотонина и дофамина в мозге и снижением кортизола в плазме крови у крыс. Механизм действия ГТС-201 подтверждает гипотезу о возможности дивергенции функций нейротрофинов с помощью низкомолекулярных миметиков отдельных петлеобразных структур.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует паспортам научных специальностей 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (п. 1, 3, 5, 6) и 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (п. 1, 4).

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертационная работа выполнена на современном научно-методическом уровне с использованием методик, адекватных цели и задачам исследования. При проведении экспериментов использовано современное оборудование, методами статистической обработки установлена воспроизводимость и правильность результатов исследований, что позволяет считать их достоверными. Данные, полученные автором, обработаны с применением пакетов прикладных компьютерных программ Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.) с использованием U-критерия Манна-Уитни, однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим применением критерия Дункана, t-критерия Стьюдента для независимых групп и зависимых переменных, теста Шапиро-Уилка.

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертационной работе, обоснованы, логично вытекают из полученных автором результатов и не противоречат данным, представленным в независимых источниках по данной тематике. Первичная документация полностью соответствует материалам, содержащимся в работе.

Результаты и основные положения диссертации доложены и обсуждены на II Научной конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные исследования в фармакологии» (Москва, 2021), 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021» (Волгоград, 2021), IV Ежегодной всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Безопасность фармакотерапии: NOLI NOCERE!» (Казань, 2021), 3rd China-Russia International Symposium for Young Scholars (Guangzhou, China, 2022), VI Съезде фармакологов России (Москва, 2023), Всероссийском конгрессе с международным участием «Психическое здоровье в меняющемся мире» (Санкт-Петербург, 2024), межкафедральной конференции ученых Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Минздрава России (Протокол № 1 от 08.09.2025 г.).

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры фармакологии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) и используются при изучении дисциплин: «Фармакология», «Основы доклинических исследований», «Фармацевтическое информирование», «Методы экспериментального изучения молекулярных основ действия лекарственных средств», читаемых студентам по направлению подготовки 33.05.01. Фармация (Акт № 582 от 10.02.2025 г.).

Личный вклад автора

Автор принимал активное участие в разработке дизайна исследования, постановке цели и задач, а также поиске методологических подходов для их реализации. Изучение современной литературы по теме диссертации, анализ и обобщение полученных данных позволили автору сформулировать выводы, логично вытекающие из задач исследования. Автором выполнены все эксперименты на животных, проведена систематизация и описание полученных результатов, их статистическая обработка, сформулированы выводы. Определяющим является его вклад в подготовку научных публикаций, внедрение в практику результатов исследования. Написание и оформление диссертации выполнено лично автором.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационного исследования опубликовано 12 работ, в том числе 1 научная статья в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 4 научных статьи в изданиях,

индексируемых в международной базе Scopus, 1 публикация – иная, 1 патент, 5 публикаций в сборниках материалов всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 187 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, экспериментальной части, включающей 3 главы собственных исследований, обсуждения полученных результатов и заключения, выводов, списка литературы, 6 приложений. Работа иллюстрирована 28 рисунками и 18 таблицами. Библиографический список включает 219 источников литературы, из которых 37 отечественных и 182 зарубежных.

ГЛАВА 1. МОЗГОВОЙ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР КАК РЕГУЛЯТОР ПСИХИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

BDNF – член семейства нейротрофических факторов – был выделен из мозга свиньи в 1982 году [65]. Этот белок состоит из двух идентичных полипептидных цепей, каждая из которых содержит 7 β -листов, связанных четырьмя шпилькообразными петлями, три из которых (1-я, 2-я и 4-я) экспонированы наружу и могут играть важную роль во взаимодействии с рецепторами (Рисунок 1.1).



Рисунок 1.1 – 3D-структура мозгового нейротрофического фактора [21]

Функции BDNF включают регуляцию развития нейронов и глиальных клеток, нейропротекцию и модуляцию краткосрочных и долгосрочных синаптических взаимодействий, имеющих важное значение для познания и памяти не только в раннем онтогенезе, но и в мозге взрослого человека [68]. Роль BDNF в патогенезе депрессии и ряда психических заболеваний в настоящее время не вызывает сомнений и активно изучается [21, 154].

1.1. Синтез, накопление и локализация мозгового нейротрофического фактора

Ген BDNF человека локализуется в p14-регионе 11 хромосомы (у крыс и мышей – в хромосомах 3q33 и 2qE3 соответственно) и содержит 12 экзонов, 9 из которых имеют специфические промоторы (I–VIII 5'-экзоны, сплайсирующиеся с общим 3'-экзоном IX). Такая структура гена наблюдается как у человека [216], так и у грызунов [168], однако число экзонов варьирует – у мышей их 9, а у крыс 10.

Синтез и созревание BDNF – многоэтапный процесс, включающий образование нескольких изоформ-предшественников (Таблица 1.1).

Таблица 1.1 – Этапы синтеза и созревания BDNF

Этап	Локализация	Основные процессы
Синтез пре-про-BDNF	Эндоплазматический ретикулум	Трансляция неактивного полипептида
Отщепление сигнального пептида	Эндоплазматический ретикулум	Формирование про-BDNF
Модификация и транспорт	Аппарат Гольджи	N-гликозилирование, сортировка
Расщепление про-BDNF	Секреторные везикулы	Протеолиз до зрелого BDNF или секреция про-BDNF
Секреция и активация рецепторов	Внеклеточно или в синапсах	Связывание с TrkB/p75NTR, активация сигналов
Примечание: p75NTR – рецептор нейротрофина p75.		

Начальным продуктом гена является высококонсервативный белок пре-про-BDNF из 247 аминокислот (32-35 кДа), который быстро расщепляется при помощи протеаз в аппарате Гольджи с образованием про-BDNF (28-32 кДа). В дальнейшем этот белок также подвергается гидролизу с N-конца, распадаясь на конечные продукты – зрелый BDNF – димерный белок, каждый мономер которого массой

~13,5 кДа состоит из 119-120 негликозилированных аминокислот, и про-BDNF-пептид, молекулярная масса которого составляет ~ 17 кДа [70, 84, 101]. Они собираются в везикулы и секретируются во внеклеточное пространство, выполняя различные функции. Например, про-BDNF-пептид обнаружен в пресинаптических терминалях нейронов. Предполагается, что он может высвобождаться по механизмам, схожими с классическими низкомолекулярными нейромедиаторами [70]. Также возможно его связывание с рецепторами нейротрофинов [79] и низкомолекулярных нейромедиаторов [78].

Исследования показали, что баланс между двумя формами BDNF играет важную роль в поддержании гомеостаза мозга на разных стадиях развития [141]. Так, в активных нейронах, генерирующих более частые потенциалы действия, протеолиз про-BDNF протекает быстрее за счёт повышенной активности внутриклеточных конвертаз [22, 86].

Установлено, что такая многофакторная регуляция соотношения про-BDNF/BDNF необходима для поддержания синаптической пластичности в гиппокампе, формирования долговременной потенциации [100] и развития новых нервно-мышечных синапсов [189].

Соотношение зрелого BDNF и про-BDNF зависит от конкретных стадий развития мозга и его областей: в раннем постнатальном периоде выше концентрация про-BDNF, вследствие чего его можно рассматривать как фактор, модулирующий функции мозга. Зрелый BDNF преобладает во взрослом возрасте и важен для нейропротекции и синаптической пластичности [69]. Интересен тот факт, что уровни экспрессии BDNF низки во время внутриутробного развития, заметно повышаются после рождения, а затем снижаются у взрослых [115].

Стоит отметить, что в настоящее время особое внимание уделяется изучению генетического полиморфизма BDNF, который естественным образом встречается в человеческой популяции. В частности, показано, что замена метионина на валин при кодоне 66 (Val66Met) связана с тревогой и биполярными расстройствами [72].

Как транскрипты матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), так и белок BDNF широко представлены в различных структурах мозга (неокортекс,

гиппокамп, миндалина, мозжечок), однако их уровень непостоянен как в норме, так и при патологии, а локализация и экспрессия имеют выраженную региональную и клеточную специфичность [84]. В зрелом мозге особенно высока экспрессия BDNF в гиппокампе, где он локализуется преимущественно (до 90%) в глутаматергических пресинаптических терминалях, и лишь незначительное количество – вблизи постсинаптических структур.

В больших количествах BDNF синтезируется в коре больших полушарий, при этом регуляция его экспрессии в коре и гиппокампе различается: транскрипционный фактор белка, связывающего чувствительные к циклическому аденозинмонофосфату (цАМФ) элементы (CREB), сильнее влияет на экспрессию BDNF в коре, чем в гиппокампе, что указывает на тонкую региональную настройку [112]. BDNF, синтезируемый в коре, транспортируется в стриатум, где необходим для выживания нейронов. В черной субстанции BDNF предотвращает гибель нейронов, которые используют гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) в качестве нейромедиатора (ГАМК-ергических), и увеличивает их размер, что играет важную роль в патогенезе болезней Хантингтона и Паркинсона [64].

Авторы выделяют зависимые от типа клеток и клеточной активности разные виды экспрессии BDNF [105]. В первом случае речь идёт о конститутивной экспрессии, обусловленной типом и дифференциацией клеток, во втором – о любых других факторах, влияющих на экспрессию данного белка – облучение, физическая активность, патологические состояния и приём различных химических веществ.

Условно можно выделить уровни анатомических и клеточных структур с различным содержанием данного белка. BDNF в большей степени локализован в глутаматергических нейронах, преимущественно вблизи синаптических терминалей [179]. Исследования на крысах показали, что в анатомических структурах центральной нервной системы (ЦНС) максимальный уровень BDNF по матричной рибонуклеиновой кислоте (мРНК) и иммуногистохимическому окрашиванию наблюдается в гиппокампе. Белок выявляется как в телах нейронов, так и в их отростках, с наибольшей интенсивностью в области CA4. Также большие количества BDNF находятся в коре, с пиком интенсивности в VI слое и областях,

прилегающих к мозолистому телу [42]. Интересно, что I (молекулярный) слой коры имеет наименьшую интенсивность иммуногистохимического окрашивания и уровня мРНК.

Активность BDNF в медиальной префронтальной коре опосредует различные виды поведения, связанные с этанолом. Наибольшая относительная интенсивность в коре наблюдается в височных и теменных отделах. В амигдале уровень BDNF чрезвычайно низок, за исключением центрального ядра, где он обнаруживается, главным образом, в отростках нейронов.

Кроме ЦНС, BDNF обнаруживается в других тканях и клетках, например, эндотелиальных клетках и миоцитах [211], кардиомиоцитах и мегакариоцитах [88, 182], лейкоцитах [75], тромбоцитах [88, 119], вследствие чего нарушение экспрессии данного белка может быть связано с раком, ангиогенезом и сердечно-сосудистыми заболеваниями.

1.2. Рецепторы и сигнальные пути мозгового нейротрофического фактора

BDNF реализует свои биологические эффекты через два основных рецептора: высокоаффинный трансмембранный TrkB-рецептор и низкоаффинный p75NTR, связывание с которыми определяет эффекты нейротрофина. Зрелая форма BDNF взаимодействует с TrkB-рецептором, а про-BDNF преимущественно связывается с p75NTR [11].

TrkB-рецептор – один из наиболее распространенных нейротрофических рецепторов, который экспрессируется во многих структурах мозга, включая кору, гиппокамп, стриатум, чёрную субстанцию, мозжечок и ствол мозга. Кроме того, TrkB-рецептор обнаружен в спинальных мотонейронах и клетках эпандимы, выстилающей желудочки мозга [11].

Рецептор TrkB кодируется геном NTRK2, расположенным на длинном плече 9 хромосомы (9q21.33). Обнаружено пять различных мРНК, являющихся продуктом этого гена. Транскрипты А и С при трансляции дают полную версию белка (TK+ изоформа), продуктом остальных транскриптов является укороченный

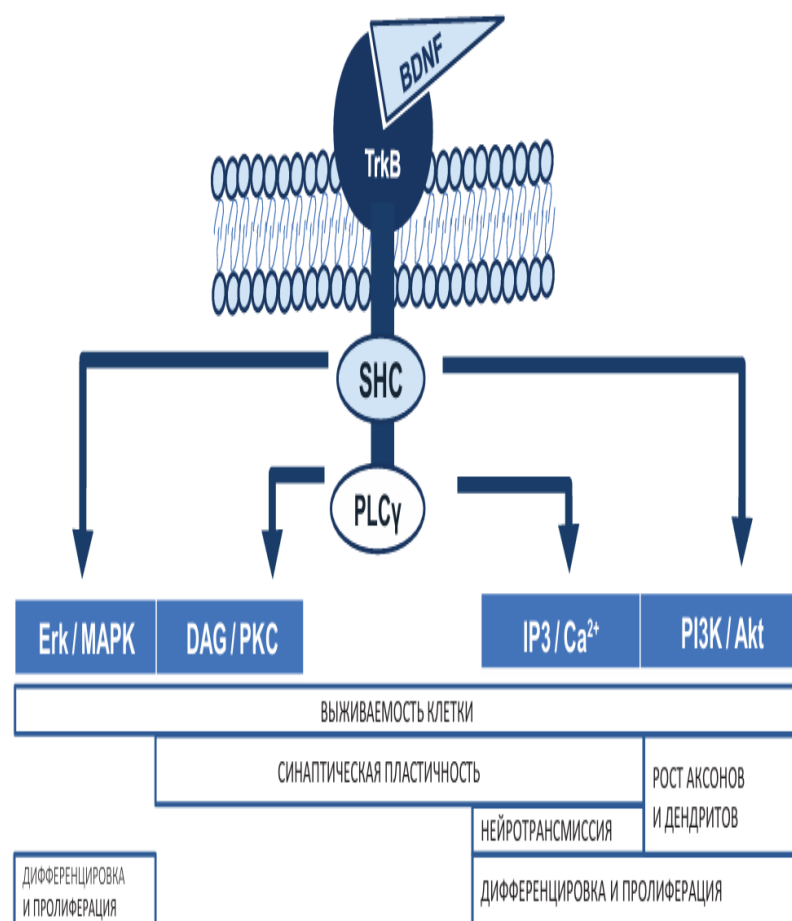
белок (ТК– изоформа) [175]. Функции и клиническое значение других изоформ TrkB-рецептора, возникающих вследствие альтернативного сплайсинга и генных перестроек, мало изучены. Для гена TrkB-рецептора описано несколько клинически значимых мутаций, связанных с эпилепсией, депрессией и суицидальным поведением [22, 173, 206].

Для связывания с BDNF TrkB-рецептор должен перейти в димеризованное состояние [22]. В настоящее время описаны и выяснены функции для ТК+/ТК+ и ТК–/ТК– гомодимеров. Роль ТК+/ТК– гетеродимеров изучена недостаточно, однако известно, что ТК+ и ТК– участвуют в процессе трансактивации, т.е. образования гетеродимеров с другими рецепторами, например, с рецепторами ангиотензина AGTR2 [61], TrkC [144] и TrkA [57].

Гомодимер ТК+ участвует в процессах синаптической пластичности благодаря активации внутриклеточного домена, связывающего фосфолипазу С (PLC), участвует в дифференцировке клеток за счет активации Ras-сигнального пути и способствует выживанию клетки за счет Akt-зависимого пути [22, 131]. Гомодимер ТК– может оказывать влияние на синапто- и морфогенез нервных клеток [124] и на процессы эксайтотоксичности – смерти или тяжёлого повреждения нейронов от нарушения гомеостаза кальция [22, 140].

Связывание зрелого BDNF с TrkB-рецептором индуцирует его гомодимеризацию и аутофосфорилирование остатков тирозина в интрацеллюлярном домене [45], что привлекает адаптерные белки и молекулы трансдукции, которые активируют три основных последующих каскада фосфорилирования: фосфолипазу $C\gamma$ (PLC γ), PI3K/Akt и MAPK.

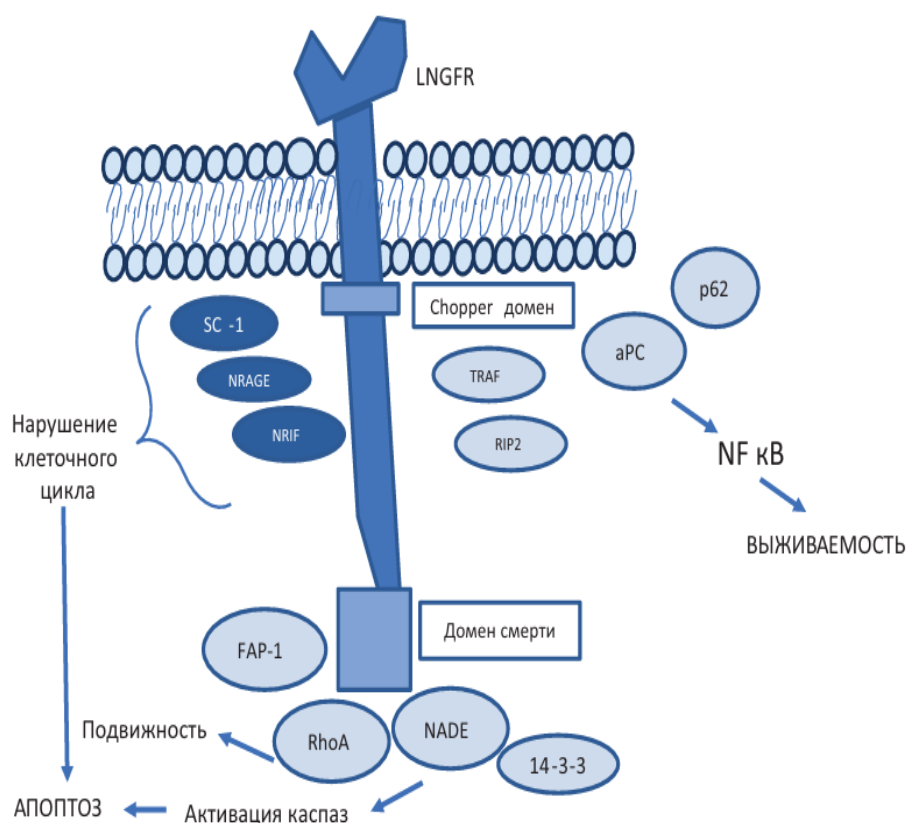
Каждый элемент сигнального каскада, вызванного TrkB, соответствует физиологической функции. PLC γ участвует в гомеостазе Ca^{2+} и экспрессии генов, связанных с пластичностью, например, CREB [45, 67], MAPK влияет на различные аспекты функционирования нейронов, включая дифференцировку и синаптическую пластичность, PI3K/Akt задействован в синтезе белка и участвует в выживании и росте нейронов [67, 167, 174] (Рисунок 1.2).



Примечание: SHC – домен, гомологичный второму домену белка Src, Erk/MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа/киназа, регулируемая внеклеточными сигналами, DAG/PKC – диацилглицерин/протеинкиназа C, PLC γ – фосфолипаза C (гамма), IP3 – инозитол-трисфосфат-3-киназа, PI3K/Akt – фосфоинозитид-3-киназа/серин-треониновая киназа [21, 22].

Рисунок 1.2 – Эффекты BDNF при стимулировании TrkB-рецептора [22]

p75NTR – низкоаффинный мембранный рецептор семейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), известный также как LNGFR (низкоаффинный рецептор фактора роста нервов), который взаимодействует со всеми нейротрофинами. TrkB и p75 рецепторы часто находятся в непосредственной близости на клеточной мембране, однако активация p75NTR может запускать противоположные эффекты: индуцировать апоптоз, ингибировать рост и вызывать долгосрочную депрессию (LTD) синаптической передачи при связывании с про-BDNF, а в комплексе с TrkB-рецептором может модулировать выживание и пролиферацию нейрональных стволовых клеток и влиять на дифференцировку [164] (Рисунок 1.3).



Примечание: аPC – активный протеин C, LNGFR (NGFR) – рецептор фактора роста нервов, NRAGE – гомолог гена, кодирующего антиген меланомы, взаимодействующий с нейротрофиновым рецептором, NRIF – фактор, взаимодействующий с рецептором нейротрофина, NFκB – ядерный фактор каппа В, TRAF – фактор, ассоциированный с рецептором TNF, RIP2 – рецептор серин/треонин-протеинкиназы 2, RhoA – член семейства гомологов Ras A, FAP-1 – Fas-ассоциированная фосфатаза-1 [11, 22].

Рисунок 1.3 – Сигнальные пути p75NTR [22]

Можно выделить три основных молекулярных сигнальных пути p75NTR: путь, опосредованный ядерным фактором каппа В (NF-κB), направленный на рост дендритов и увеличение выживаемости аксонов, путь, опосредованный N-концевыми киназами c-Jun (JNK), который ведет к апоптотической гибели клеток и путь, опосредованный ключевым биомедиатором апоптоза церамидом, который выступает как важный регулятор баланса между выживанием и смертью клетки, опосредуя механизмы апоптоза в ответ на повреждающие факторы [42, 149].

Следовательно, сигнальный путь TrkB, опосредованный BDNF, контролирует различные нейронные функции и участвует в нескольких молекулярных механизмах, которые противодействуют различным патофизиологическим

процессам, имеющим решающее значение для неврологических и психических расстройств. Эти процессы включают: синаптическую регенерацию и поддержание синаптической передачи, иммунную регуляцию против чрезмерной активности астроцитов, аномальное производство медиаторов воспаления и вторичную нейронную регуляцию, изменяющую передачу дофамина и серотонина [141].

Кроме BDNF, другие нейротрофины, в частности, нейротрофин 3 (NT-3), нейротрофин 4 (NT-4), фактор роста нервов (NGF) также играют ключевую роль в поддержании жизнеспособности, росте, дифференцировке и пластичности нейронов во взрослом мозге за счет передачи сигналов TrkB-рецептора через связанную с ним киназную активность, в то время как p75NTR-рецептор в большей степени участвует в апоптозе [42, 164, 167].

1.3. Нейропротекторные свойства мозгового нейротрофического фактора

Взаимодействие BDNF с TrkB-рецептором активирует каскад внутриклеточных мишеней, отвечающих за сохранение структуры нейронов и их восстановление после повреждений. В первую очередь запускаются факторы регуляции транскрипции, такие как актин-связывающие белки, CREB, мишень рапамицина у млекопитающих (mTOR), что обеспечивает защиту ЦНС от дегенеративных процессов и способствует когнитивным функциям, таким как память и внимание. Кроме того, BDNF улучшает ремиелинизацию и способствует нейрогенезу, что важно для восстановления мозга после повреждений, а также при нейродегенеративных заболеваниях [42].

BDNF и сигнальный путь PI3K/Akt участвуют в процессах антиапоптотической активности [104] и снижают апоптоз нейронов при депрессии, когнитивных нарушениях, болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона [55, 71]. Есть сведения о связи тревожного поведения у крыс с сигнальным путем BDNF/TrkB/CREB [171]. При расстройствах аутистического спектра BDNF может смягчать симптомы, регулируя взаимодействия между глутаматными и ГАМК-рецепторами [150]. BDNF способствует созреванию и стабилизации клеточных и

молекулярных структур, участвующих в высвобождении нейротрансмиттеров – дофамина, серотонина, норадреналина и ГАМК, играющих важную роль в поддержании синаптической пластичности и регуляции эмоциональных состояний [141].

Следовательно, BDNF выполняет ключевую роль в нейропротекции, поддерживая структуру и функции нейронов, стимулируя их выживание и регенерацию, а также в поддержании синаптической пластичности и регуляции эмоциональных состояний, однако его эндогенные функции при тревожных состояниях и алкогольной зависимости остаются недостаточно изученными [42].

1.3.1. Анксиолитические свойства мозгового нейротрофического фактора

BDNF является интегральным регулятором нейропластичности с доказанной ролью в нейропротекции и терапии депрессии. В то же время его функции при тревоге, боли и алкогольной зависимости остаются перспективной областью исследований: предварительные данные указывают на сложную контекст-зависимую регуляцию, требующую уточнения в клинических когортах. Тревожные расстройства являются наиболее распространенным типом психических нарушений, характеризующихся высокой заболеваемостью, ранним дебютом, длительностью и сопряженностью с депрессией. В ряде исследований показано, что BDNF оказывает анксиолитическое действие при различных видах стресса у животных [98], а также на модели хронического непредсказуемого легкого стресса [146].

Наиболее чувствительными к эмоциям и страху структурами мозга являются миндалина, префронтальная кора и гиппокамп [217]. Было продемонстрировано, что после воздействия однократного стресса в спинномозговой жидкости крыс значительно снижается уровень BDNF на фоне увеличения экспрессии TrkB в миндалине и префронтальной коре [21, 212]. На экспериментальных животных моделях показано, что локальное увеличение экспрессии BDNF в вентральном гиппокампе способствует анксиолитическому и антидепрессивному эффекту, а

также снижает уровень кортикостерона после стресса [61, 76]. Введение BDNF или стимуляция его продукции, например, с помощью антидепрессантов или физических упражнений, приводит к уменьшению тревожности и улучшению эмоционального состояния [66, 85]. Индивидуальная чувствительность к стрессу и тревожным расстройствам, связанная с гиперреактивностью гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, может быть обусловлена генетическими особенностями, например, полиморфизмом Val66Met [172, 207]. В экспериментах на трансгенных мышах BDNF (Met/Met) было продемонстрировано повышенное тревожное поведение [136], которое не нормализовывалось ингибитором обратного захвата серотонина флуоксетином [67, 142].

Острая стрессовая реакция может временно повышать уровень BDNF, что рассматривается как адаптивный механизм для поддержания когнитивных функций и пластичности мозга. Однако хронический стресс приводит к снижению экспрессии BDNF, особенно в гиппокампе, что ассоциируется с развитием тревожных и депрессивных расстройств. Существует антагонистическая связь между гормоном стресса кортизолом и BDNF. После стрессовой нагрузки наблюдается рост обоих показателей, но затем кортизол подавляет BDNF, что может приводить к развитию патологических изменений при хроническом стрессе. BDNF способствует формированию устойчивости к стрессу, а его снижение увеличивает уязвимость к стресс-индуцированным психическим расстройствам, включая тревожные состояния и посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) [172].

Учеными выдвинута гипотеза, согласно которой снижение уровня BDNF при старении индуцирует дисфункцию ГАМК-ергической нейропластичности, а применение экзогенного BDNF способно снижать тревожные расстройства, обусловленные процессом естественного старения, восстанавливая при этом ГАМК-нейропластичность [44, 186].

Следовательно, BDNF обладает выраженным анксиолитическим действием, опосредуя нейропластичность и устойчивость к стрессу. Его повышение связано с уменьшением тревожности и лучшей адаптацией к стрессу, а снижение – с развитием тревожных и депрессивных расстройств.

1.3.2. Антиаддиктивные свойства мозгового нейротрофического фактора

В последние годы BDNF активно исследуется как регулятор аддиктивного поведения и потенциальная мишень для терапии зависимостей. Его антиаддиктивные эффекты реализуются через сложные сигнальные пути, которые зависят от типа наркотического вещества, локализации в мозге и стадии зависимости.

Этанол, попадая в организм, нарушает работу многих нейротропных факторов: NGF, нейротрофического фактора, выделяемого клетками глии (GDNF), и др. Данные белки, выполняющие регуляторную функцию в различных процессах организма, необходимы для пролиферации нервных клеток, защиты нейронов от неблагоприятных воздействий, а также их нормального функционирования.

Изучение влияния алкоголизма на нейротрофины представляет большой интерес и необходимо для создания новых нейропротекторных терапевтических препаратов, которые могут быть полезны не только при алкоголизме, но и при других токсических поражениях нервной системы, затрагивающих нейротрофические сигнальные пути.

Воздействие этанола и связанные с ним симптомы отмены могут приводить к структурным и функциональным изменениям на синаптическом уровне в различных областях мозга, а также в нейрональных культурах [96, 120]. Исследования показали, что хроническое употребление алкоголя может вызывать апоптоз нейронов в ключевых областях мозга, таких как гиппокамп, который тесно связан со снижением когнитивных способностей, включая обучение и память [129]. При хроническом алкоголизме аберрантная активация пути BDNF-TrkB тесно связана со стрессом эндоплазматического ретикулула, усугубляя повреждение нейронов [56]. В механизмах аддиктивной, в частности, алкогольной зависимости BDNF является ключевым нейротрофином [159, 190].

Снижение нейротрофической активности гиппокампа вследствие хронического воздействия алкоголя впервые было продемонстрировано

M.V. Heaton et al. (1992) [127]. Данное исследование позволило предположить взаимосвязь между функциональной активностью BDNF и алкоголем в мозге взрослого человека. BDNF был идентифицирован как центральный посредник гомеостатического пути, который активируется при остром воздействии алкоголя и способствует снижению чувствительности грызунов к алкоголь-индуцированному поведению [42]. В частности, было показано, что этанол при однократном введении и хроническом употреблении в умеренных дозах, недостаточных для интоксикации (> 80 мг/дл), увеличивает содержание BDNF в стриатуме [116], что приводит к TrkB-опосредованной активации нижележащих сигнальных путей [163, 42].

В экспериментах с нейронными культурами было показано, что этанол влияет на функциональную активность BDNF-опосредованных внутриклеточных сигнальных каскадов. В дорсолатеральном стриатуме и полосатых нейронах BDNF «управляет» алкогольной мотивацией через TrkB-опосредованную активацию MAPK/ERK1/2 сигнального пути [163]. Усиление регуляции нисходящих эффекторных белков, таких как динорфин и рецептор дофамина D₃, способствует поддержанию умеренного уровня потребления алкоголя [97, 158, 159, 162, 202].

В нейронах мозжечковых гранул, наоборот, воздействие этанола уменьшает базальный уровень BDNF и уровень ERK, что указывает на снижение регуляции пути MAPK [128]. Этанол ингибировал BDNF-опосредованную активацию PI3K/Akt и JNK и блокировал BDNF-стимулированную активацию фактора транскрипции AP-1 (активирующий белок-1) в нейронах [128]. Воздействие этанола увеличивало площадь поверхности конусов аксонального роста в пирамидальных нейронах гиппокампа плода на фоне ингибирования индуцированной BDNF активации малых гуанозинтрифосфатаз (GTP-аз) Ras1 и Cdc42, участвующих в росте аксонов [155].

При интенсивном и длительном употреблении этанола BDNF-защитный механизм нарушается, что продемонстрировано в работе M.L. Logrip et al. (2009). BDNF-путь, который активируется после однократного приема этанола, ослабевает к концу 6 недели алкоголизации мышей и не восстанавливает свою защитную функцию после двухнедельного периода алкогольной депривации [159]. Авторы

высказывают мысль, что после отдельных эпизодов употребления алкоголя BDNF действует, чтобы отсрочить или предотвратить начало алкогольной зависимости. Однако дальнейшая эскалация потребления алкоголя может быть связана с нарушением экспрессии BDNF и приводить к сохранению и прогрессированию зависимости [159].

Известно, что предпочитающие алкоголь крысы линии P демонстрируют снижение уровня белка BDNF в прилежащем ядре относительно малопьющих крыс линии NP [218], подтверждая тот факт, что низкая экспрессия BDNF может способствовать более высокому потреблению алкоголя [163].

Мыши, у которых снижена экспрессия BDNF, демонстрируют повышенное потребление алкоголя при неограниченном свободном выборе между этанолом и водой [137] и после периода депривации, а также повышенную алкоголь-индуцированную сенсibilизацию и выраженное предпочтение места, ассоциированное с приемом этанола [185], что также свидетельствует о роли BDNF в снижении алкогольной мотивации [163].

Эти результаты дают основание полагать, что нарушения BDNF-сигнализации могут быть причиной развития аддиктивного поведения, а отсутствие индуцированной алкоголем экспрессии BDNF в дорсальном стриатуме наряду со снижением BDNF в коре и гиппокампе способствуют усилению алкогольной мотивации. Регуляцию функциональной активности BDNF через внутриклеточный ERK1/2 сигнальный путь следует учитывать при выявлении новых кандидатов при разработке лекарственных средств (ЛС) для лечения аддиктивных расстройств, связанных с употреблением алкоголя [163].

К настоящему моменту проведено большое количество исследований, посвящённых данной тематике, в которых установлены нарушения в нормальном функционировании BDNF. Однако существующая литература о влиянии алкоголя на уровень BDNF в крови характеризуется противоречивыми результатами, которые могут быть связаны с разными объектами исследования, вариациями в дизайне, моделях потребления алкоголя, методах измерения BDNF [117].

Исследование, проведенное D. Silva-Peña (2018), показало наличие связи между употреблением алкоголя, когнитивным дефицитом и сниженным уровнем BDNF [54]. Эксперимент проводился на подопытных животных, у которых моделировалась зависимость путем введения алкоголя в течение нескольких недель. Создавались периоды бесконтрольного доступа к алкоголю, которые сменялись ограничением к спирту, что также моделировало абстинентную составляющую алкогольной зависимости. Результаты исследований показали, что концентрация BDNF в плазме крови у алкоголизированных мышей снижена, что можно объяснить уменьшением уровней мРНК, отвечающих за синтез нейротрофинов в гиппокампе крыс, подвергшихся воздействию алкоголя.

В этой работе также было показано нарушение сигнальной системы нейротрофинов, о чем свидетельствует снижение уровня фосфорилированной киназы 2, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK2). Крысы, подвергшиеся воздействию этанола, имели когнитивные нарушения, которые коррелировали с вызванной алкоголем дисфункцией BDNF [54]. Полученные в этом исследовании данные дают нам картину угнетения нейрогенеза и работы естественных нейрорегенеративных механизмов при употреблении алкоголя, в частности, снижение BDNF и NT-3, и повышения апоптотической гибели клеток, о чем свидетельствует увеличение рецепторов p75 [163].

Проведенный мета-анализ также продемонстрировал негативное влияние алкоголя на уровень BDNF независимо от дозы алкоголя [117]. В дополнение к этому следует отметить, что пациенты с положительной семейной историей алкогольной зависимости имеют более низкие средние уровни BDNF в крови [106].

В 2020 г. Os. Flores-Bastías et al. [133] высказали гипотезу о том, что воздействие этанола в подростковом возрасте снижает экспрессию α -меланоцит-стимулирующего гормона (α -MSH) и, следовательно, сигнализацию, опосредованную меланокортиновыми рецепторами (MC4R) в гиппокампе, ослабляя при этом активность BDNF, и вызывая нейровоспаление и снижение нейрогенеза в головном мозге [163]. Данные патологические изменения могут способствовать сохранению предрасположенности к злоупотреблению алкоголем

до зрелого возраста. В связи с этим, активация MC4R посредством α -MSH или синтетическими агонистами может индуцировать экспрессию BDNF для инициации серии процессов, приводящих к снижению потребления алкоголя [133, 163].

Исследования корреляции между алкогольной зависимостью и уровнями BDNF показали, что активация MAPK-пути может предотвратить алкогольную зависимость [73], а введение BDNF в дорсолатеральный стриатум (DLS) приводит к снижению добровольного потребления этанола [123]. В целом можно отметить, что острое или умеренное воздействие алкоголя увеличивает экспрессию BDNF в DLS, а хроническое употребление приводит к снижению BDNF в коре и гиппокампе [42, 159]. Был отмечен интересный факт, что BDNF в миндалине одновременно подавляет как тревожное поведение, так и потребление алкоголя [97]. В то же время острое введение этанола крысам вызывает анксиолитические эффекты в тесте ПКЛ на фоне повышения уровней BDNF как в центральной, так и в медиальной миндалине [42, 120].

Для крыс линии P характерен врожденный тревожный фенотип и снижение экспрессии BDNF в центральной и медиальной миндалине по сравнению с крысами линии NP [42, 205]. Одна инъекция миметика BDNF 7,8-дигидроксифлавона (7,8-DHF) вскоре после отмены алкоголя облегчила тревожное поведение и ослабила вызванное алкоголем усиление активности в пирамидальных нейронах, в то время как K252a – ингибитор тирозинового белка – блокировал эффекты 7,8-DHF [1].

Эти результаты показали, что стимуляция TrkB, опосредованная BDNF, может смягчить воздержание от алкоголя путем нормализации активности нейронов в миндалине [188]. Между тем, введение 7,8-DHF оказывает незначительное влияние на тревожное поведение крыс в открытом поле и ПКЛ во время раннего воздержания [7]. Влияние активации рецептора TrkB на тревожное поведение при воздержании от алкоголя, по всей видимости, варьирует в зависимости от вида грызунов, длительности периода употребления этанола и режима введения 7,8-DHF [20].

Таким образом, в миндалине – важном центре страха и тревоги – BDNF влияет на формирование и модуляцию тревожных реакций, обеспечивая адаптивный ответ на стрессовые стимулы. BDNF-зависимая экспрессия через каскад ERK-CREB/Elk регулирует транскрипцию генов, ответственных за нейрональную пластичность и адаптацию к стрессу, что важно для нормального эмоционально-психического состояния и предотвращения тревожных расстройств [20, 23, 198].

Связь между приемом алкоголя и развитием тревожных состояний подтверждается многочисленными исследованиями. Алкоголь выступает как кратковременный анксиолитик и долгосрочный провокатор тревоги. Во время употребления алкоголя происходит повышение уровня эндорфинов, что временно снижает тревожность и создает ощущение расслабления.

Однако после прекращения приема алкоголя уровень эндорфинов резко падает, вызывая усиление тревожных симптомов, которые могут длиться до 8 часов и более. Хроническое употребление алкоголя влияет на нейромедиаторные системы мозга, включая ГАМК-ергическую, глутаматную, дофаминовую, норадреналиновую и опиоидную системы. Длительное воздействие алкоголя вызывает нарушение синаптической пластичности и функциональное истощение дофаминовой системы, что ведет к дисбалансу нейрохимических процессов, повышению стресс-реактивности и развитию тревожных и депрессивных состояний.

Потребление этанола как единственного источника жидкости в течение 21 дня привело к развитию этаноловой зависимости и тревожного поведения у крыс в тесте ПКЛ во время раннего воздержания, что сопровождалось снижением экспрессии мРНК и BDNF, а также уменьшением числа BDNF-положительных клеток в гиппокампе и ядре [198].

Хроническое потребление алкоголя часто способствует развитию когнитивного дефицита, связанному с BDNF [42]. Так, добровольное потребление этанола в течение трех недель мышами приводило к снижению метилирования гена BDNF в гиппокампе и усилению TrkB-опосредованной активации ERK, Akt и

CREB. В целом можно заключить, что регуляция экспрессии генов BDNF и сигнальных каскадов в гиппокампе выступают реакциями противодействия поведенческим дефицитам, нарушениям обучения и памяти после приема этанола [42, 93].

Таким образом, уровень BDNF повышается при умеренном и снижается при чрезмерном потреблении алкоголя [190]. При этом происходит специфическая структурная перестройка нейронов и наблюдаются поведенческие нарушения. Иницируют ли адаптивные BDNF-опосредованные структурные и функциональные изменения пластичности ЦНС развитие алкогольной зависимости и связанных с ней расстройств или они являются результатом компенсаторных реакций на хроническое чрезмерное потребление алкоголя, предстоит выяснить [42, 121]. Вероятно, BDNF-опосредованная нейропластичность может быть патологической или адаптивной в зависимости от экспериментальных условий: исследуемая область мозга, характер потребления алкоголя, продолжительность алкогольной интоксикации [42].

1.4. Низкомолекулярные миметики мозгового нейротрофического фактора как регуляторы нейропсихотропных функций

Низкомолекулярные дипептидные миметики BDNF – это синтезированные небольшие молекулы, имитирующие его действие. В отличие от полноразмерного белка BDNF, который является макромолекулой с ограниченной проницаемостью через ГЭБ и быстрой деградацией, низкомолекулярные миметики обладают улучшенными фармакокинетическими свойствами, что открывает перспективы для их фармакологического применения.

Низкомолекулярные миметики BDNF впервые были получены исследовательской группой под руководством R. Hughes [177]. Ученые использовали гомологичное моделирование на основе трёхмерной структуры NGF [170] и получили трёхмерную структуру BDNF, которая в дальнейшем была подтверждена рентгеноструктурными исследованиями [21]. Учитывая тот факт,

что химерный NGF с имплантированной 2-й петлей BDNF приобрел способность связываться с TrkB-рецепторами, ученые предположили, что правильно разработанные миметики димерической 2-й петли должны вызвать гомодимеризацию TrkB и, таким образом, имитировать действия BDNF через этот рецептор [21].

Используя данный подход, были разработаны и синтезированы три класса пептидов: бициклические димерные пептиды, связанные внутренним дисульфидным мостиком с последовательностью мономерного моноциклического пептида, бициклический димер, связанный амидной связью с внешней последовательностью пептида 1, трициклические димерные пептиды, содержащие дисульфид и амид [21, 176].

Моделирование молекулярной динамики трициклических димерных пептидов показало, что они обладают значительно сниженной конформационной свободой по сравнению с их бициклическими аналогами, что привело к значительно большему сходству с родной областью 2-й петли BDNF. Трициклические димерные пептиды отличались эффективностью, сравнимой с BDNF, и повышали выживание сенсорных нейронов птенца в культуре. Разработанный подход привел к появлению специфичных конкурентных антагонистов TrkB-рецепторов – пептидных миметиков с низким молекулярным весом BDNF и потенцией, сравнимой с эффектом нативного белка [21, 176].

В дальнейшем на основе наиболее активного циклопептида L2-8 были сконструировали би- и трициклические димерные пептидные миметики 2-й петли BDNF с агонистической активностью TrkB-рецепторами, димеризованные дисульфидной и амидной связями [42]. Димеризацию амидной связью проводили введением в качестве С-концевых участков остатки лизина и глутаминовой кислоты, которые объединяли амидной связью боковых функциональных групп, а димеризацию дисульфидной связью – вводя остатки цистеина в последовательность L2-8 [21].

Изучение эффектов бициклических димеров на первичных культурах сенсорных нейронов зародышей цыплят показало, что соединения дозозависимо

ингибируют эффекты BDNF на выживаемость, являясь, его частичными агонистами-антагонистами [21, 199].

Наряду с мономерными аналогами, были получены димерные миметики петель BDNF, обладающие ингибирующей активностью [21]. В целом было показано, что мономерные моноциклические пептиды и гетеродимерные бициклические пептиды, основанные на 1-й, 2-й и 4-й петлях, являются ингибиторами BDNF, в то время как гомодимерные бициклические пептиды являются агонистами BDNF [21, 42]. Таким образом были получены низкомолекулярные миметики BDNF с агонистической активностью на основе 2-й и 4-й петель нейротрофина [42, 132].

В дальнейшем был разработан новый миметик BDNF, который способствовал усиленной экспрессии миелинового белка и увеличению количества миелиновых аксональных сегментов в олигодендроцитах *in vitro* посредством нацеливания на TrkB-рецептор – трициклический димерический пептид 6 (TDP6) [42]. TDP6 структурно имитирует область BDNF, связывающую данный рецептор, и действует как агонист TrkB, поскольку вызывает аутофосфорилирование TrkB и активирует ERK1/2 в первичных олигодендроцитах [199, 200].

7,8-DHF является зарегистрированным небольшим молекулярным агонистом TrkB, который в настоящее время широко исследован в различных биохимических и клеточных системах [158]. Вещество имитирует биологические функции BDNF, проникает через ГЭБ при пероральном введении [42] и проявляет многообещающую терапевтическую эффективность при депрессии [5, 178] и различных неврологических заболеваниях, включая болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз [6], болезнь Альцгеймера [2, 110], болезнь Хантингтона [194], ПТСР [3, 4].

R13 (7,8-бис(метиламино)карбонил)окси)-2-фенил-4Н-1-бензопиран-4-1) – низкомолекулярный миметик BDNF и пролекарство 7,8-DHF, который привлекает внимание. R13 имеет гораздо лучшую биодоступность и фармакокинетический профиль, чем 7,8-DHF. R13 постепенно высвобождает 7,8-DHF в кровоток, обеспечивая более устойчивый и длительный терапевтический эффект по

сравнению с 7,8-DHF. Этот процесс обеспечивает более высокую концентрацию активного вещества как в плазме крови, так и в головном мозге в течение продолжительного времени, что усиливает фармакологическое воздействие на нервную систему [74, 204, 219].

7,8-DHF связывается с внеклеточным доменом рецептора TrkB, включающим цистеиновый кластер 2, лейцинообразную область и домен Ig2, обозначаемый как TrkB-D5 [42, 143, 195]. Данный миметик показал многообещающие результаты в улучшении пространственной памяти и тревожного поведения после черепно-мозговой травмы путем предотвращения дисфункциональной митофагии [201].

Малая молекула BDNF миметик LM22A-4 может быть новым многообещающим средством не только при нейродегенеративных заболеваниях, но и для регенеративной терапии тканей пародонта, так как фосфорилирует TrkB и стимулирует его связывание адаптерными белками для регулирования сигнального пути ERK и Akt в цементобластах [42, 74].

Был разработан структурный миметик BDNF – циклический пентапептид цикло-[d Pro-Ala-Lys-Lys-Arg] (cyclo-d PAKKR), который содержит трипептидный участок Lys-Lys-Arg, необходимый для взаимодействия с рецептором p75NTR, и не имеющий последовательности 2-й петли BDNF, связывающей TrkB [108]. Разработанный миметик характеризуется низкой молекулярной массой (580 Да) и легко проникает через клеточные мембраны [42]. Его применение способствует выживанию периферических нейронов *in vitro* и миелинизации периферических нервов *in vitro* и *in vivo*, а также на модели демиелинизирующей периферической нейропатии у грызунов [42, 48, 108].

При разработке описанных низкомолекулярных миметиков BDNF были использованы результаты химеризации NGF/BDNF, поиск среди эпитопов моноклональных антител к активным участкам BDNF и данные сайт-направленного мутагенеза с выбором фармакофора и дальнейшим рандомизированным скринингом среди химических библиотек [21, 42].

Основываясь на первоначальной гипотезе о том, что за разнообразные физиологические функции отвечают разные петли нейротрофинов, а боковые

цепочки аминокислотных остатков дипептида центрального фрагмента β -поворота являются «фармакофорными элементами», поскольку они занимают геометрически полезное положение для взаимодействия с рецептором, в Институте фармакологии им. В.В. Закусова (г. Москва) были сконструированы и синтезированы миметики 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF, представляющие мономерные и димерные амиды N-ацильдипептидов [30, 46, 108]. Схема синтеза представлена на примере миметика 2-й петли ГТС-201 (Рисунок 1.4) [44].

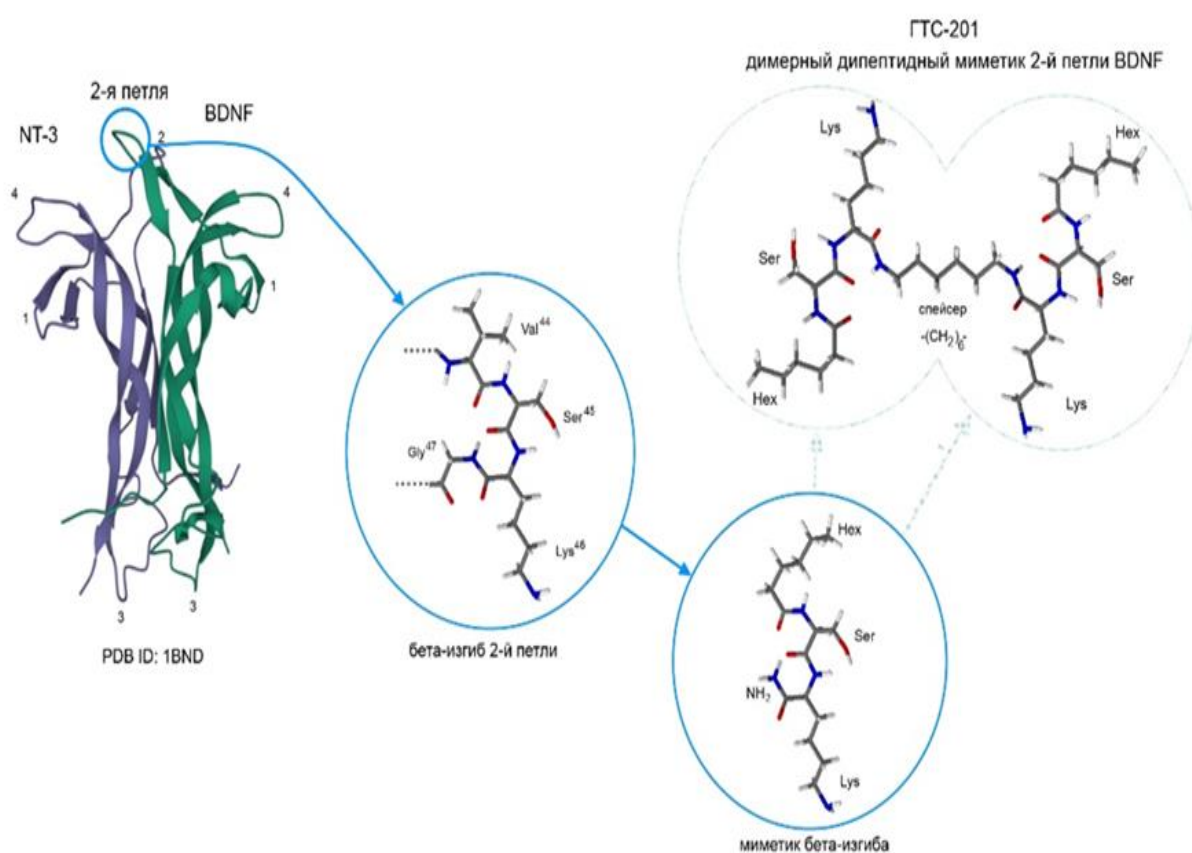


Рисунок 1.4 – Схема дизайна миметика 2-й петли мозгового нейротрофического фактора [44]

Вещества были синтезированы классическими методами синтеза пептидов в растворе и получили лабораторные коды ГСБ-104 (НО-Suc-Ser-Lys-NH₂), ГСБ-106 (НО-Suc-Ser-Lys-NH-(CH₂)₃-2), ГСБ-207 (НО-Suc-Met-Ser-NH₂), ГСБ-214 (НО-Suc-Met-Ser-NH-)₂-(CH₂)₇ и ГТС-201 (Hex-Ser-Lys-NH-)₂(CH₂)₆ [11, 42, 58, 165].

ГСБ-106 – гексаметилендиамид (бис-(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина) – был разработан на основе β -поворота последовательности -Asp93-Ser94-Lys95-Lys96- 4-й петли, которая участвует во взаимодействии BDNF с TrkB-рецептором [21]. Центральный фрагмент β -образного поворота Ser94-Lys95 был включен в состав дипептида. Остаток Asp93 был заменен его биоизостером, остатком янтарной кислоты, а Lys96 был заменен амидной группой. Целью этих двух замен было стабилизировать конформацию и повысить сопротивление соединения к пептидазам. Поскольку BDNF взаимодействует с TrkB в виде гомодимера, два миметика связали с помощью гексаметилендиаминового спейсера [165].

Димерный миметик ГСБ-214 – гептаметилендиамид (бис-(N-моносукцинил-L-метионил-L-серина) – был разработан на основе β -образной 1-й петли BDNF аналогично ГСБ-106 [165]. Селективность взаимодействия ГСБ-106 с TrkB-рецепторами и активация трех сигнальных пострецепторных путей (MAPK/ERK, PI3K/Akt и PLC γ) была показана на HT-22 клетках, нокаутированных по генам TrkA или TrkB [21, 62, 180]. Для ГСБ-214 показана активация *in vitro* только путей PI3K/Akt и PLC γ , что можно объяснить жизненно важной ролью пути PI3K/Akt/mTOR в нейропротекции, синаптогенезе и синаптической пластичности, а также в противодействии апоптозу клеток [62].

Используя культуру иммортализованных нейронов гиппокампа линии HT-22 в условиях окислительного стресса, было показано, что димерные миметики обеих петель демонстрируют нейропротекторную активность, подобно BDNF. Мономерный миметик 1-й петли ГСБ-207 не проявлял активности, а мономерный миметик 4-й петли ГСБ-104 снижал выживаемость нейронов, что подтверждает данные о том, что BDNF активен только в гомодимерной форме [35, 44, 99].

Димерный миметик 4-й петли ГСБ-106 демонстрировал характерную для BDNF антидепрессивную активность у крыс в тесте принудительного плавания [20], на моделях хронического стресса от социального поражения у мышей [162], хронического непредсказуемого легкого стресса у мышей [58], предотвращая нарушения нейрогенеза у стрессовых мышей, корректировал нарушения обучения

и памяти, а также опорно-двигательного аппарата и поискового поведения у крыс на моделях депрессии [42, 83].

На модели ишемического инсульта ГСБ-106 проявлял нейродегенеративные свойства в клинически значимом временном окне (24 ч), восстанавливал нарушенный нейрогенез и/или глиогенез в гиппокампе и стриатуме [21], а также полностью восстанавливал пониженную иммунореактивность синаптических маркеров синаптофизина и белка полисинаптической плотности (PSD-95) в стриатуме [169] и CREB в гиппокампе головного мозга крыс [99]. На модели оксидативного стресса клеток гиппокампа мыши линии НТ-22 миметик 4-й петли BDNF проявлял нейропротекторный эффект в более низких концентрациях по сравнению с миметиками на основе 1-й и 2-й петель, как при применении за 24 часа до повреждения, так и сразу после деструктивного воздействия [41].

Было выявлено, что антидепрессивная активность ГСБ-106 сохраняется при пероральном введении и превышает эффективность amitриптилина, являющегося «золотым стандартом» в лечении депрессии [60]. Для соединения ГСБ-106 были выявлены слабая антидиабетическая [63] и анальгезирующая активности [114].

Предполагается, что антидепрессивная активность BDNF связана с 4-й петлей [107]. В дальнейшем было показано, что для нейропротекторной активности решающее значение имеют остатки лизина и их конфигурация [197]. Было установлено, что для ГСБ-106 и ГСБ-214 характерны разные пострецепторные сигнальные паттерны. ГСБ-106 повышал уровень фосфорилирования ERK и Akt, тогда как ГСБ-214 увеличил только уровень фосфорилирования Akt.

Применение ГСБ-106 или ГСБ-214 после экспериментального инсульта у крыс, вызванного окклюзией средней мозговой артерии, снижало размер очагов инфаркта головного мозга и улучшало неврологические исходы, при этом выраженность эффекта ГСБ-106 была выше, чем у ГСБ-214 [20]. В то же время антидиабетический эффект, оцениваемый по степени гипергликемии и динамики массы тела у мышей C57Bl/6, был типичным для миметика ГСБ-214, который избирательно активирует PI3K/Akt [63]. ГСБ-214 также предотвращал нарушение памяти в крысиных моделях болезни Альцгеймера [48]. Более выраженные

эффекты ГСБ-106 можно объяснить фундаментальной ролью пути MAPK/ERK в нейрогенезе и нейропластичности, которые являются ключевыми факторами в восстановлении после инсульта [165].

Молекула ГТС-201 состоит из двух идентичных дипептидных цепочек Ser-Lys, каждая из которых ацилирована гексановой кислотой (гексаноил), а димеризация обеспечена гексаметилендиамидом (6 атомов углерода в линкерной цепи), соединяющим аминогруппы лизина из двух дипептидов. Подобная имитация 2-й петли BDNF обеспечивает селективную активацию рецептора TrkB и последующее включение сигнальных путей MAPK/ERK, что проявляется выраженным нейропротекторным эффектом [42].

ГТС-201 активировал сигнальные пути MAPK/ERK и PLC γ , не влияя на Akt, вследствие чего проявлял нейропротекторную активность без антидепрессивного действия [40, 48, 62]. Нейропротективные свойства ГТС-201 связаны с его способностью противодействовать клеточному апоптозу посредством активации TrkB-зависимых механизмов, включая инактивацию проапоптотического BAD белка и подавление каспаз 9 и 3/7 [113].

Таким образом, изучение низкомолекулярных миметиков BDNF представляет перспективное направление в разработке нейропротективных препаратов. Их высокий терапевтический потенциал обусловлен избирательной модуляцией рецепторов TrkB и p75NTR, активацией жизненно важных сигнальных каскадов и возможностью перорального применения. Современные синтетические методы и углубленное понимание структуры BDNF позволяют создавать миметики с заданными свойствами и высокой избирательностью действия. Однако для клинического применения необходимы дальнейшие глубинные исследования безопасности, эффективности и оптимальных путей доставки подобных соединений.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Экспериментальные животные

Эксперименты проведены на грызунах: половозрелых нелинейных белых крысах обоего пола (n = 69, самцы, n = 81, самки), половозрелых крысах-самцах Wistar (n = 108), мышах-самцах CD-1 (n = 296), инбредных мышах-самцах линий BALB/c (n = 244), C57Bl/6 (n = 47) и DBA2 (n = 48). Животные были получены из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая» и имели ветеринарный сертификат.

Распределение животных по видам исследования представлено в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Распределение животных по видам исследования

Исследования	Животные		Количество, пол	
	крысы	мыши	крысы	мыши
Анксиолитическое действие миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF		CD-1		128, ♂
Анксиолитическое действие ГТС-201	нелинейные	BALB/c	18, ♂ 26, ♀	39, ♂
Вращающийся стержень		BALB/c		120, ♂
Этаноловый наркоз		CD-1		168, ♂
Алкогольная мотивация	нелинейные		51, ♂ 55, ♀	
Спонтанная двигательная активность		C57Bl/6		47, ♂
Поведенческая сенсibilизация		DBA/2		48, ♂
Фармакокинетические и метаболомные исследования	Wistar		108, ♂	
Изучение механизма действия		BALB/c		85, ♂

Эксперименты проводились после 14-дневного карантина в вивариях НИИ фармакологии имени В.В. Закусова ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» и ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет). Условия содержания животных соответствовали ГОСТам 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» и 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».

Крыс содержали в клетках 600x400x210 мм по 6–8 особей, мышей – в клетках 370x200x150 мм по 10–12 особей при свободном доступе к воде и брикетированному корму. На всем протяжении эксперимента поддерживалась температура 21–23° С, относительная влажность воздуха 40-60%, световой режим регулировался 12 ч свет/12 ч темнота для поддержания нормальных циркадных ритмов животных [44].

Все работы выполнены в соответствии с нормами обращения с лабораторными животными на основе стандартных операционных процедур, международными правилами European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/ЕЕС), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» и Локальным этическим Комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) (Протокол № 25-22 от 08.12.2022 г.).

2.2. Дизайн экспериментального исследования

Выполненное нами исследование включало несколько этапов.

На *первом этапе* был составлен план диссертационной работы, проведен анализ зарубежных и отечественных литературных источников, была выдвинута гипотеза, определены цель, задачи, методы исследования, получены результаты этической экспертизы.

На *втором этапе* оценивали анксиолитическое действие и влияние низкомолекулярных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF на алкогольную мотивацию у грызунов с определением наиболее активного соединения.

На *третьем этапе* выявляли побочные эффекты соединения-лидера на общую двигательную активность, миорелаксацию, лекарственное взаимодействие с этанолом у грызунов.

На *четвертом этапе* были разработаны и валидированы методики количественного определения соединения-лидера и эндогенных метаболитов в образцах крови и головного мозга крыс методом ВЭЖХ-МС/МС.

На *пятом этапе* определяли фармакокинетические показатели ГТС-201, на *шестом* – возможные пути механизма анксиолитического действия ГТС-201.

На заключительном, *седьмом этапе* работы статистическими методами обрабатывали полученные данные, обобщали результаты, формулировали выводы (Рисунок 2.1).

2.3. Исследованные химические соединения, референтные средства и реактивы

Субстанции низкомолекулярных димерных дипептидных миметиков BDNF на основе β -изгибов петель сконструированы и синтезированы в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (Таблица 2.2)¹.

В нашем исследовании были использованы следующие *химические вещества и реактивы*:

– спирт этиловый ректифицированный из пищевого сырья «Экстра» (ГОСТ Р 51652-2000);

¹Выражаем благодарность сотрудникам лаборатории пептидных биорегуляторов кандидату химических наук Н.М. Сазоновой и профессору Т.А. Гудашевой за синтез и предоставление активной фармацевтической субстанции миметиков BDNF (соединений ГСБ-214, ГСБ-106 и ГТС-201).

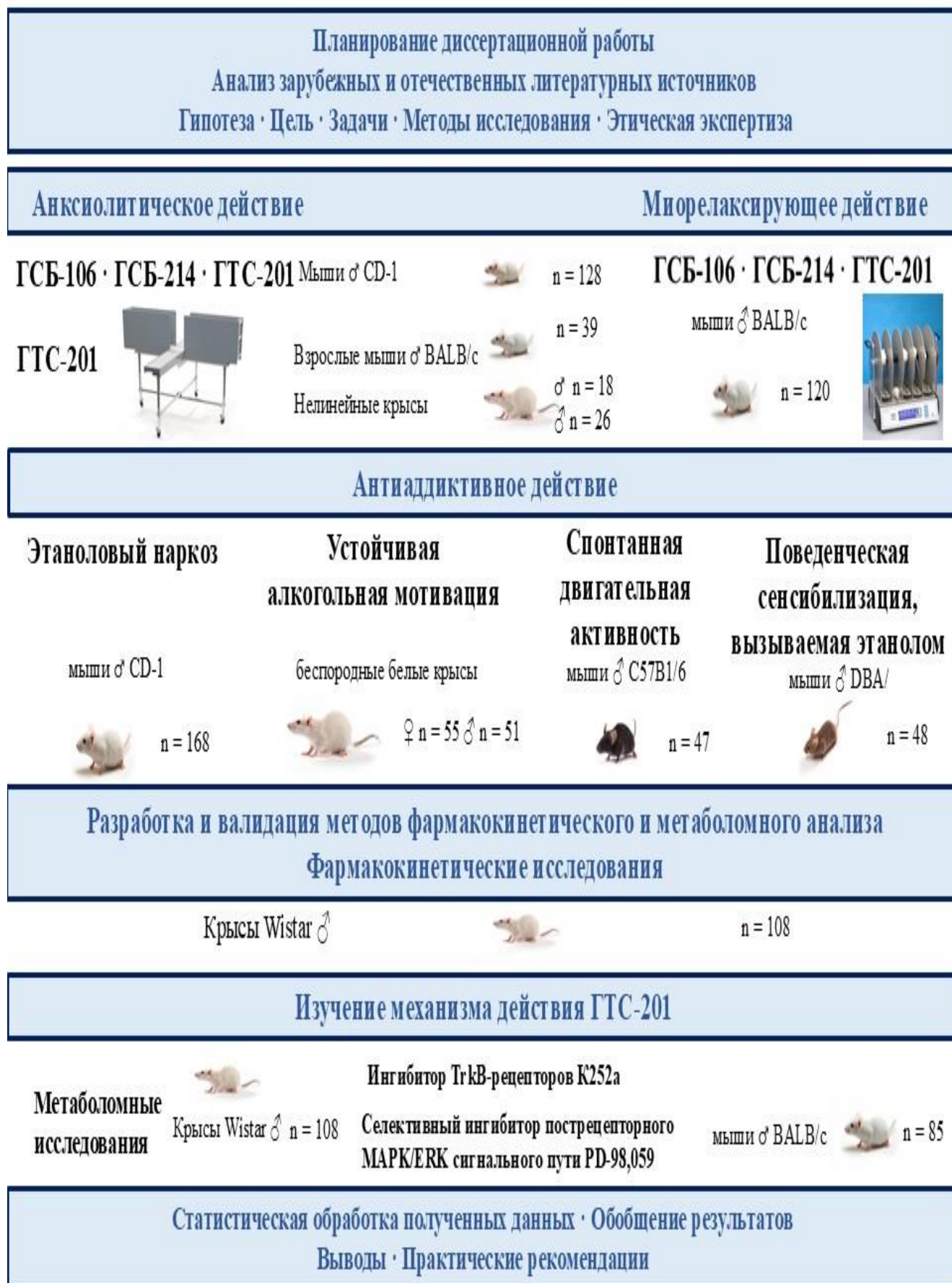


Рисунок 2.1 – Дизайн экспериментального исследования

Таблица 2.2 – Исследованные миметики BDNF

Шифр соединения	Химическое название	Петля BDNF	Физические свойства
ГСБ-214	гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил- L-метионил-L-серина)	1-я (-D ₃₀ -M ₃₁ -S ₃₂ -G ₃₃)	[α] 25D = + 9,0° (с 0,4, ДМФА) т. пл. 162–163 °С
ГТС-201	гексаметилендиамид бис-(N-гексаноил-L- серил-L-лизина)	2-я (-V ₄₄ -S ₄₅ -K ₄₆ -G ₄₇)	[α]24,5D -14,9° (с 0,6, MeOH) τ = 12,00 мин т. пл. 110–125 °С
ГСБ-106	гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил- L-серил-L-лизина)	4-я (-D ₉₃ -S ₉₄ -K ₉₅ -K ₉₆ -)	[α]21D = - 42,3° (с 0,1, H ₂ O) т. пл. 153–161 °С

– релизинг-пептид гормона роста 2 (GHRP-2) (D-Ala-D-(β-нафтил)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂, Pralmorelin, 97% чистоты по HPLC) – в качестве внутреннего стандарта (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США);

– стандартные растворы ГАМК, дофамина, кинуренина, серотонина, триптофана, норадреналина, норметанефрина, метанефрина, триптамина, эпинефрина, хинолиновой кислоты, индол-3-пропионовой кислоты, индол-3-молочной кислоты, индол-3-уксусной кислоты, индол-3-карбоксальдегида, индол-3-масляной кислоты, ксантуреновой кислоты, кинуреновой кислоты, 5-гидроксииндолуксусной кислоты, кортизола, антраниловой кислоты, 5-гидрокситриптофана, триптофола, 5-метокситриптамина, N-ацетил-5-гидрокситриптамина, α-метил-DL-триптофана, 3-гидроксиантраниловой кислоты, 5-гидрокситриптофола, 5-гидрокситриптофана, N-метилсеротонина, 3-гидроксикинуренина (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) [152];

– изотопно-меченые стандарты гас-кинуренин-d₄, норметанефрин-d₃, допамин-d₄, DL-индол-3-молочная кислота-d₅, индол-3-масляная кислота-d₄, 2,3-

пиридиндикарбоновая кислота-d3, рас-3-гидроксикинуренин 13C2, 15N гидрохлорид, 3-гидроксиантраниловая кислота-d3, индол-3-карбоксальдегидная кислота-13C8, 5-гидроксииндол-3-уксусная кислота-d5, L-триптофан-d5, индол-3-уксусная кислота-d4, серотонин гидрохлорид-d4, индол-3-пропионовая кислота-d2, ГАМК-d6, ксантуреновая кислота-d4, кинуреновая кислота-d5 (Toronto Research Chemicals, Норт-Йорк, Онтарио, Канада) [152];

– метанол, бычий сывороточный альбумин (BSA), фосфатно-солевой буфер (PBS буфер), аскорбиновая кислота (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) [152];

– картриджи с полимерной обращенной фазой Strata-X 33 мкм 60 мг/3 мл (Phenomenex, Торранс, Калифорния, США) [152];

– ацетонитрил (Chromasolv);

– метанол для ВЭЖХ (Thermo Fisher Scientific Inc., Мадрид, Испания);

– муравьиная кислота о.ч. (Fluka, Steinheim, Германия);

– вода высшего качества (18 МОм·см) получена с использованием системы очистки воды Milli-Q (Merck KGaA, Дармштадт, Германия) [152];

– блокатор TrkB рецепторов K-252a (субстанция, CAS # 99533-80-9, Sigma Aldrich, США) [24];

– ингибитор пострецепторного MAPK/ERK сигнального пути PD-98,059 (субстанция, Sigma-Aldrich) [24];

– диазепам (субстанция, ФГУП «Московский эндокринный завод»)²;

– налоксон (субстанция, Sigma) – стандартный препарат для фармакотерапии алкогольной зависимости, снижающий формирование этанол-индуцированной поведенческой сенсibilизации (ЭИПС) [95].

²Выражаем благодарность сотруднику лаборатории лекарственной токсикологии А.В. Надоровой за помощь в проведении экспериментов с диазепамом, работа с которым проводилась в соответствии с Лицензией ФИЦ «ФГБНУ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» на осуществление деятельности по обороту наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, культивированию наркосодержащих растений № ЛО17-01137-77/00146453 от 06.06.2017.

Калибровочные стандарты для определения ГТС-201. Исходные растворы ГТС-201 и GHRP-2 готовили в 10% метаноле с концентрацией 1,0 мг/мл и выдерживали при -70 °С. Рабочие растворы готовили путем разбавления исходного раствора 10% метанолом в воде для калибровочной кривой и подготовки образцов для контроля качества (QC). Соответствующее количество рабочего раствора добавляли к ранее отобраным образцам плазмы крыс при 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 500 и 1000 нг/мл для получения восьми калибровочных образцов. Образцы для контроля качества готовили при четырех концентрациях: 0,5; 1,5; 400 и 750 пг/мл с использованием стандартных рабочих растворов. Концентрация GHRP-2 составляла 1000 нг/мл [152].

Калибровочные стандарты для метаболитов, связанных с нейротрансмиссией и метаболизмом триптофана. Для приготовления и разбавления стандартных растворов, калибраторов, нулевых и пустых растворов был приготовлен раствор разбавителя (разбавитель А), состоящий из 10% раствора метанола в деионизированной воде с добавлением 0,02% аскорбиновой кислоты. Исходные стандартные растворы анализируемых веществ и внутренних стандартов с концентрацией 10 мМ готовили в 50% метаноле во флаконах из темного стекла и хранили при -70 °С.

Рабочие растворы с концентрациями в диапазоне от 0,1 до 100 нМ получали путем разбавления исходных растворов разбавителем А. Для получения калибровочных растворов необходимое количество рабочего раствора анализируемых веществ добавляли в суррогатную матрицу, состоящую из 2% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в фосфатно-солевом буфере (PBS) [152].

Подготовка образцов. Полимерные картриджи с обращенной фазой Strata X (33 мм, 60 мг, 3 мл, Phenomenex Co., Торренс, Калифорния, США) использовались для твердофазной экстракции (ТФЭ) ГТС-201 и нейротрансмиттеров. Картриджи промывали 1 мл 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле и 1 мл метанола и после уравнивали 1 мл воды.

К 100 мкл образцов плазмы или гомогенатов головного мозга добавляли 10 мкл раствора GHRP-2 1000 нг/мл и 10 мкл раствора, содержащего внутренние

стандарты (ISTD, Internal Standard) для анализа нейротрансмиттеров. Затем образцы загружали в картриджи SPE, промывали 1 мл воды и элюировали 1 мл 0,1% муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил–метанол (1:1, в/в). Элюаты выпаривали досуха с использованием центробежного вакуумного концентратора, поддерживаемого при 25 °С, и восстанавливали в 100 мл 10% метанола в воде для последующего инструментального анализа [152].

2.4. Методы исследования

2.4.1. Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Уровень тревожности животных определяли в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) в соответствии с методикой, описанной ранее для мышей [156] и крыс [210]. Установка ПКЛ (НПК Открытая Наука, Россия) – конструкция из непрозрачного матового вспененного поливинилхлорида, состоящая из центральной площадки и четырех лучевидных рукавов, два из которых снабжены боковыми и торцевыми стенками [11].

При тестировании крыс и мышей арену крестообразного лабиринта приподнимали на высоту 50 и 30 см от пола соответственно. Подъем на такую высоту исключает спрыгивание животных на пол. Животных помещали на центральную площадку лабиринта и в течение 300 секунд (сек) фиксировали продолжительность нахождения в открытых рукавах (ОР), число заходов в ОР и закрытые рукава (ЗР) [44].

Время нахождения и число заходов в ОР рассчитывали по формулам и выражали в процентах (%) от общей продолжительности тестирования и общего числа заходов в ОР и ЗР соответственно:

$$\text{время в ОР в \%} = (\text{время в ОР сек} / 300 \text{ сек}) \times 100\%,$$

$$\text{число заходов в ОР в \%} =$$

$$(\text{число заходов в ОР} / \text{общее число заходов в ОР и ЗР}) \times 100\% [44].$$

Наличие анксиолитического эффекта определяли по увеличению количества заходов и времени нахождения в ОР при отсутствии изменений двигательной активности (общее число заходов в ОР и ЗР) [30, 59, 44].

2.4.2. Оценка спонтанной двигательной активности

Спонтанную двигательную активность мышей регистрировали в актометре OPTO VARIMEX 4 (Columbus Instruments, USA), который представляет собой квадратную плексигласовую арену со сторонами 42×42 см и высотой 20 см [29]. По периметру арены на высоте 2 см от пола расположены чувствительные оптоэлектронные датчики ($\lambda = 875$ нм), которые автоматически поминутно регистрируют параметры двигательной активности животных и передают их на соединенный с компьютером блок управления [29].

Показатели спонтанной двигательной активности: пройденное расстояние (см), продолжительность состояния покоя и стереотипного поведения (сек), вертикальную активность (условные единицы) регистрировали в течение 10 мин после помещения животного в актометр [29, 30].

2.4.3. Тест «Вращающийся стержень»

Тест «Вращающийся стержень» (Rota-Rod, Ugo Basile) позволяет оценить влияние изучаемых соединений на моторную функцию и координацию движений животных. Установка Rota-Rod для мышей (габариты 46x28x33 см, ДxШxВ) представляет собой стержень шириной 5,8 см и диаметром 3 см, приподнятый на высоту 16 см. Скорость вращения стержня регулируется от 3 до 80 об/мин с шагом 1 об/мин (уровень шума < 60 дБ).

Способность мышей сохранять равновесие и находиться на вращающемся стержне расценивается как отсутствие миорелаксации. Сокращение времени удержания на вращающемся стержне свидетельствует о наличии

миорелаксирующего действия изучаемых веществ. В эксперименте использовали мышей линии BALB/c, которые прошли предварительный отбор и удерживались на вращающемся с ускорением стержне минимум до 12 об/мин.

2.4.4. Тест «Этаноловый наркоз»

Для развития алкогольного наркоза мышам CD-1 вводили 25% раствор этанола в тестовой дозе 5,5 г/кг, в/б [32]. Изучаемые вещества вводили в/б через 15 мин после этанола, а контрольной группе животных – изомерное количество растворителя, используемого для изучаемых веществ. Время наступления и окончания сна фиксировали по принятию «бокового положения» и самостоятельному устойчивому выходу из него соответственно [32, 163].

Объем вводимого раствора этанола (V) рассчитывали по формуле:

$$V \text{ (мл)} = D \text{ (г/кг)} \times M \text{ (г)} / 250,$$

где D – тестовая доза этанола, M – масса животного.

Данный тест является чувствительным к температуре окружающей среды и физиологическому состоянию животных [30, 163]. Следует учитывать, что продолжительность алкогольного наркоза может варьировать при сезонных колебаниях и использовании популяций животных из разных питомников [37].

2.4.5. Формирование алкогольной мотивации

Влечение к этанолу моделировали путем принудительной алкоголизации животных с предоставлением 10% раствора этанола в качестве единственного источника питья в течение 24–29 недель. Количество алкоголя, потребляемое крысами в сутки, составляло более 3 г/кг в пересчете на этанол [37].

Изменение массы тела и количество потребляемого этанола регистрировали еженедельно.

2.4.6. Оценка среднесуточного потребления раствора этанола

Среднесуточное потребление этанола из расчета на 1 кг веса животных в сутки определяли путем предоставления неограниченного доступа к воде и раствору этанола выбранной концентрации в течение 24 ч в сутки [37]. Данная методика позволяет оценить мотивационный компонент алкогольного поведения, поскольку усилия, необходимые для получения этанола, минимальны [32].

2.4.7. Оценка алкоголь-депривационного эффекта

После формирования алкогольной мотивации у крыс использовали методику добровольной алкоголизации с предоставлением выбора между 10% этанолом и водой на протяжении 24 ч в сутки в течение 7 дней с последующей оценкой алкоголь-депривационного эффекта (АДЭ) – реакции на повторное предоставление свободного доступа к алкоголю в период абстиненции в виде временного увеличения его потребления по сравнению с предшествующим алкогольной депривации периодом [32]. Данный тест позволяет количественно оценить уровень добровольного потребления спирта после алкогольной депривации [32].

Опытные и контрольные группы животных были сформированы с учетом массы тела и количества потребляемого алкоголя. Крыс, находящихся в индивидуальных клетках с двумя поилками, содержащими 10% раствор этанола и воду, лишали поилки со спиртом. Спустя 48 ч животным вновь предоставляли раствор этанола и оценивали добровольное потребление алкоголя [32, 163].

Количество жидкостей в поилках после предоставления этанола измеряли через 90 мин и каждые последующие 24 ч после начала индивидуального теста. Подсчитывали потребление спирта и воды, выражающееся в г/кг/час. Количество потребляемого этанола из расчета на 1 кг веса животного в сутки рассчитывали по формулам:

$$\text{АДЭ, г/кг} = \frac{m \text{ АДЭ 90 мин (этанол), г} * 80}{m \text{ (крысы), г}}$$

$$\text{Потребление этанола, г/кг в сутки} = \frac{m \text{ АДЭ 24 часа (этанол), г} * 80}{m(\text{крысы}), \text{ г}}$$

где 80 – удельный вес 96% этилового спирта (0,8033 г/см³), выраженный в %.

$$\begin{aligned} & \text{Предпочтение этанола, \%} \\ & = \frac{m \text{ АДЭ 24 часа (этанол), г} * 100\%}{m \text{ АДЭ 24 часа (этанол), г} + m \text{ АДЭ 24 часа (вода), г}} \end{aligned}$$

Оценивали амплитуду АДЭ в виде разницы между темпом потребления алкоголя в первые 90 мин до и после депривации, а также скорость восстановления потребления алкоголя до значения, соответствующего уровню перед лишением алкоголя [32, 163].

2.4.8. Оценка этанол-индуцированной гиполокомоторной реакции

Снижение спонтанной двигательной активности, вызванное этанолом, моделировали в соответствии с ранее описанной методикой [11] у мышей-самцов линии C57Bl/6. Двигательную активность регистрировали в актометре ОРТО VARIMEX 4 (Columbus Instruments, USA) непрерывно в течение 20 мин [29].

2.4.9. Формирование поведенческой сенсibilизации

к этанолу

Под действием этанола наблюдается развитие поведенческой психомоторной сенсibilизации в виде прогрессивного увеличения двигательной реакции в ответ на повторное предъявление этанола [196]. Этот феномен может рассматриваться как проявление нейроадаптивных изменений, возникающих на ранних и рецидивирующих этапах формирования алкогольной зависимости.

Повышенная чувствительность к острому стимулирующему действию алкоголя рядом авторов рассматривается как усиление позитивных субъективных эффектов этанола [187], которые ослабляются налоксоном [95].

Этанол-индуцированную поведенческую сенсibilизацию (ЭИПС) моделировали согласно ранее описанной методике [17] у мышей-самцов линии DBA/2, которые обладали чувствительностью к стимулирующему действию этанола и не отличались по фоновым значениям общей двигательной активности [29]. Спонтанную двигательную активность мышей регистрировали в 0 (фон), 1 и 9 день эксперимента в актометре OPTO VARIMEX 4 (Columbus Instruments, USA) непрерывно в течение 10 мин [29].

2.4.10. Фармакокинетические и метаболомные исследования

Для изучения фармакокинетических свойств ГТС-201 и изменений метаболомики крысам вводили ГТС-201 в дозе 5 мг/кг, в/б. Животные контрольной группы получали эквивалентный объем физиологического раствора. Крыс выводили из эксперимента с помощью CO₂-камеры через 15, 30, 45, 60 мин, 2, 3, 4, ч после инъекции. Кровь и мозг животных были получены сразу.

Образцы крови собирали в пробирки, содержащие антикоагулянт этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА). Образцы немедленно центрифугировали, 990 мкл плазмы крови переносили в чистую пробирку с последующим добавлением 10 мкл 13 мМ раствора бисульфита натрия для предотвращения окисления нейротрансмиттеров. Полученные образцы хранили при температуре -80 °С [152].

Мозг быстро удаляли и помещали в ледяной PBS. После этого образцы мозга без мозжечка гомогенизировали, 700 мкг образцов смешивали с 700 мкл физиологического раствора и 10 мкл 13 мМ раствора бисульфита натрия, затем гомогенизировали с использованием гомогенизатора Fast Prep-24. Полученные образцы хранили при температуре -80 °С [152].

К взвешенным замороженным навескам мозговой ткани массой 50–100 мг добавляли ледяную 0,1% М муравьиную кислоту в воде в количестве 10 мл/мг ткани. Внутренние стандарты добавляли по 1 нг каждого на 1 мг ткани. Затем ткани гомогенизировали на льду с использованием ультразвука в течение 30 с и центрифугировали при 13000 об/мин при 48 °С в течение 7 мин. Нейротрансмиттеры экстрагировали из аликвот по 200 мкл супернатанта с использованием ТФЭ [152].

Анализ ВЭЖХ-МС/МС проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1290 Infinity II, соединенным с tandemным масс-спектрометром 6450C (Agilent Technologies, Паоло-Альто, Калифорния, США). Хроматографическое разделение осуществляли с использованием колонки Discovery PFP HS F5 2,1x150, 3 мкм (Supelco Inc, США) при температуре колонки 40 °С и скорости потока 0,4 мл/мин [20]. Подвижные фазы включали 0,1% водный раствор муравьиной кислоты (фаза А) и ацетонитрила (фаза В) [19, 152].

Программу градиента устанавливали следующим образом: 0 мин – 1% В, 4 мин – 10% В, 9 мин – 90% В, 10 мин – 90% В, 12 мин – 1% В [38]. Ионизацию электрораспылением проводили в положительном режиме, за исключением определения триптофана. Основные параметры MS включали: расход газа – 8 л/мин, давление газа в распылителе – 20 psi, температура осушающего газа – 300 °С, расход газа в оболочке – 10 л/мин, капиллярное напряжение – 3500 В [38]. Анализируемые вещества детектировались с использованием мониторинга множественных реакций (MRM) [152].

2.4.11. Валидация разработанных методов

Валидацию разработанных методов проводили согласно «Требованиям к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов» (Приложение № 6 к Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза) и Решения Коллегии Евразийской экономической комиссии

от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов» [38].

При валидации оценивали селективность, нижний предел количественного определения (НПКО), линейность, степень извлечения и эффект матрицы, правильность и прецизионность, стабильность [38].

Селективность и специфичность разработанной методики считали приемлемой для дифференцированной оценки исследуемого вещества в том случае, если на хроматограммах исследуемых холостых образцов подготовленной биологической матрицы отсутствовали интерферирующие пики с временем удерживания, характерным для данного вещества. Для оценки селективности использовали холостые образцы биологической матрицы, полученные от независимых источников [38].

Для описания зависимости отклика измерительной (хромато-масс-спектрометрической) системы от концентрации исследуемого вещества в биологической матрице строили градуировочные кривые с использованием свежеприготовленных градуировочных стандартных образцов (калибраторов), для приготовления которых использовали холостые образцы биологической матрицы с добавлением известных концентраций исследуемого вещества [38].

Градуировочную кривую строили на основе анализа 8 калибраторов. При приготовлении калибраторов стремились к тому, чтобы они охватывали весь диапазон ожидаемых (рабочих) концентраций исследуемого вещества в исследуемых биологических образцах и были равномерно распределены по нему. В дополнение к калибраторам использовали холостой образец биологической матрицы (обработанный образец матрицы без исследуемого вещества), который не учитывали при расчете параметров градуировочной кривой [19].

Методом наименьших квадратов с помощью программного обеспечения MassHunter (Agilent, США) строили градуировочную кривую и оценивали параметры линейной регрессии: коэффициент корреляции (r), угол наклона градуировочной кривой (a) и свободный член (b , пересечение градуировочной

кривой с осью y). Градуировочную кривую считали приемлемой для фармакокинетических исследований при коэффициенте корреляции не менее 0,990 и экспериментально рассчитанных концентрациях калибраторов в пределах 15% от номинальных [43].

Оценку правильности и прецизионности разработанной методики проводили с использованием образцов QC, которые готовили независимо от калибраторов путем добавления известного количества исследуемого вещества к холостым образцам биологической матрицы. Для приготовления образцов QC использовали отдельно приготовленные исходные растворы исследуемого вещества [38].

Правильность и прецизионность оценивали для значений образцов QC, полученных в пределах одного цикла и между циклами. Правильность и прецизионность оценивали путем анализа в одном аналитическом цикле набора образцов QC на четырех уровнях концентрации. Каждый образец QC анализировали при шести измерениях [38].

По уравнению градуировочной кривой определяли экспериментально рассчитанную концентрацию исследуемого вещества в образцах QC и сравнивали с номинальным значением. Значение правильности выражали как отношение экспериментально рассчитанной концентрации образца QC к номинальной концентрации, выраженное в процентах.

Значение прецизионности характеризовали величиной относительного стандартного отклонения (RSD) – отношение стандартного отклонения к среднему, выраженное в процентах. Средняя концентрация исследуемого вещества в образцах QC должна быть в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений, за исключением образца LLOQ, для которого предельное значение не должно превышать $\pm 20\%$. Значения RSD внутри цикла и между циклами не должны превышать $\pm 15\%$ для образцов QC, за исключением образца LLOQ, для которого значения RSD не должны быть более $\pm 20\%$ [19].

Оценку степени извлечения и эффекта матрицы для вещества проводили с использованием образцов с концентрацией определяемого вещества, соответствующих LQC и HQC, приготовленных с использованием 6 холостых

образцов биологической матрицы, полученных из различных источников. Среднее значение RSD степени извлечения и эффекта должно быть не более 15%.

Стабильность оценивали с применением образцов QC, которые анализировали сразу после приготовления и хранения в предназначенных условиях. Содержание исследуемого вещества определяли с помощью калибровочных кривых, полученных с применением свежеприготовленных калибраторов. Значения концентрации исследуемого вещества сравнивали с номинальными значениями.

Стабильность оценивали для рабочих растворов исследуемого вещества и биологических образцов, которые: 1) хранились 6 ч при комнатной температуре, 2) подвергались 3 циклам размораживания-оттаивания, 3) хранились 30 дней в условиях глубокой заморозки при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4) хранились 24 ч в автосамплере хромато-масс-спектрометрической системы при температуре $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ [19, 38, 152].

2.4.12. Анализ данных

Расчет фармакокинетических параметров проводили при помощи программного обеспечения Phoenix WinNonLin 8.3 (Версия 8.3.4.295, Certara, США) модельно-независимым методом на основании концентрации вещества, измеренной в биологических образцах валидированным методом [183].

Были определены следующие фармакокинетические параметры: максимальная концентрация вещества за период наблюдения (C_{\max}), площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» от момента введения вещества до окончания периода наблюдения ($AUC_{0 \rightarrow t}$), константа скорости выведения (K_{el}), среднее время пребывания в организме вещества (MRT), кажущийся объем распределения (Vd/F), общий клиренс (Cl/F), время достижения максимальной концентрации (C_{\max}) вещества (T_{\max}) и биодоступность для головного мозга [38].

Все данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (Mean \pm SD) [152].

2.4.13. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.) с использованием U-критерия Манна-Уитни, однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим применением критерия Дункана, t-критерия Стьюдента для независимых групп и зависимых переменных. Критический уровень значимости $\alpha = 0,05$. Данные были представлены в виде $M \pm SEM$ [163].

При выполнении фармакокинетического и метаболомного анализа нормальность распределения полученных количественных данных оценивали с помощью теста Шапиро-Уилка. Для выявления значимых изменений уровней концентрации AUCs и профили концентрации для каждого вещества сравнивали с контрольной группой с использованием t-критерия Стьюдента или эквивалентного непараметрического U-критерия Манна-Уитни [19, 38]. Значения $p < 0,05$ считались значимыми.

Статистический анализ и визуализация были выполнены с использованием Python SciPy (<http://www.scipy.org>, дата обращения 22 июня 2021 г.) и Python Seaborn (Waskom, M. et al., 2017. [mwaskom/seaborn: v0.8.1](https://github.com/mwaskom/seaborn) (сентябрь 2017 г.), Zenodo [152]).

ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МИМЕТИКОВ МОЗГОВОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА

3.1. Изучение анксиолитической активности миметиков мозгового нейротрофического фактора

В настоящее время BDNF рассматривается в качестве одной из наиболее перспективных молекул, участвующих в нейробиологических механизмах тревожных расстройств, а также как важный фактор стресс-устойчивости [41, 44]. Проведенные ранее исследования показали, что антидепрессивный эффект низкомолекулярных миметиков осуществляется путем активации сигнальных путей MAPK/ERK1/2 и PI3K/Akt [203], однако сведения об их психотропном действии при эмоциональном стрессе отсутствуют, что обосновывает актуальность выявления и изучения возможного анксиолитического действия [44].

3.1.1. Изучение анксиолитической активности низкомолекулярных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель мозгового нейротрофического фактора

Опыты проведены на мышах-самцах CD-1 ($n = 128$) массой тела 25–30 г. Соединения ГСБ-106, ГТС-201 и ГСБ-214 вводили в/б в диапазоне доз 0,1–5,0 мг/кг за 30 мин (ГТС-201 и ГСБ-214) и 60 мин (ГСБ-106) из расчета 0,1 мл/10 г массы животного до начала тестирования. Животным контрольной группы в/б вводили воду для инъекций [44].

Время экспозиции животных до тестирования выбрано на основе данных об антиноцицептивной активности миметиков при построении зависимости «время-эффект» [44, 114].

При введении миметика 4-й петли BDNF ГСБ-106 статистически значимо увеличивалось время нахождения в ОР и количество выходов в ОР по сравнению с контрольной группой животных (Таблица 3.1) [44].

Таблица 3.1 – Влияние ГСБ-106 на поведение мышей CD-1 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» (n = 10) [41, 44]

Параметры поведения	Дозы, мг/кг			
	Контроль	0,1	1,0	5,0
Время в ОР, с	8,4 ± 3,0	28,9 ± 8,4	52,5 ± 13,4 **	15,6 ± 11,8
Выходы в ОР, количество	1,0 ± 0,5	2,4 ± 0,6	3,0 ± 0,7*	1,2 ± 0,7
Заходы в ЗР, количество	9,3 ± 1,3	10,6 ± 1,3	9,4 ± 1,0	8,9 ± 1,2
Общая двигательная активность	10,3 ± 1,3	13,0 ± 1,6	12,4 ± 1,2	10,1 ± 1,5

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по отношению к контрольной группе, тест Дункана. Данные представлены как Mean ± S.E.M. Mean – среднее арифметическое всех данных в выборке. S.E.M. – стандартная ошибка среднего.

Введение ГТС-201 в дозе 1,0 мг/кг, в/б за 30 мин до тестирования увеличивало число выходов в ОР и время, проведенное в ОР, по отношению к общему времени эксперимента ($p \leq 0,05$), не влияя на общую двигательную активность животных (Таблица 3.2) [41, 44].

Таблица 3.2 – Влияние ГТС-201 на поведение мышей CD-1 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Параметры поведения	Дозы, мг/кг			
	Контроль n = 19	0,1 n = 10	1,0 n = 9	5,0 n = 10
Время в ОР, с	3,0 ± 1,5	3,4 ± 2,6	10,9 ± 4,2*	9,5 ± 4,6
Выходы в ОР, количество	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2	1,7 ± 0,5 *	1,2 ± 0,5
Заходы в ЗР, количество	8,3 ± 0,8	8,3 ± 1,3	6,8 ± 0,4	8,0 ± 1,1
Общая двигательная активность	8,7 ± 0,8	8,7 ± 1,4	8,4 ± 0,6	9,2 ± 1,3

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, тест Дункана. Данные представлены как Mean ± S.E.M. Mean – среднее арифметическое всех данных в выборке. S.E.M. – стандартная ошибка среднего.

ГСБ-214 ни в одной из изученных доз не оказывал статистически значимого действия на поведение животных (Таблица 3.3).

Таблица 3.3 – Влияние ГСБ-214 на поведение мышей CD-1 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» (n = 10)

Параметры поведения	Дозы, мг/кг			
	Контроль	0,1	1,0	5,0
Время в ОР, с	19,0 ± 8,8	37,0 ± 12,9	25,6 ± 12,6	57,4 ± 20,7
Выходы в ОР, количество	2,0 ± 0,9	3,2 ± 1,1	2,1 ± 0,8	4,2 ± 1,1
Заходы в ЗР, количество	9,5 ± 1,1	10,9 ± 0,8	9,8 ± 1,0	9,9 ± 1,4
Общая двигательная активность	11,5 ± 1,6	14,1 ± 1,5	11,9 ± 1,2	14,1 ± 1,7

Примечание: Статистически значимых отличий по сравнению с контрольной группой не выявлено, тест Дункана. Данные представлены как Mean ± S.E.M. Mean – среднее арифметическое всех данных в выборке. S.E.M. – стандартная ошибка среднего.

Сравнительная оценка анксиолитического действия миметиков разных петель BDNF выявила наиболее выраженную эффективность миметика 4-й петли ГСБ-106, при введении которого статистически значимо увеличивалось два основных показателя тревожности (Рисунки 3.1–3.2) [41, 44].

Следовательно, по степени выраженности анксиолитического эффекта исследованные миметики можно расположить в следующем образом: ГТС-106 > ГТС-201 > ГСБ-214 [44], что не противоречит современным представлениям об участии MAPK/ERK1/2 сигнального каскада в формировании эмоциональной реакции на стресс [41, 44].

3.1.2. Изучение анксиолитической активности ГТС-201 у животных разных возрастных групп

Согласно экспериментальным исследованиям, в некоторых областях мозга экспрессия BDNF изменяется при старении. Так, известно, что у крыс линии F344 содержание BDNF снижается в гиппокампе к середине и концу жизни [91], а у мышей-самцов линии C57Bl/6 – в коре головного мозга и полосатом теле в возрасте от 7 до 13–20 месяцев [53].

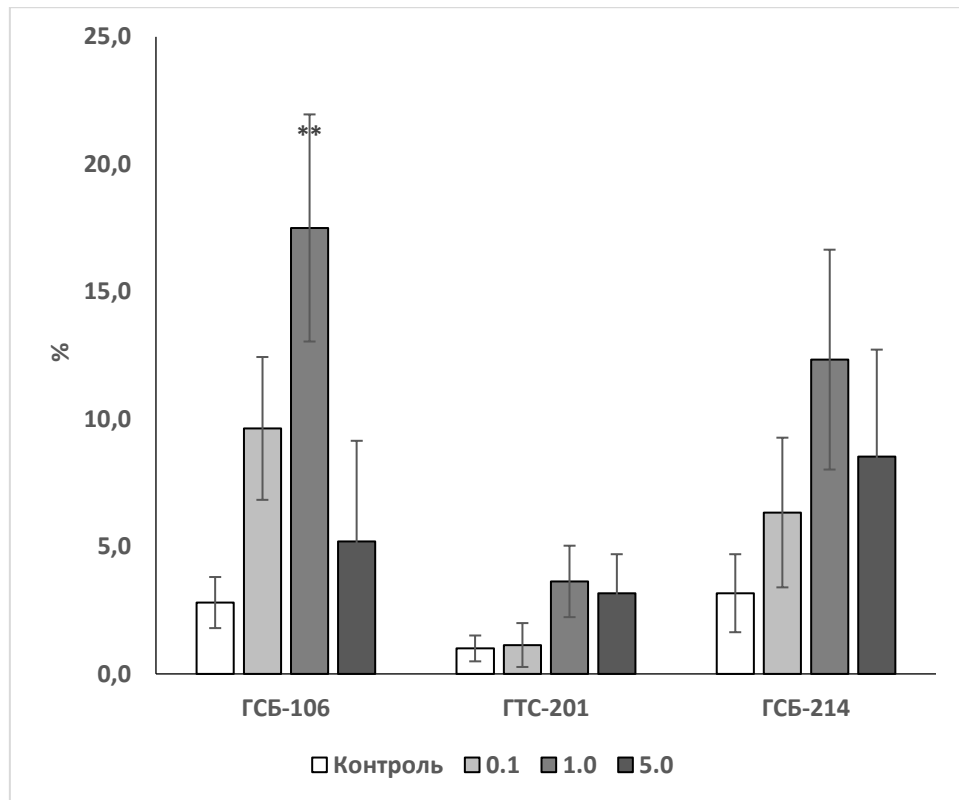
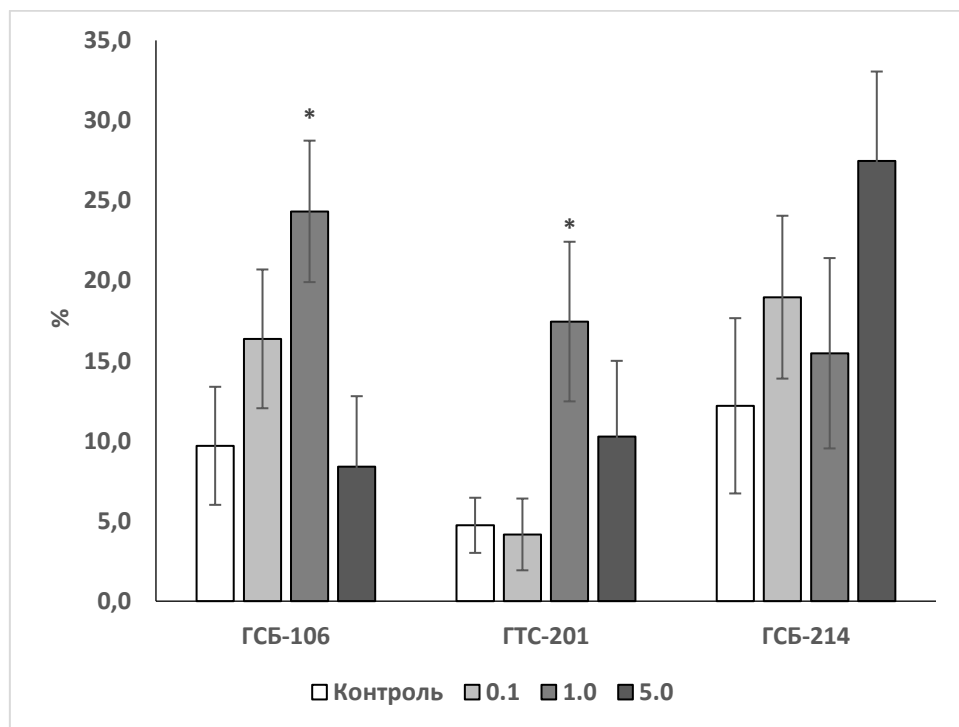


Рисунок 3.1 – Влияние миметиков BDNF на продолжительность нахождения в ОР крестообразного лабиринта [44]



Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, тест Дункана.

Рисунок 3.2 – Влияние миметиков BDNF на количество выходов в ОР крестообразного лабиринта [44]

Отмечено, что способность физической нагрузки повышать уровень экспрессии BDNF в гиппокампе значительно ослабевает у старых животных [51, 59].

Нами проведено дальнейшее изучение противотревожных свойств для миметика 2-й петли BDNF ГТС-201, который активирует MAPK/ERK и PLC γ , но не PI3K/Akt сигнальный путь при взаимодействии с TrkB-рецептором *in vitro* [27, 163].

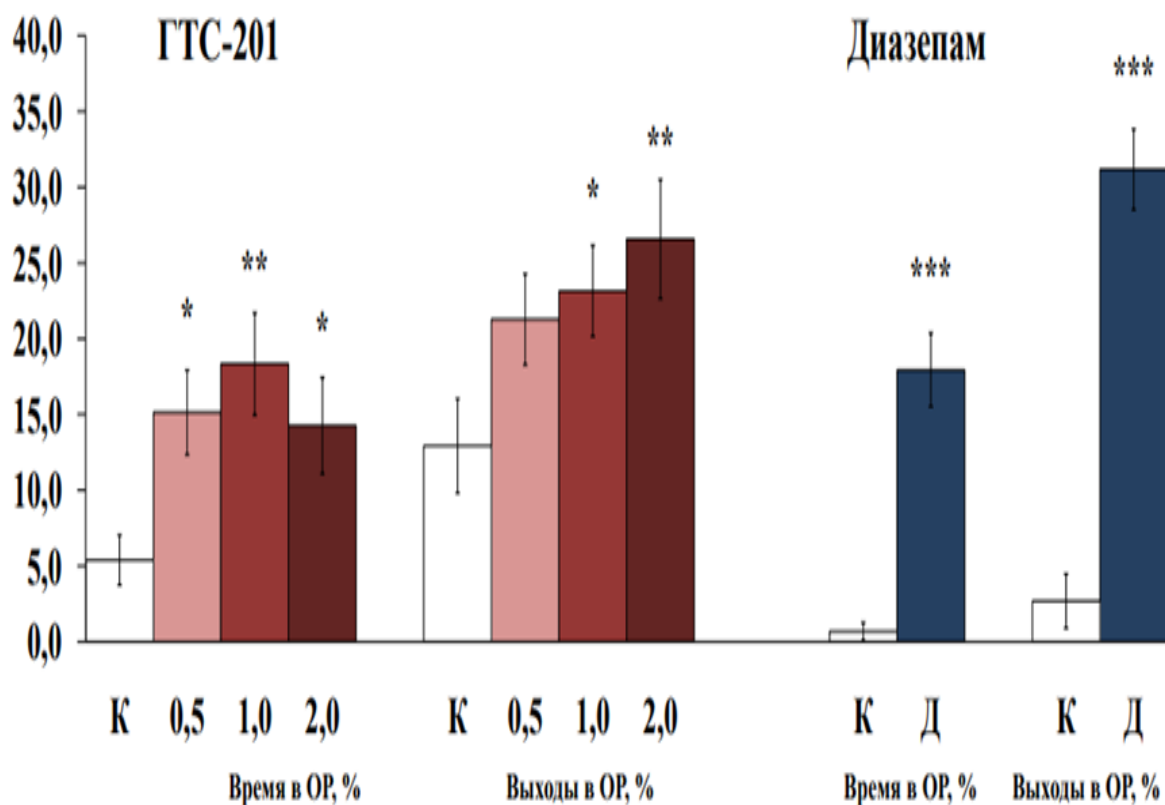
В отличие от ГСБ-106 и ГСБ-214, активирующих ERK и Akt, ГТС-201 не имеет в спектре своей фармакологической активности антидепрессивных свойств [27, 42], что определяет целесообразность расширенного изучения анксиолитического действия не только на молодых животных, но и на взрослых грызунах двух видов.

3.1.2.1. Оценка анксиолитического действия ГТС-201 у инбредных мышей линии BALB/c

Эксперименты выполнены на инбредных мышках-самцах линии BALB/c ($n = 39$) массой тела 25–27 г в возрасте 22 недель. Субстанцию ГТС-201 растворяли в воде для инъекций и вводили в дозах 0,5; 1; 2 мг/кг, в/б за 30 мин до тестирования. Животные контрольных групп получали воду для инъекций в эквивалентном объеме. В качестве референтного препарата была выбрана субстанция диазепама в дозе 2 мг/кг, в/б за 60 мин до тестирования [24, 111].

ГТС-201 в диапазоне доз 0,5–2,0 мг/кг проявлял выраженное дозозависимое анксиолитическое действие с максимально эффективной дозой 1,0 мг/кг, увеличивая время пребывания в ОР ($p < 0,01$) и количество выходов в ОР крестообразного лабиринта ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (Рисунок 3.3) [59].

Общая двигательная активность у мышей в контрольной и опытных группах статистически не отличалась [59]. Результаты проведенного нами исследования подтверждают ранее выявленные противотревожные свойства ГТС-201 у молодых половозрелых мышей линии CD-1 [30, 59].



Примечание: ГТС-201: К – Контроль, 0,5, 1,0 и 2,0 – дозы мг/кг, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ – статистически значимо по отношению к контролю согласно критерию Дункана. Время в ОР, % – ANOVA $F(3, 35) = 3,9820$, $p = 0,01532$, Выходы в ОР, % – ANOVA $F(3, 35) = 3,1650$, $p = 0,03645$. Диазепам: К – Контроль, Д – Диазепам, *** – $p < 0,001$ – статистически значимо по отношению к контролю согласно критерию Стьюдента. Количество животных в группах 9–10.

Рисунок 3.3 – Влияние ГТС-201 и диазепама на поведение взрослых мышей BALB/c в крестообразном лабиринте [59]

Анксиолитическое действие ГТС-201 у взрослых мышей BALB/c было более выражено, так как проявлялось не только в повышении числа выходов в ОР ПКЛ, как у молодых мышей, но и сопровождалось увеличением времени пребывания в ОР лабиринта почти в 3,5 раза по сравнению с контрольной группой в максимально эффективной дозе 1,0 мг/кг, при этом уступая по эффективности диазепаму в дозе 2,0 мг/кг, в/б [24, 59].

Нельзя исключить тот факт, что на выраженность противотревожного действия миметика BDNF мог повлиять не только возраст, но и другие факторы, в частности, физиологические отличия мышей разных линий несмотря на то, что уровни экспрессии BDNF в гиппокампе, по данным литературы, у мышей CD-1 и BALB/c существенно не отличаются [59, 129].

3.1.2.2. Оценка зависимости анксиолитического действия ГТС-201 от пола у крыс

Эксперименты выполнены на нелинейных белых крысах-самцах ($n = 18$) массой 520–680 г и самках ($n = 26$) массой 420–490 г в возрасте 34 недели.

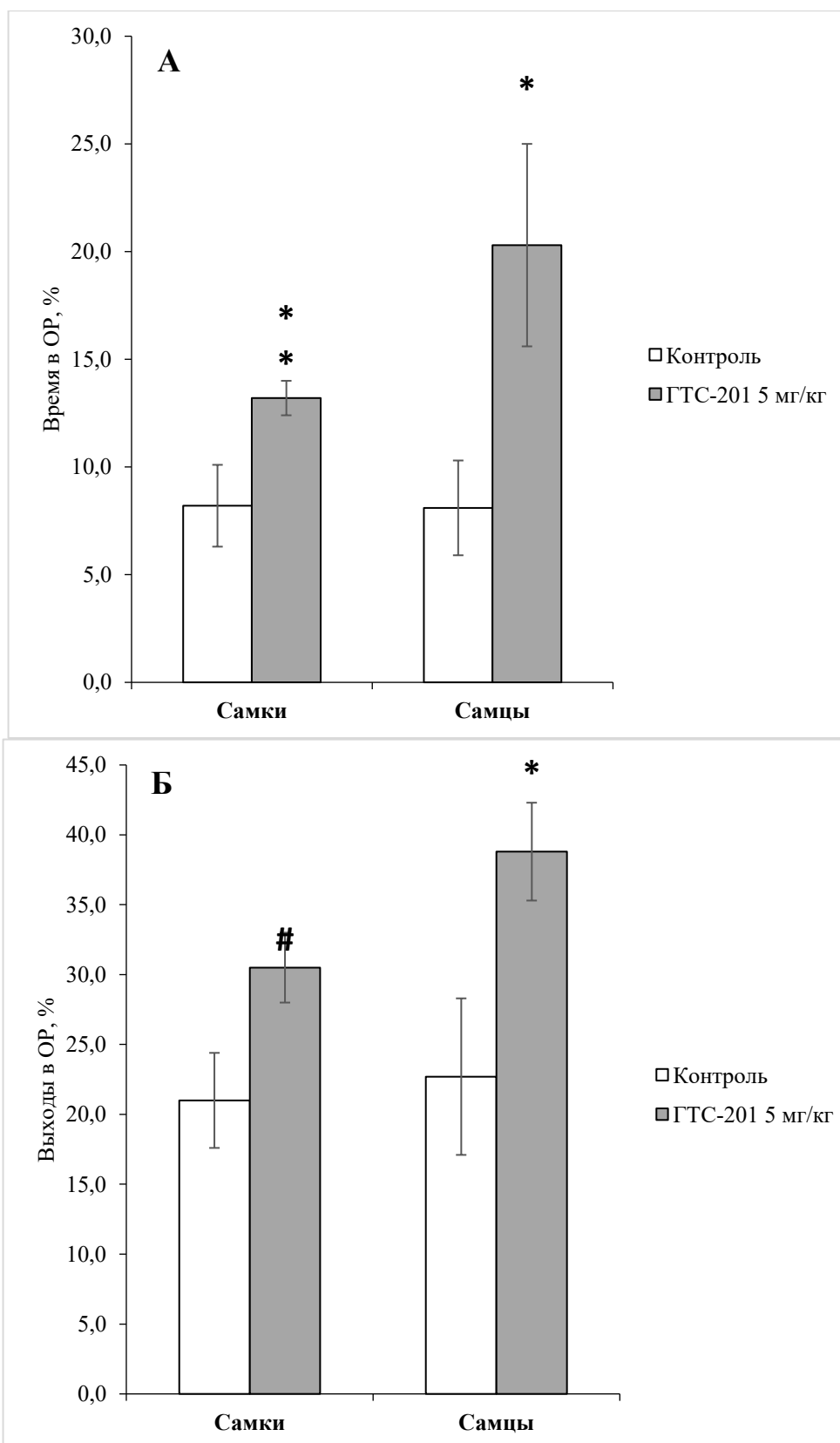
Субстанцию ГТС-201 растворяли в воде для инъекций и вводили в дозе 5,0 мг/кг, в/б. Животные контрольных групп получали воду для инъекций в эквивалентном объеме [59]. При однократном в/б введении ГТС-201 в дозе 5,0 мг/кг увеличивалась продолжительность пребывания и число выходов в ОР крестообразного лабиринта самцов и самок, при этом общая двигательная активность животных не изменялась. Время пребывания в ОР было более продолжительным у самок ($p < 0,01$), чем у самцов ($p < 0,05$), а увеличение числа выходов в ОР было сопоставимо у животных обоих полов (Рисунок 3.4) [59].

Таким образом, мы впервые продемонстрировали анксиолитические свойства ГТС-201 у «взрослых» мышей BALB/c, представляющих генетическую модель тревожного поведения, а также у «взрослых» самок и самцов нелинейных крыс [59].

3.2. Оценка влияния миметиков мозгового нейротрофического фактора на координацию движений в тесте «Вращающийся стержень»

Эксперименты выполнены на интактных инбредных мышах-самцах линии BALB/c ($n = 120$, 22–24 г).

В первой серии экспериментов было проведено фоновое тестирование животных на способность к удержанию на вращающемся стержне в течение 2 мин при постоянной скорости вращения 12 об/мин. Далее, через 60 мин мышам из опытных групп вводили ГТС-201 и ГСБ-214 в дозах 0,5; 1 и 2 мг/кг, в/б за 30 мин до повторного помещения на «вращающийся стержень» с последующей регистрацией продолжительности удержания на стержне.

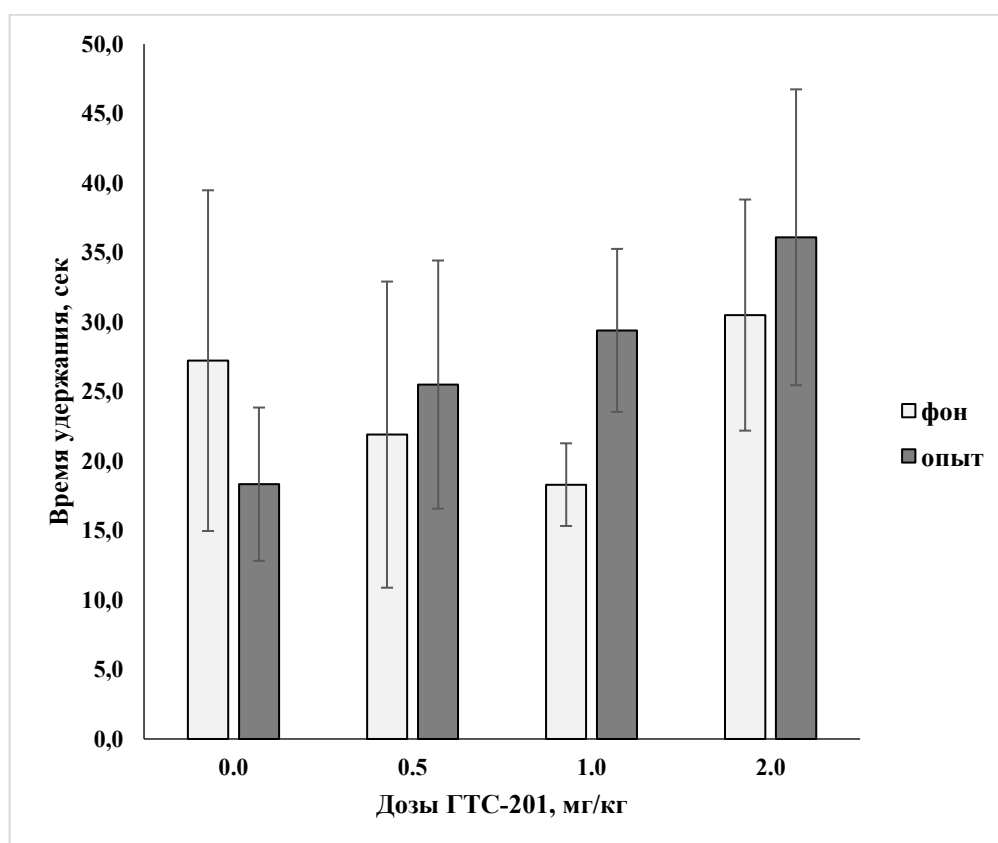


Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, # – $p < 0,1$ по отношению к соответствующей контрольной группе согласно U-критерию Манна-Уитни.

Рисунок 3.4 – Влияние ГТС-201 на поведение самок и самцов крыс в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» [59]

ГСБ-106 в дозах 0,5; 1 и 2 мг/кг, в/б вводили мышам за 60 мин до повторного помещения на «вращающийся стержень» [13].

Установлено, что дипептидные миметики BDNF не влияли на координацию движения мышей и не оказывали миорелаксирующего действия в изученных дозах. Результаты эксперимента представлены на примере соединения ГТС-201 (Рисунок 3.5).



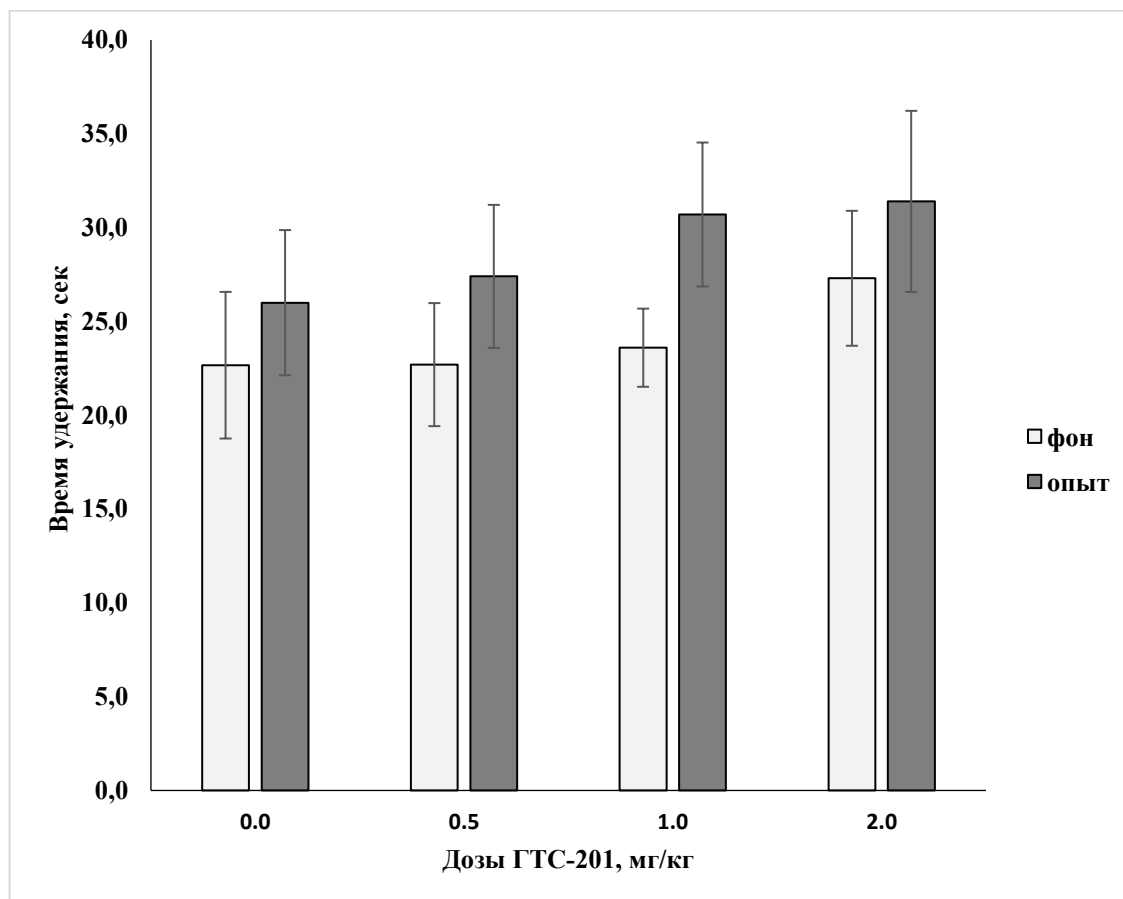
Примечание: Статистически значимых отличий по сравнению с фоновыми показателями и контрольной группой не выявлено. ANOVA для повторных измерений $F(3, 35) = 0,55813$, $p = 0,64618$

Рисунок 3.5 – Влияние ГТС-201 на поведение мышей-самцов линии BALB/c в тесте «Вращающийся стержень» при постоянной скорости вращения стержня

Во второй серии экспериментов также вначале было проведено фоновое тестирование животных на способность к удержанию на вращающемся стержне в течение 2 мин при равномерном увеличении скорости от 4 до 40 об/мин.

Далее, через 60 мин мышам из опытных групп вводили ГТС-201 и ГСБ-214 в дозах 0,5; 1 и 2 мг/кг, в/б за 30 мин до повторного помещения на «вращающийся

стержень» и регистрировали продолжительность удержания на стержне [13]. ГСБ-106 в дозах 0,5; 1 и 2 мг/кг вводили в/б мышам за 60 мин до повторного помещения на «вращающийся стержень» (Рисунок 3.6).



Примечание: Статистически значимых отличий по сравнению с фоновыми показателями и контрольной группой не выявлено. ANOVA для повторных измерений $F(3, 35) = 0,16479$, $p = 0,91937$

Рисунок 3.6 – Оценка влияния ГТС-201 в диапазоне доз 0,5-2,0 мг/кг на поведение мышей-самцов линии BALB/c в тесте «Вращающийся стержень» при постепенно увеличивающейся от 4 до 40 об/мин скорости вращения стержня

Полученные данные при меняющейся скорости вращения стержня подтвердили ранее выявленное отсутствие влияния дипептидных миметиков BDNF на координацию движения мышей в изученных дозах.

Таким образом, впервые показано отсутствие влияния низкомолекулярных миметиков отдельных петель BDNF при однократном системном введении на координацию движений у инбредных мышей линии BALB/c.

3.3. Изучение миметиков мозгового нейротрофического фактора при алкогольной зависимости у крыс

3.3.1. Изучение влияния миметиков мозгового нейротрофического фактора на продолжительность «этанолового наркоза» у мышей CD-1

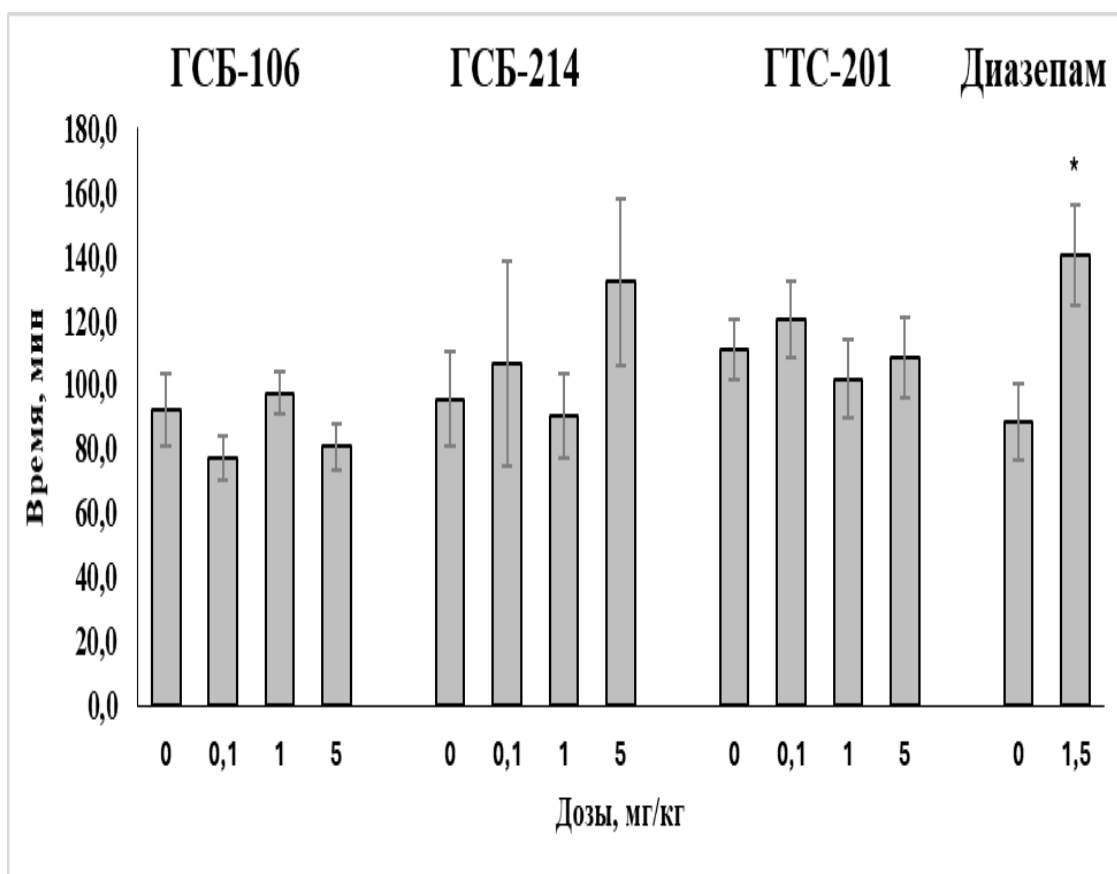
Опыты проведены на 168 половозрелых интактных мышах-самцах линии CD-1.

Референтный препарат с анксиолитическим действием диазепам в дозе 1,5 мг/кг при предварительном в/б введении статистически значимо увеличивал продолжительность этанолового сна у мышей, что согласуется с ранее полученными результатами о взаимодействии бензодиазепиновых транквилизаторов с этанолом. Напротив, ГСБ-106, ГСБ-214 и ГТС-201 в диапазоне доз 0,1–5,0 мг/кг при однократном в/б введении за 30 мин до введения этанола не изменяли время пребывания мышей CD-1 в боковом положении (Рисунок 3.7).

Таким образом, при сравнительной оценке влияния миметиков BDNF на острые эффекты этанола в тесте «Этаноловый наркоз» у мышей CD-1 установлено отсутствие влияния на продолжительность этанолового сна. Полученные данные позволяют исключить взаимодействие миметиков BDNF с этанолом на фармакодинамическом уровне и продолжить исследование их фармакологических свойств на моделях алкогольной зависимости [30].

3.3.2. Изучение влияния миметиков мозгового нейротрофического фактора на сформированную алкогольную мотивацию у крыс

Опыты проведены на нелинейных белых крысах-самцах ($n = 51$) и самках ($n = 55$). Предпочтение к этанолу было сформировано при свободном выборе между 10% этанолом и водой в течение 24-х недель при индивидуальном содержании и составило $\sim 50\%$ [163].



Примечание: Статистически значимых отличий для миметиков BDNF от контрольной группы не выявлено. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA: ГСБ-106 – $F(3, 42) = 1,5258$, $p = 0,22181$, ГСБ-214 – $F(3, 24) = 0,72402$, $p = 0,54756$, ГТС-201 – $F(3, 41) = 0,44420$, $p = 0,72268$. * – $p < 0,05$ статистически значимые отличия между контрольной группой животных, получавших диазепам, согласно критерию Стьюдента. Количество животных в группах равно 12. Данные представлены как Mean \pm S.E.M. Mean – среднее арифметическое всех данных в выборке. S.E.M. – стандартная ошибка среднего.

Рисунок 3.7 – Влияние дипептидных миметиков BDNF в диапазоне доз 0,1–5 мг/кг на продолжительность этанолового наркоза у мышей CD-1

Для оценки уровня сформированной алкогольной мотивации после 48-часовой алкогольной депривации измеряли АДЭ (в г/кг) при предоставлении свободного выбора между водой и 10% раствором этанола в течение первых 90 мин и потребление раствора этанола в г/кг в сутки в течение последующих суток [163].

После завершения 24-недельной экспозиции с раствором этанола экспериментальные группы формировали из животных с высоким уровнем алкогольной мотивации, проявлявших выраженное предпочтение к этанолу по показателю АДЭ и потреблению этанола в условиях свободного выбора между этанолом и водой (Таблица 3.4) [163].

Таблица 3.4 – Критерии алкогольного поведения крыс после добровольного потребления 10% раствора этанола в течение 24-х недель

Критерии алкогольного поведения	Самки (n = 55)	Самцы (n = 51)
Потребление этанола в условиях свободного выбора, г/кг в сутки	4,2 ± 0,2	3,6 ± 0,3
Предпочтение этанола в условиях свободного выбора в сутки, %	49,5 ± 2,8	55,8 ± 4,3
АДЭ, г/кг	1,3 ± 0,1	0,7 ± 0,1 ***
Примечание: *** – $p < 0,001$ по отношению к группе «Самки» согласно t-критерия Стьюдента, $M \pm SEM$.		

Разделение крыс на группы по степени предпочтения этанола проводили с помощью иерархического кластерного анализа (метод Уорда, Евклидово расстояние) [18].

Для дальнейших исследований было выбрано 36 самок массой тела $311,7 \pm 5,9$ г и АДЭ $1,4 \pm 0,1$ и 38 самцов массой тела $521,4 \pm 7,5$ г и АДЭ $1,0 \pm 0,1$ [163].

В рамках исследования была воспроизведена методика добровольной алкоголизации в течение 24-х недель нелинейных крыс-самок, что позволило сформировать большую выборку экспериментальных животных с устойчивой выраженной алкогольной мотивацией по сравнению с ранее использованными подходами, предусматривающими использование крыс-самцов и принудительную алкоголизацию 10% раствором этанола в качестве единственного источника жидкости.

Для оценки антиадиктивного потенциала миметиков BDNF были выбраны два дипептидных миметика – ГТС-201 и ГСБ-106, которые продемонстрировали анксиолитическую активность в тесте ПКЛ в отличие от ГСБ-214, не обладающего аналогичным эффектом. Учитывая высокую коморбидность эмоционально-стрессовых расстройств с повышенным влечением к алкоголю, представляется актуальным изучение у одних и тех же миметиков BDNF анксиолитических и антиаддиктивных свойств.

При оценке активности соединения ГСБ-106 в дозах 0,1 и 1 мг/кг, в/б у самок крыс со сформированной алкогольной зависимостью в условиях добровольного потребления 10% раствора этанола выявлена неэффективность миметика 4-й петли BDNF ГСБ-106 в дозах, обладающих анксиолитической и антидепрессивной активностью, в отношении алкогольной мотивации по показателю АДЭ (Рисунок 3.8).

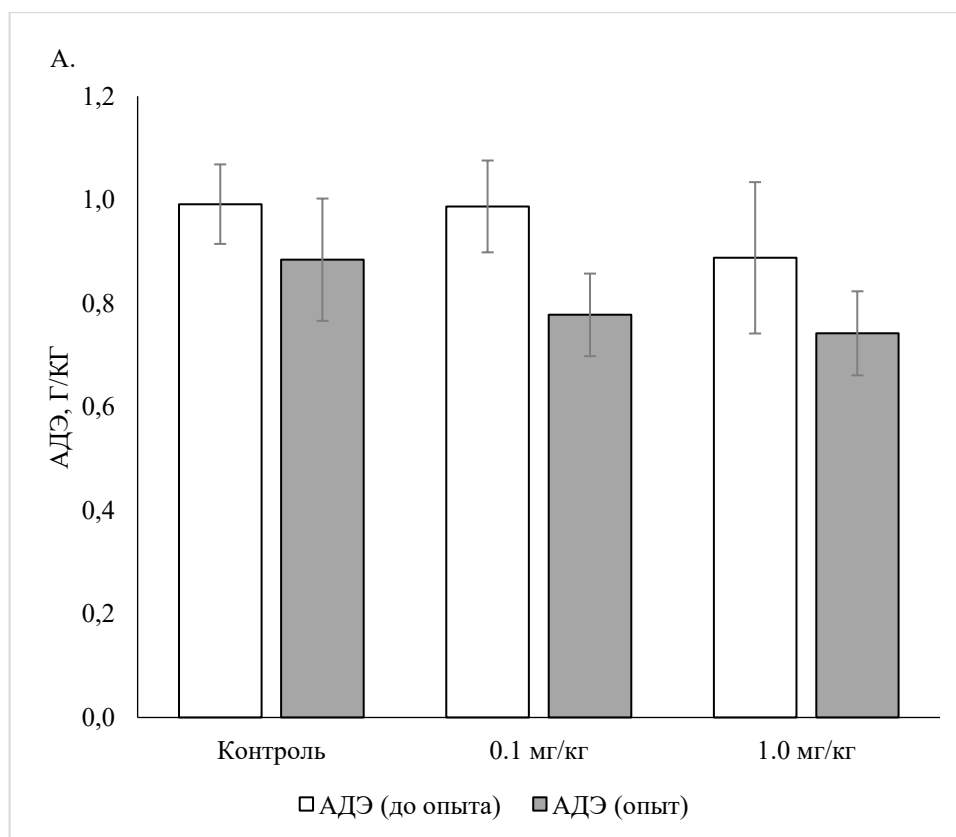
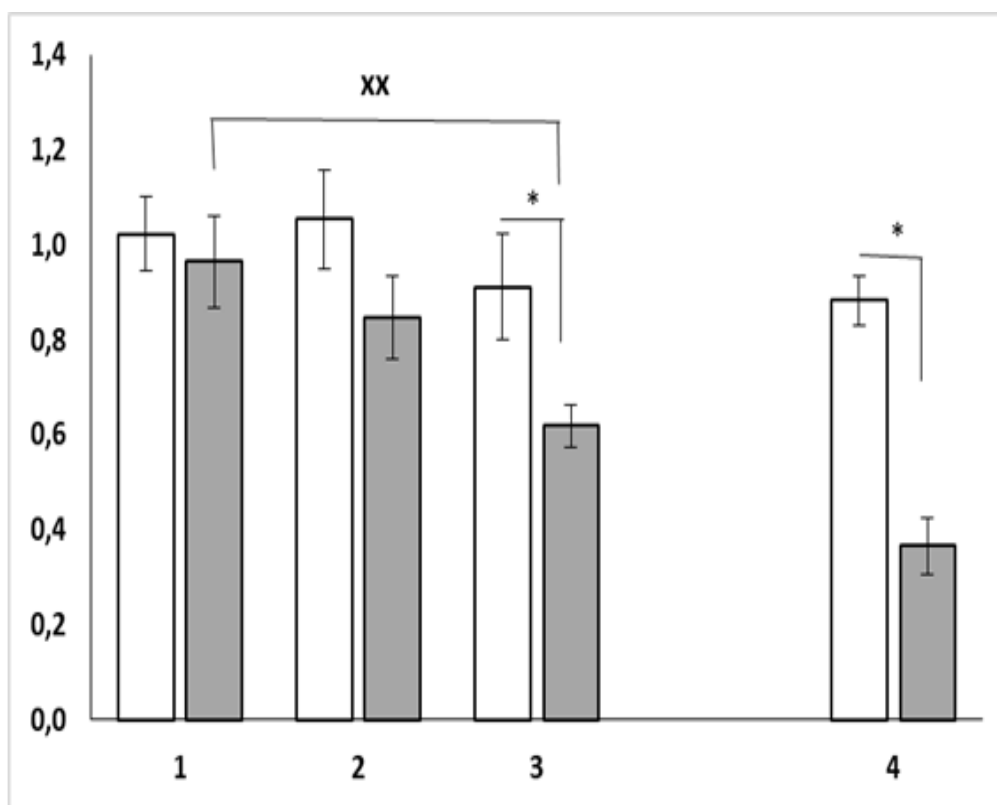


Рисунок 3.8 – Оценка эффективности ГСБ-106 на сформированную алкогольную мотивацию у самок крыс по АДЭ

При оценке антиаддиктивного потенциала соединения ГТС-201 в дозах 1 и 5 мг/кг, в/б у самок крыс со сформированной алкогольной зависимостью в условиях добровольного потребления 10% раствора этанола установлено, что уровень алкогольной мотивации во время предъявления 10% раствора этанола и питьевой воды после 48-и часов алкогольной депривации снижался только при в/б введении вещества в дозе 5 мг/кг (Рисунок 3.9) [163].

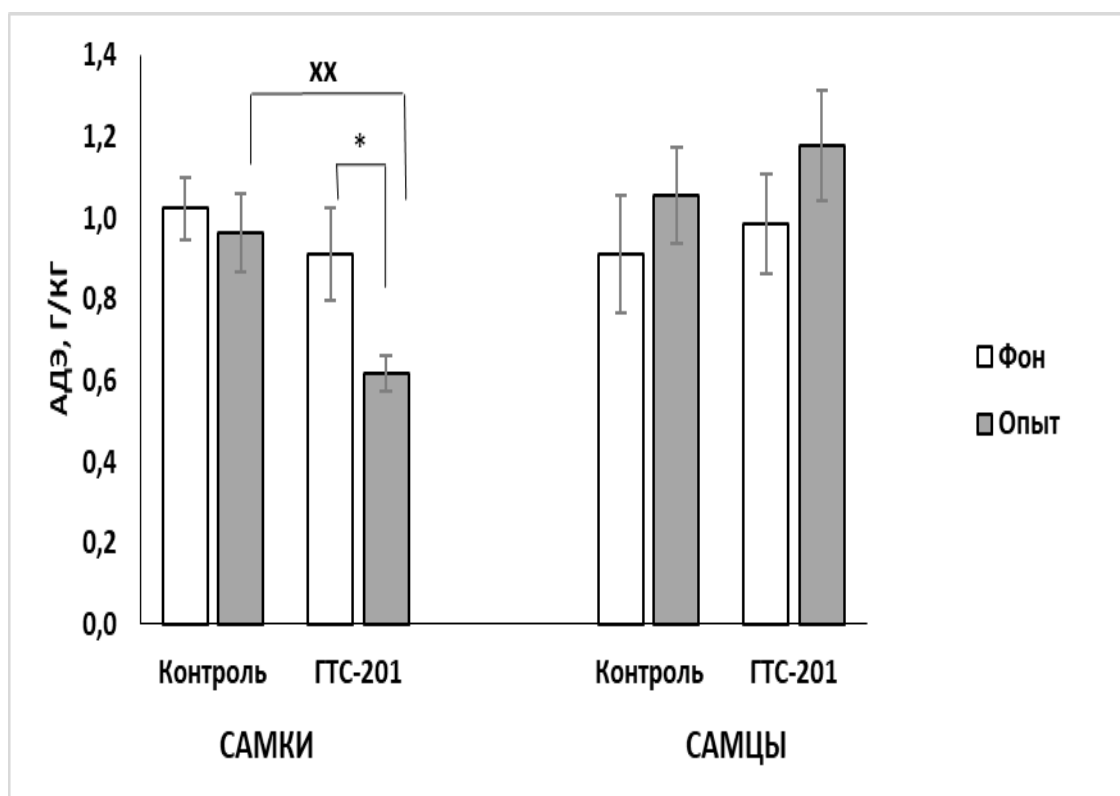


Примечание: По оси абсцисс указаны экспериментальные группы: 1 – Контроль, 2 – ГТС-201 1,0 мг/кг, 3 – ГТС-201 5,0 мг/кг, 4 – Налоксон 1,0 мг/кг, по оси ординат – АДЭ, г/кг, АДЭ (до опыта) – белый прямоугольник, АДЭ (опыт) – серый прямоугольник. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA $F(2, 25) = 4,6500$, $p = 0,01919$, xx – $p < 0,05$ согласно критерию Дункана, * – $p < 0,05$ по отношению к соответствующему контролю согласно t-тесту для зависимых переменных.

Рисунок 3.9 – Влияние ГТС-201 и налоксона при однократном введении на АДЭ у хронически алкоголизированных самок крыс

При этом по выраженности эффекта ГТС-201 не уступал референтному препарату налоксону в дозе 1,0 мг/кг. Полученные данные свидетельствуют о способности ГТС-201 снижать подкрепляющее действие этанола в данных условиях моделирования состояния алкогольной зависимости [163].

При сравнительной оценке влияния ГТС-201 на АДЭ у самок и самцов алкоголизированных крыс было выявлено, что при однократном в/б введении ГТС-201 в дозе 5 мг/кг уровень алкогольной мотивации при предъявлении 10% этанола после 48-и часов алкогольной депривации снижался только у самок крыс, что свидетельствует о зависимой от пола способности ГТС-201 снижать подкрепляющее действие этанола в данных модельных условиях (Рисунок 3.10) [163].



Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к фоновым значениям, xx – $p < 0,01$ по отношению к контрольной группе согласно критерию Дункана.

Рисунок 3.10 – Оценка влияния ГТС-201 в дозе 5,0 мг/кг при однократном в/б введении на АДЭ у крыс [163]

3.3.3. Изучение влияния миметиков мозгового нейротрофического фактора на среднесуточное потребление этанола у крыс

Оценку фармакологических эффектов миметиков BDNF проводили спустя 6 месяцев после экспозиции животных с этанолом для более точного моделирования алкоголь-индуцированных нарушений поведения и нейроадаптации, возникающих у человека при алкоголизме [163].

Поскольку предполагаемая фармакологическая мишень BDNF может претерпевать изменения в процессе хронического действия алкоголя, длительное содержание лабораторных животных в условиях неограниченного доступа к этанолу может рассматриваться как наиболее релевантный подход с точки зрения нейробиологических механизмов формирования алкогольной зависимости [163].

Субхроническое в/б введение (10 инъекций) миметика 4-й петли BDNF ГСБ-106 в дозе 1 мг/кг не влияло на количество потребляемого этанола и предпочтение к нему у алкоголизированных самок крыс (Рисунок 3.11) [163].

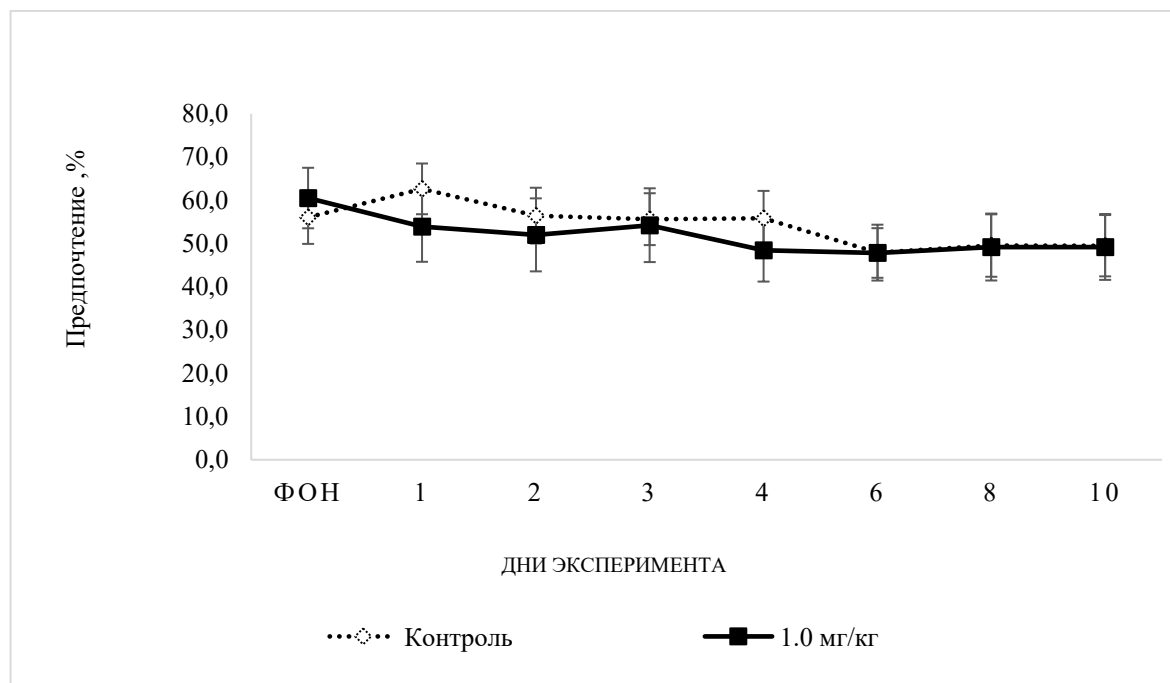
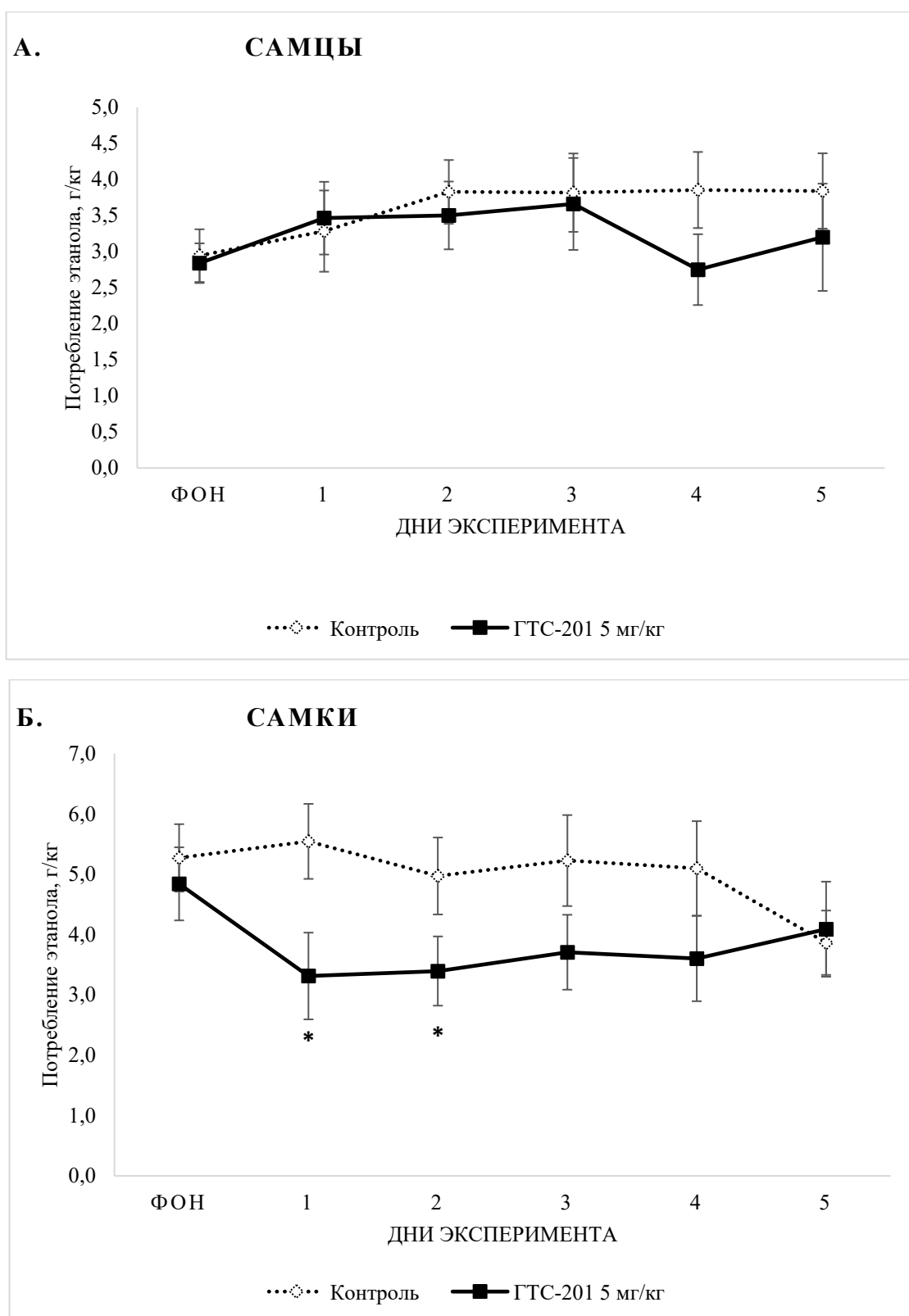


Рисунок 3.11 – Влияние ГСБ-106 на сформированную алкогольную мотивацию у самок крыс [163]

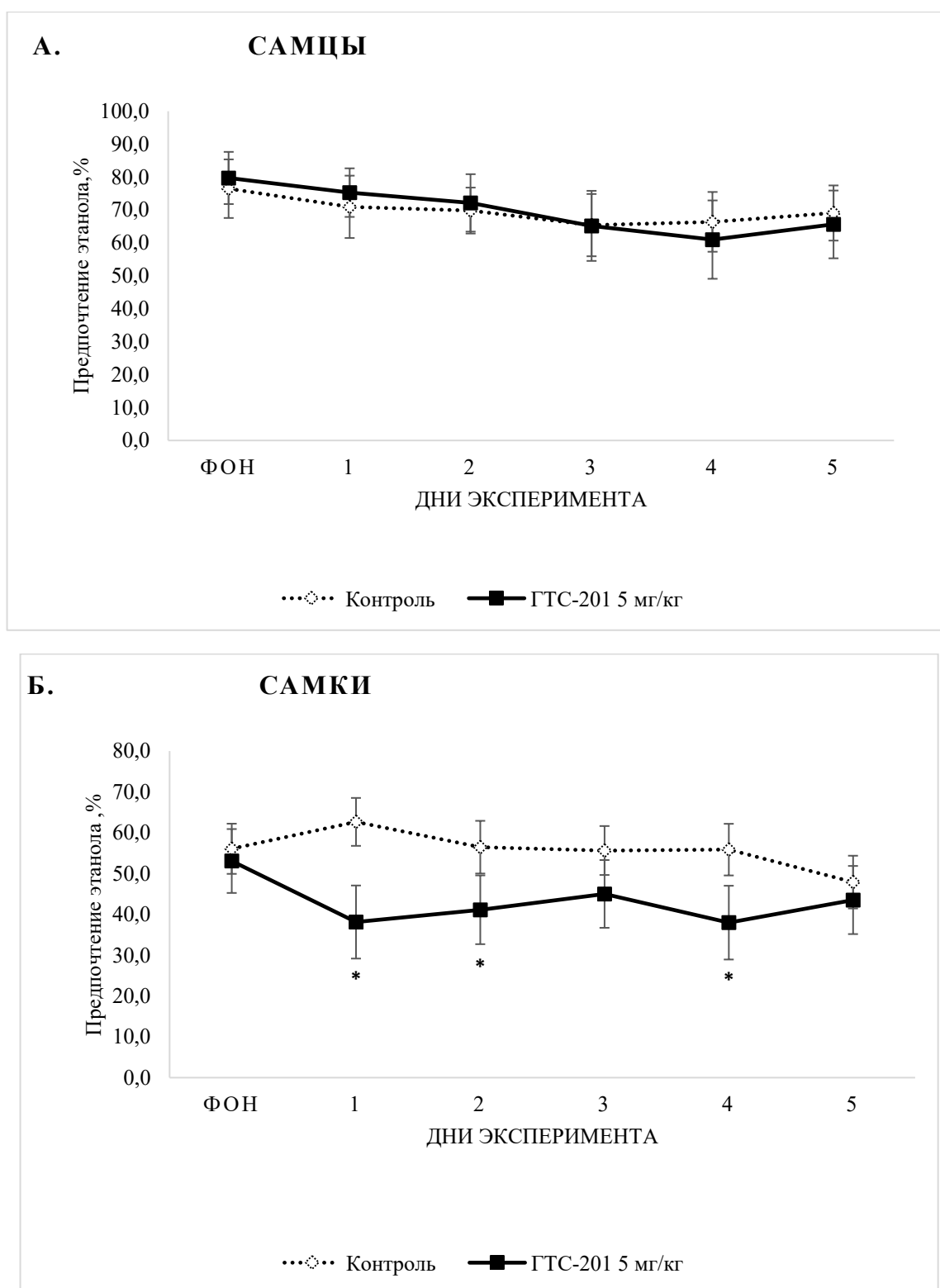
Субхроническое в/б введение (5 инъекций) миметика 2-й петли BDNF ГТС-201 в эффективной дозе 5 мг/кг не влияло на количество потребляемого этанола (Рисунок 3.12) и предпочтение к нему (Рисунок 3.13) у самцов крыс в отличие от самок, что указывает на зависимую от пола способность ГТС-201 ослаблять подкрепляющие эффекты этанола [163].

Следовательно, было показано, что у самок беспородных крыс чувствительность к вызываемому этанолом подкрепляющему эффекту выше, чем у самцов. ГТС-201 ослабляет сформированную алкогольную мотивацию у самок крыс при разных режимах введения, что требует дальнейшего изучения на животных обоих полов [163].



Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к точке фон группы "ГТС-201 5 мг/кг", тест Дункана, ANOVA для повторных измерений $F(5, 80) = 2,5053$, $p = 0,03688$.

Рисунок 3.12 – Влияние ГТС-201 в дозе 5,0 мг/кг, в/б на потребление этанола у самцов (А) и самок (Б) крыс на фоне сформированной в течение 24-х недель алкогольной мотивации



Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к точке фон группы "ГТС-201 5 мг/кг" Duncan test, ANOVA для повторных измерений $F(5, 80) = 2,5866$, $p = 0,03204$.

Рисунок 3.13 – Влияние ГТС-201 в дозе 5,0 мг/кг, в/б, на предпочтение этанола у самцов (А) и самок (Б) крыс на фоне сформированной в течение 24-х недель алкогольной мотивации [163]

3.3.4. Влияние ГТС-201 при остром введении на индуцированное этанолом снижение двигательной активности у мышей линии C57Bl/6

Известно, что многие психотропные препараты могут изменять степень или продолжительность нарушения психомоторных функций, индуцированных этанолом. Так, например, одновременное применение бензодиазепинов или опиоидов с этанолом может потенцировать угнетающий эффект на ЦНС, что увеличивает риск развития седативной реакции и психомоторных нарушений, снижает координацию движений и скорость реакций [29].

Для оценки фармакологической безопасности ГТС-201 при совместном введении с этанолом нами было изучено его влияние на снижение двигательной активности, вызываемое этанолом, у мышей линии C57Bl/6.

Опыты проведены на половозрелых мышах-самцах линии C57Bl/6 ($n = 67$, 22–24 г).

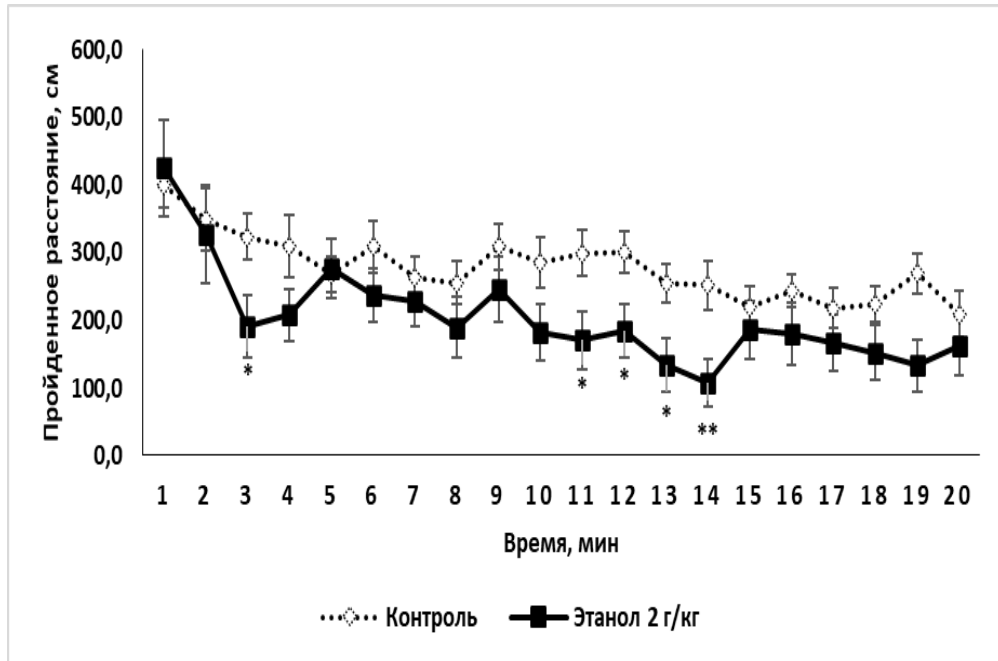
На первом этапе эксперимента была определена динамика изменения спонтанной двигательной активности в течение 20 мин после введения этанола мышам ($n = 20$). На Рисунке 3.14 видно, что этанол резко снижает общую двигательную активность, оцениваемую по пройденному расстоянию, сначала на 3-й мин ($p < 0,05$), а затем с 10-й по 14-ю мин ($p < 0,05$, $p < 0,01$) наблюдений по сравнению с контрольной группой [29].

На втором этапе оценивали влияние ГТС-201 на индуцированную этанолом гиполокомоторную реакцию в интервале с 10-й по 14-ю мин [29]. Мыши-самцы линии C57Bl/6 ($n = 47$, 22–24 г) были разделены на четыре группы. Этанол и ГТС-201 вводили согласно следующей схеме эксперимента:

1 группа (Контроль): вода для инъекций, в/б → экспозиция 30 мин → вода для инъекций, в/б → посадка в актометр), $n = 12$;

2 группа (ГТС-201): ГТС-201, 5 мг/кг, в/б → экспозиция 30 мин → вода для инъекций, в/б → посадка в актометр), $n = 10$;

3 группа (Этанол): вода для инъекций, в/б → экспозиция 30 мин → 20% раствор этанола, 2 г/кг, в/б → посадка в актометр, $n = 12$;



Примечание: * – $p < 0,05$ статистически значимые отличия по отношению к контрольной группе согласно критерию Стьюдента.

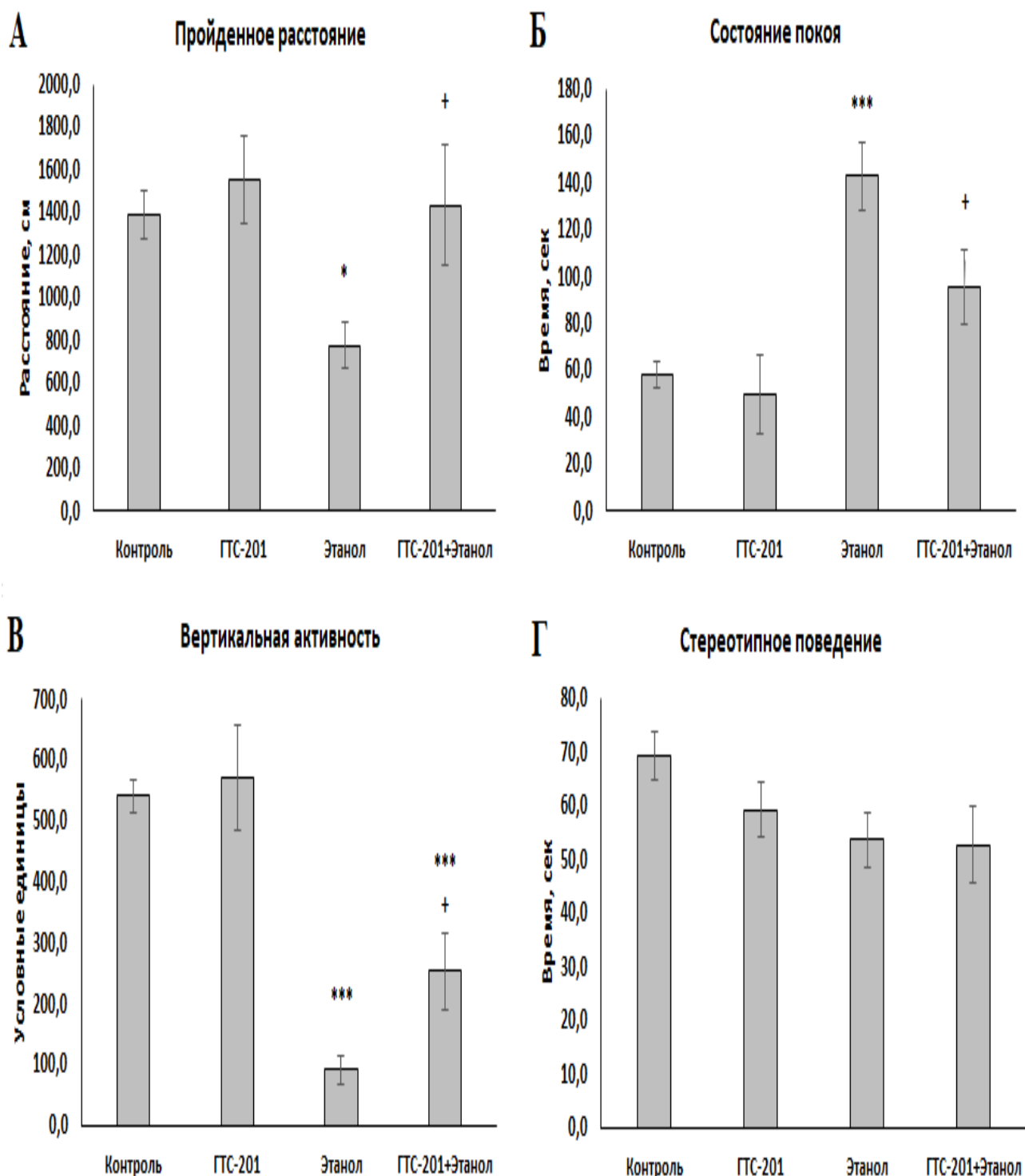
Рисунок 3.14 – Изменения двигательной активности мышей C57Bl/6 при однократном введении этанола в дозе 2 г/кг [29]

4 группа (ГТС-201 + Этанол): ГТС-201, 5 мг/кг, в/б → экспозиция 30 мин → 20% раствор этанола, 2 г/кг, в/б → посадка в актометр, $n = 13$.

Двигательную активность регистрировали в течение 20 мин.

ГТС-201 не влиял на спонтанную двигательную активность мышей в течение 20 мин наблюдения, но препятствовал снижению пройденного расстояния и увеличению состояния покоя, вызываемых этанолом (Рисунок 3.15 А-Б). ГТС-201 частично предотвращал этанол-индуцированное снижение вертикальной активности (Рисунок 3.15 В) и не влиял при самостоятельном и совместном с этанолом введении на продолжительность стереотипного поведения (Рисунок 3.15 Г) [29].

Таким образом, при однократном введении ГТС-201 в эффективной дозе не изменяет спонтанную двигательную активность, однако при предварительном введении препятствует развитию этанол-индуцированной седативной реакции у мышей линии C57Bl/6 [29].



Примечание: Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA: А. Пройденное расстояние – $F(3, 43) = 3,1154, p = 0,03586$, Б. Состояние покоя – $F(3, 43) = 9,2371, p = 0,00008$, В. Вертикальная активность – $F(3, 43) = 18,165, p = 0,00000$, Г. Стереотипное поведение – $F(3, 43) = 1,8611, p = 0,15051$. * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$ – статистически значимо по отношению к группе "Контроль", + – $p < 0,05$ – статистически значимо по отношению к группе "Этанол" согласно критерию Дункана.

Рисунок 3.15 – Влияние ГТС-201 на восстановление двигательной активности, вызванной этанолом, у мышей линии C57Bl/6 [29]

3.3.5. Влияние ГТС-201 при субхроническом введении на формирование этанол-индуцированной поведенческой сенсibilизации у мышей линии DBA/2

Формирование ЭИПС используется в доклинических исследованиях как модель нейроадаптации, возникающую после повторного воздействия этанола [29]. Применение анксиолитиков бензодиазепинового ряда на фоне действия этанола провоцирует формирование повышенной чувствительности к алкоголю, следовательно, разработка новых нейрорепрессивных ЛС должна включать оценку их фармакологической безопасности при совместном применении с этанолом [29].

С этой целью мы изучили изменение двигательной активности у мышей линии DBA/2 при субхроническом введении ГТС-201 на фоне применения этанола.

Известно, что гиперлокомоторная реакция в ответ на острое введение этанола проявляется у мышей линии DBA/2, но не у C57Bl/6, и связана с увеличением числа Fos-подобных иммунореактивных нейронов (предполагаемый показатель синаптической активности) в центральном ядре миндалины (CeA) [134]. Мыши DBA/2 в 10 раз более чувствительны в отношении активации CeA, чем C57Bl/6, что подчеркивает важность механизмов, опосредованных ГАМК(A)-рецепторами, в развитии локомоторной реакции, индуцированной этанолом [29, 138].

Мыши-самцы DBA/2 (n = 46, 22–24 г) были разделены на четыре группы. Этанол и ГТС-201 вводили в течение 9 дней 1 раз в сутки согласно следующей схеме эксперимента:

1-я группа «Контроль» (вода для инъекций, в/б → экспозиция 30 мин → вода для инъекций, в/б) n = 12;

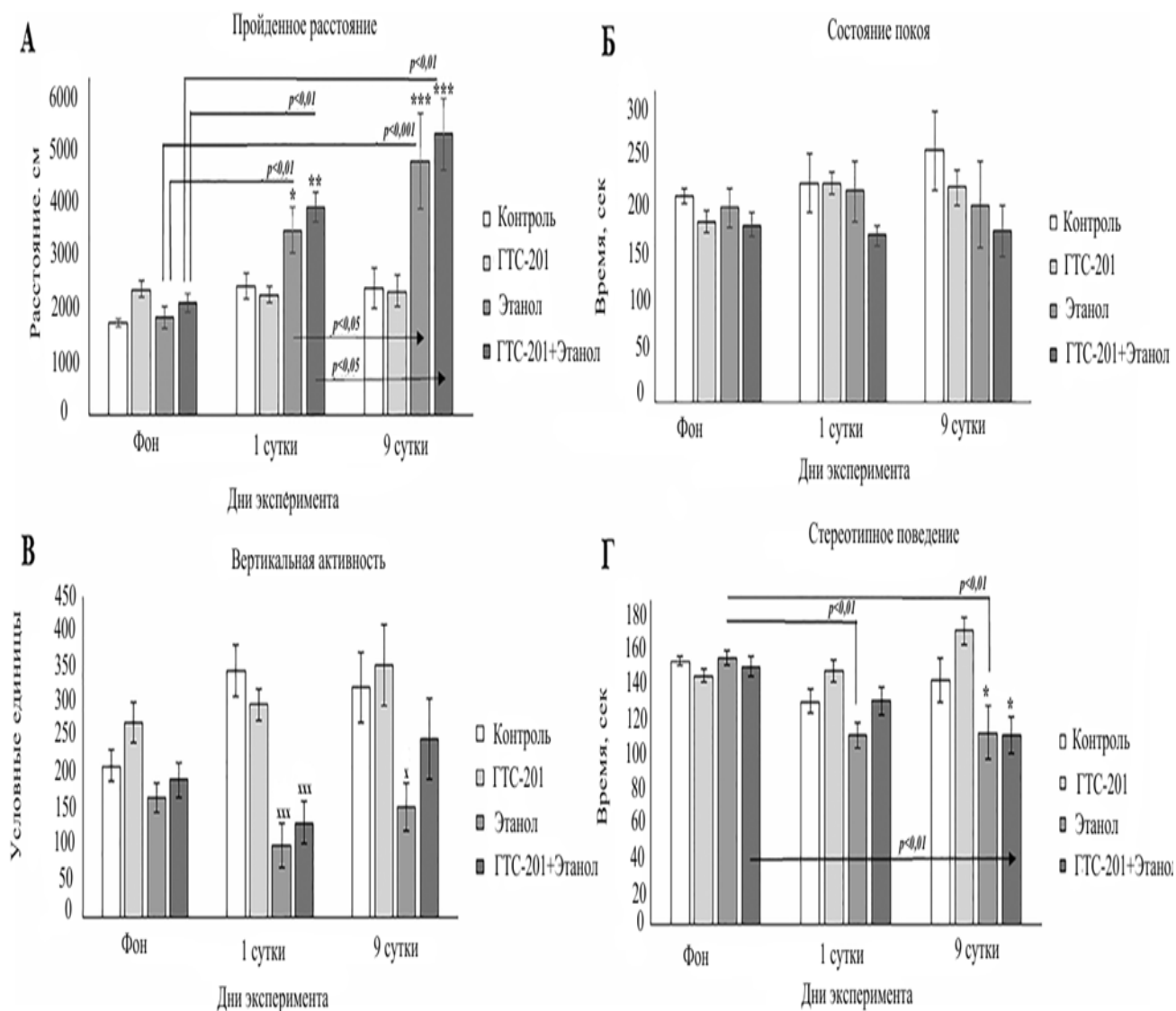
2-я группа «ГТС-201» (ГТС-201, 5 мг/кг, в/б → экспозиция 30 мин → вода для инъекций, в/б) n = 12;

3-я группа «Этанол» (вода для инъекций, в/б → экспозиция 30 мин → 20% раствор этанола, 2 г/кг, в/б) n = 10;

4-я группа «ГТС-201 + Этанол» (ГТС-201, 5 мг/кг, в/б → экспозиция 30 мин → 20% раствор этанола, 2 г/кг, в/б) n = 12.

Спонтанную двигательную активность мышей регистрировали непрерывно в течение 10 мин в 0 (фон), 1 и 9 день эксперимента [29].

При субхроническом введении ГТС-201 в дозе 5 мг/кг изменение двигательной сенсбилизации, характерное для веществ с психостимулирующим действием, зафиксировано не было (Рисунок 3.16 А-Г).



Примечание: ANOVA для повторных измерений: А. Пройденное расстояние – $F(6, 84) = 4,8941, p = 0,00025$, Б. Состояние покоя – $F(6, 84) = 0,41710, p = 0,86576$, В. Вертикальная активность – $F(6, 84) = 1,9283, p = 0,08622$, Г. Стереотипное поведение – $F(6, 84) = 4,3150, p = 0,00077$, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по отношению к соответствующей контрольной группе согласно критерию Дункана, х – $p < 0,05$, xxx – $p < 0,001$ по отношению к соответствующей контрольной группе согласно критерию Стьюдента.

Рисунок 3.16 – Влияние ГТС-201 на формирование поведенческой сенсбилизации, вызванной этанолом у мышей [21]

Этанол в дозе 2,0 г/кг значительно увеличивал пройденное расстояние в 1-й день ($p < 0,05$) и особенно на 9-й день ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой. В отличие от мышей C57Bl/6, у мышей DBA/2 этанол не влиял на время пребывания в состоянии покоя ни в один из дней наблюдения (Рисунок 3.16 Б) и значительно снижал ($p < 0,05$) время стереотипии по сравнению с контрольной группой (Рисунок 3.16 Г).

Предварительное введение ГТС-201 в дозе 5,0 мг/кг не оказывало статистически значимого влияния на характер спонтанной двигательной активности, вызванной этанолом, как в 1-й, так и на 9-й день наблюдений, что указывает на отсутствие синергетического действия миметика BDNF и алкоголя в низкой дозе при однократном и субхроническом введении [21].

Следовательно, при субхроническом введении ГТС-201 в эффективной дозе 5 мг/кг не снижается двигательная сенсibilизация, характерная для психоактивных веществ с аддиктивным потенциалом. Совместное применение ГТС-201 с этанолом также не приводит к изменению характера развития поведенческой сенсibilизации, вызываемой этанолом, у мышей DBA/2 [29].

Таким образом, нами впервые в опытах *in vivo* установлено отсутствие психостимулирующего компонента в спектре фармакологической активности дипептидного миметика 2-й петли BDNF ГТС-201 в дозе, обладающей анксиолитическим и антиаддиктивным действием, а также экспериментально доказана его фармакологическая безопасность при совместном использовании с этанолом в дозе 2 г/кг на примере влияния на спонтанную двигательную активность у мышей [29].

ГТС-201 обладает выраженным антиаддиктивным потенциалом у самок крыс, что проявляется в снижении алкогольной мотивации и потребления этанола. Этот эффект отсутствует у самцов, что подчёркивает важность учёта половых различий при разработке антиаддиктивных средств.

ГТС-201 способен предотвращать снижение двигательной активности, вызванное острым действием этанола, не проявляя психостимулирующего или депрессивного действия, что говорит о его безопасности для базовых моделей

поведения. ГТС-201 не влияет на развитие поведенческой сенсibilизации к этанолу и не вступает в синергизм с алкоголем при повторных введениях в используемой дозе, что может указывать на специфичность его действия в отношении антиаддиктивного эффекта [29]. Полученные данные обосновывают дальнейшее более глубокое изучение ГТС-201, особенно в аспекте половых различий и механизмов его действия при хроническом потреблении алкоголя, а также применимости к другим моделям зависимости.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДОВ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОГО И МЕТАБОЛОМНОГО АНАЛИЗА

BDNF обладает низкой стабильностью в биологических жидкостях и плохо проникает через ГЭБ из-за белковой природы, что существенно ограничивает его терапевтическое использование. Низкомолекулярные миметики лишены этих недостатков, вследствие чего их применение представляет перспективное направление в разработке новых нейропротекторных препаратов для терапии патологий, связанных с нарушением нейропластичности и нейрогенеза.

Фармакокинетические исследования миметиков BDNF позволяют выделить наиболее перспективные соединения, обладающие не только высокой биологической активностью, но и благоприятным профилем абсорбции, распределения, метаболизма и выведения. Изучение фармакокинетики важно для выбора оптимальных режимов дозирования и путей введения с целью достижения необходимой концентрации вещества в ЦНС и минимизации побочных эффектов. Понимание фармакокинетики необходимо для создания лекарственных форм, обеспечивающих стабильную и эффективную доставку в ЦНС.

Применение метаболомного анализа позволяет исследовать изменения метаболитов, которые происходят в ответ на действие миметиков BDNF. Такой анализ позволяет выявить взаимодействия BDNF с метаболическими путями и оценить влияние миметиков на функции клеток и тканей на молекулярном уровне.

Таким образом, изучение фармакокинетических показателей низкомолекулярных миметиков BDNF – ключевой аспект, определяющий возможность создания эффективных и безопасных ЛС нового поколения для лечения заболеваний нервной системы.

Метаболомный анализ является ценным современным методом для понимания механизмов действия миметиков BDNF и их влияния на метаболизм и функцию клеток, что открывает перспективы для разработки новых фармакологических подходов.

4.1. Разработка и валидация методики определения ГТС-201 в образцах крови и головного мозга крыс

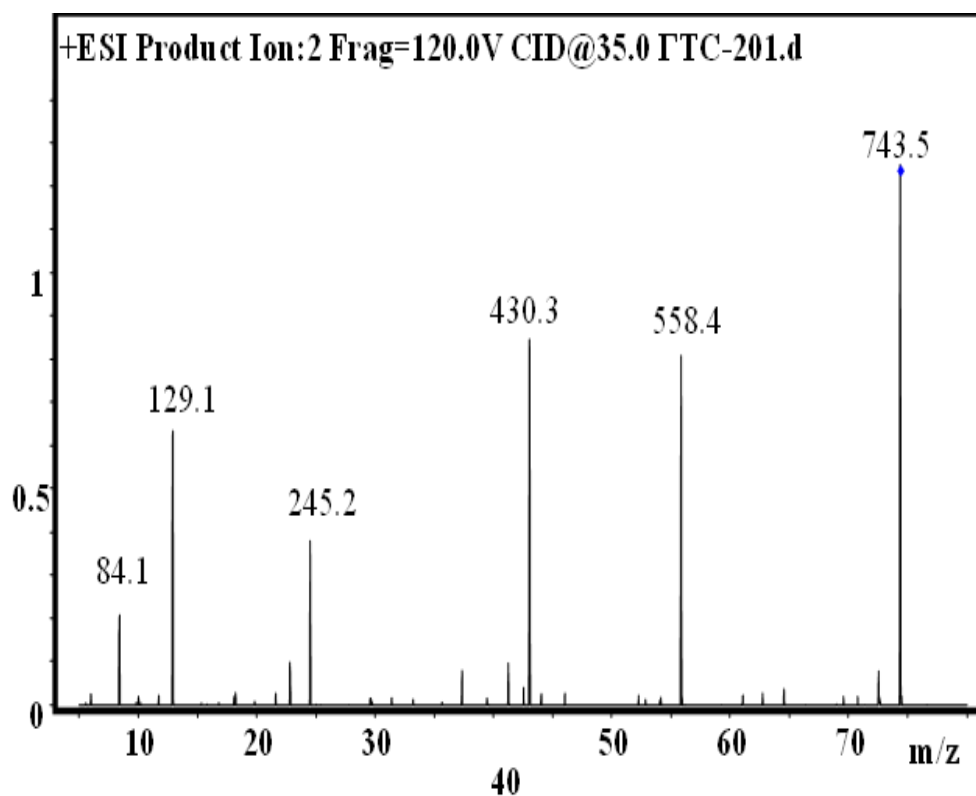
Для определения фармакокинетических показателей ГТС-201 мы разработали и валидировали методику количественного определения вещества в головном мозге и плазме крови при однократном в/б введении крысам линии Wistar в дозе 5 мг/кг.

Пептид ГТС-201 является гидрофильным соединением, что затрудняет его экстракцию из биологических образцов и хроматографическое разделение. При этом концентрации ГТС-201 в биологических образцах очень низкие, что требует экстракции вещества с последующим концентрированием.

Головной мозг и плазма крови отличаются высоким содержанием липидов, присутствие которых может снизить аналитическую чувствительность, поэтому для выделения ГТС-201 и очистки образцов от липидов был применен метод ТФЭ с использованием картриджей с полимерным сорбентом Strata-X. Хроматографическое разделение было достигнуто использованием твердофазной колонки с привитыми пентафторфенильными группами Discovery PFP HS F5 2,1x150,3 мкм (Supelco Inc, США), что позволило увеличить время удерживания полярного пептида по сравнению с другими хроматографическими колонками [152]. Использование ТФЭ с полимерными сорбентами дало возможность достичь необходимой чувствительности методики. В качестве внутреннего стандарта был выбран GHRP-2, так как исследование специфичности продемонстрировало его отсутствие в головном мозге и крови крыс [152].

При оптимизации масс-спектрометрического детектирования было выявлено, что в процессе ионизации в электроспрее ГТС-201 образует однозарядный ион $[M + H]^+$ с m/z 743,3 Да и двухзарядный ион $[M + 2H]^{2+}$ с m/z 371,6 Да. Как однозарядные, так и двухзарядные ионы имели одинаковые молекулярные спектры и спектры фрагментации, но использование однозарядного иона в качестве основного в количественном анализе позволило снизить предел количественного определения [152].

Спектры фрагментации ГТС-201 представлены на Рисунке 4.1.



Примечание: m – масса иона, z – заряд иона.

Рисунок 4.1 – Спектры фрагментации ГТС-201 [152]

Хромато-масс-спектрометрические параметры для ГТС-201 и GHPR-2 представлены в Таблице 4.1 [152].

Таблица 4.1 – Параметры определения ГТС-201 и GHPR-2 методом ВЭЖХ-МС/МС [152]

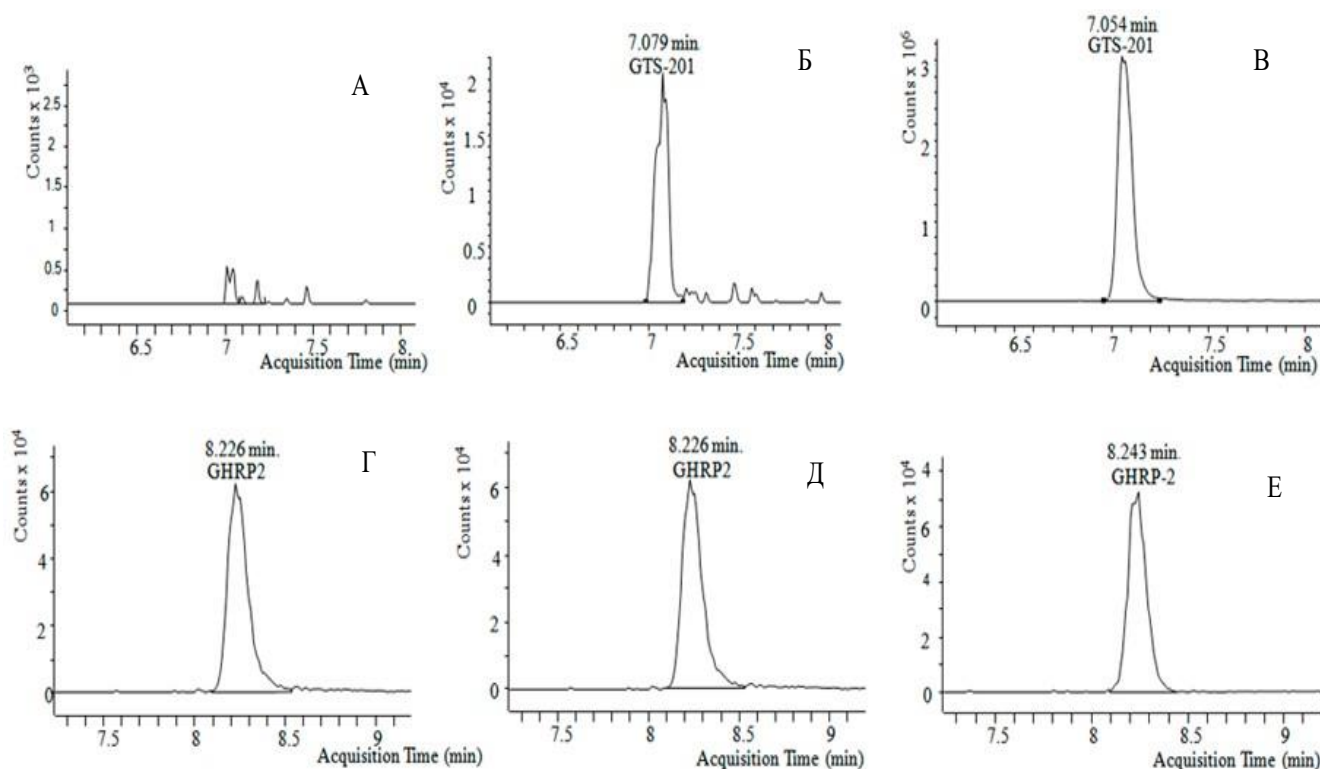
Вещества	Время удерживания (мин)	Родительский ион (m/z, Da)*	Дочерний ион (m/z, Da)*	Фрагментор (В)	СЕ (V)
ГТС-201	7,08	743,6	558,4	100	15
GHPR-2	8,24	410,0	170	100	15

Примечание: СЕ – энергия соударения ионов с инертным газом в масс-спектрометре, приводящая к их фрагментации. V – вольт, m – масса иона, z – заряд иона.

Выбор калибровочного диапазона был основан на предварительных исследованиях концентраций ГТС-201 в плазме крови и головном мозге крыс после однократного в/б введения в дозе 5 мг/кг. Калибровочная кривая была построена с использованием GHRP-2 в качестве внутреннего стандарта.

Значение коэффициента корреляции, наклона и свободного члена уравнения калибровочной кривой были рассчитаны с использованием взвешенного ($1/x$) линейного регрессионного анализа. Концентрации для калибровочных стандартов, рассчитанные экспериментально, находились в пределах 15% от их номинальных значений.

Хроматограммы ГТС-201 и GHRP-2 представлены на Рисунке 4.2.



Примечание: А – холостой образец, Б – калибровочный образец на уровне предела обнаружения, В – образец крови после введения ГТС-201. Хроматограммы внутреннего стандарта: Г – холостой образец, Д – калибровочный образец на уровне предела обнаружения, Е – образец крови.

Рисунок 4.2 – Хроматограммы ГТС-201 и внутреннего стандарта в соответствующих образцах [152]

Параметры калибровочной кривой для ГТС-201 были следующими: линейный диапазон – 0,5–1000 нг/мл, коэффициент – $6,146 \pm 0,037$, свободный член уравнения линейной регрессии – $0,028 \pm 0,007$, коэффициент корреляции – $0,9956 \pm 0,0019$ (Mean \pm SD) [152].

Правильность и прецизионность разработанной методики оценивали по результатам анализа шести образцов QC в четырех концентрациях. Для оценки правильности (RE) сравнивали экспериментально-рассчитанные концентрации с номинальными внутри одного аналитического цикла и между ними. RE, рассчитанная как отклонение между номинальной и расчетной концентрацией, варьировала от 1,07% до 6,38% внутри одного аналитического цикла и от -2,93% до 7,85% между аналитическими циклами соответственно. Значения RSD внутри цикла изменялись от 3,03 до 4,33%, а между циклами – от 1,97 до 5,40% (Таблица 4.2) [152].

Коэффициент экстракции и влияние матрицы на сигнал изучаемого вещества рассчитывали после нормализации, используя внутренний стандарт. Результаты представлены в Таблице 4.3.

Извлечение ГТС-201 превышало 90% при относительном стандартном отклонении менее 10%. Приемлемые значения коэффициента экстракции и матричного эффекта подтвердили возможность использования GHRP-2 в качестве внутреннего стандарта в разработанном методе. Стабильность оценивали с использованием образцов QC, которые анализировали после приготовления и хранения в предназначенных условиях. Содержание исследуемого вещества в образцах QC определяли на основании градуировочных кривых, полученных с использованием свежеприготовленных калибраторов [38].

Для оценки краткосрочной стабильности вещества в растворе готовили рабочие растворы, которые оставляли на хранение при комнатной температуре в течение 6 ч. Для исследования краткосрочной стабильности вещества в биологической матрице образцы выдерживали при комнатной температуре в течение 6 ч, далее проводили процедуру подготовки пробы и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Таблица 4.2 – Точность количественной оценки ГТС-201 в плазме крыс [152]

Внутри одного аналитического цикла (n = 6)				
ГТС-201	Номинальная концентрация (пг/мл)	Экспериментально-рассчитанная (Mean ± SD)	RSD (%)	Правильность (%)
	0,5	0,53 ± 0,03	3,71	6,38
	1,5	1,52 ± 0,05	4,33	1,07
	400	405,6 ± 12,3	3,03	5,6
	750	758,6 ± 27,1	3,57	1,15
Между аналитическими циклами (n = 18)				
ГТС-201	Номинальная концентрация (пг/мл)	Экспериментально-рассчитанная (Mean ± SD)	RSD (%)	Правильность (%)
	0,5	0,54 ± 0,02	1,97	7,85
	1,5	1,49 ± 0,05	3,29	-0,4
	400	403,6 ± 21,8	5,40	3,6
	750	744,4 ± 51,55	4,63	-2,93
Примечание: SD – стандартное отклонение, RSD – коэффициент вариации, Mean – среднее значение.				

Таблица 4.3 – Воздействие матрицы и восстановление для определения ГТС-201 в плазме крыс [152]

ГТС-201	Концентрация (нг/мл)	Эффект матрицы (%)		Коэффициент экстракции (%)		Общее восстановление (%)	
		Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
	1,5	98,4	1,8	94,1	5,4	93,5	8,7
	750	99,2	1,5	94,8	2,8	94,5	3,1
Примечание: Mean – среднее значение, CV – коэффициент вариации.							

Данные о стабильности для ГТС-201 обобщены в Таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Стабильность ГТС-201 в рабочих растворах и плазме крыс [152]

Стабильность при комнатной температуре в течение 6 ч (n = 6)					
Рабочий раствор			Плазма		
Концентрация, пг/мл	Bias (%)	CV (%)	Концентрация, пг/мл	Bias (%)	CV (%)
1,5	1,7	1,2	750	0,8	0,5
Три цикла замораживания и оттаивания (n = 6)					
1,5	3,5	7,8	750	5,2	4,7
Долгосрочная стабильность 30 дней при -70 °С (n = 6)					
1,5	4,6	5,1	750	3,8	2,7
Подготовленные к анализу образцы в течение 24 ч при 10 °С в автосамплере (повторный анализ, n = 6)					
1,5	4,2	2,4	750	3,7	1,8
Примечание: Bias – отклонение от номинальной концентрации, CV – коэффициент вариации.					

Стабильность вещества в подготовленных к анализу биологических образцах определяли при выдерживании проб в течение 24 ч в автосамплере. Также оценивали стабильность вещества в биологических образцах после 3 циклов «замораживания-размораживания» и при хранении при температуре -70 °С в течение 30 дней [38].

4.2. Разработка и валидация методики количественного определения эндогенных метаболитов в образцах крови и головного мозга крыс

При разработке методики количественного анализа ГТС-201 было выявлено, что данная подготовка пробы и хроматографическое разделение применимо для количественного определения нейромедиаторов и веществ, связанных с нейротрансмиссией, в плазме крови и мозге крыс. Время удерживания, родительские и дочерние ионы, а также энергия фрагментации были определены

по стандартным растворам определяемых соединений. Результаты представлены в Приложении А.

4.2.1. Калибровочные кривые

Согласно требованиям по валидации методик определения вещества в биологических объектах, для приготовления калибровочных растворов необходимо использовать матрицу, соответствующую по составу исследуемым пробам. Для эндогенных метаболитов невозможно подобрать плазму крови, которая их не содержит. Поэтому для приготовления калибровочных образцов и образцов QC была использована суррогатная матрица – 4% раствор BSA в PSB. Калибровочные кривые эндогенных метаболитов строили с использованием свежеприготовленных калибровочных стандартов (калибраторов) и внутренних стандартов, в качестве которых использовали изотопно-меченые аналоги исследуемых веществ. Параметры калибровочных кривых описывали с помощью взвешенной линейной модели. Калибровочные характеристики представлены в Приложении Б.

4.2.2. Правильность и прецизионность

Правильность и прецизионность разработанной методики оценивали с помощью шести образцов QC в четырех концентрациях, которые готовили путем добавления известного количества исследуемого вещества к суррогатной матрице в пределах одного аналитического цикла и между ними. Концентрацию исследуемого вещества в образцах QC определяли по калибровочным графикам и сравнивали с номинальным значением [38]. Показатель правильности вычисляли в процентах от номинальной концентрации исследуемого вещества в образце QC, а прецизионность – как RSD [152]. Средняя концентрация исследуемого вещества в образцах контроля качества находилась в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений. Значения RSD внутри цикла и между ними не превышали $\pm 15\%$ (Приложение В).

4.2.3. Оценка степени извлечения, эффекта матрицы и стабильности

Для эндогенных метаболитов невозможно подобрать аутентичную матрицу для валидации, поэтому оценку матричных эффектов и процента извлечения проводили методом добавок. К пулированным биологическим образцам была сделана стандартная добавка исследуемых эндогенных соединений и измерена концентрация. По рассчитанной добавке определяли степень извлечения и эффект матрицы. Результаты определения эффекта матрицы приведены в Приложении Г. Наличие изотопно-меченых аналогов определяемых метаболитов, которые используются в качестве внутренних стандартов, позволяет нивелировать матричные эффекты и возможные проблемы со степенью извлечения метаболитов. Использование изотопно-меченых внутренних стандартов дало возможность достигнуть степени извлечения не менее 90%, CV составил менее 15%.

Поскольку нейромедиаторы являются нестабильными соединениями, для предотвращения их окисления после отбора биологические образцы сразу измельчали с добавлением раствора натрия метабисульфита и немедленно замораживали до последующего анализа. Использование изотопно-меченых стандартов, которые добавляются на начальных этапах подготовки пробы позволяет компенсировать возможную нестабильность веществ в процессе анализа. Результаты исследования стабильности приведены в Приложении Д [152].

4.3. Фармакокинетические показатели ГТС-201 у крыс после однократного внутрибрюшинного введения

Фармакокинетические параметры ГТС-201 в образцах крови и головного мозга крыс были рассчитаны после однократного в/б введения в дозе 5 мг/кг. Фармакокинетическая кривая и основные фармакокинетические параметры ГТС-201 представлены на Рисунке 4.3 и Таблице 4.5 соответственно.

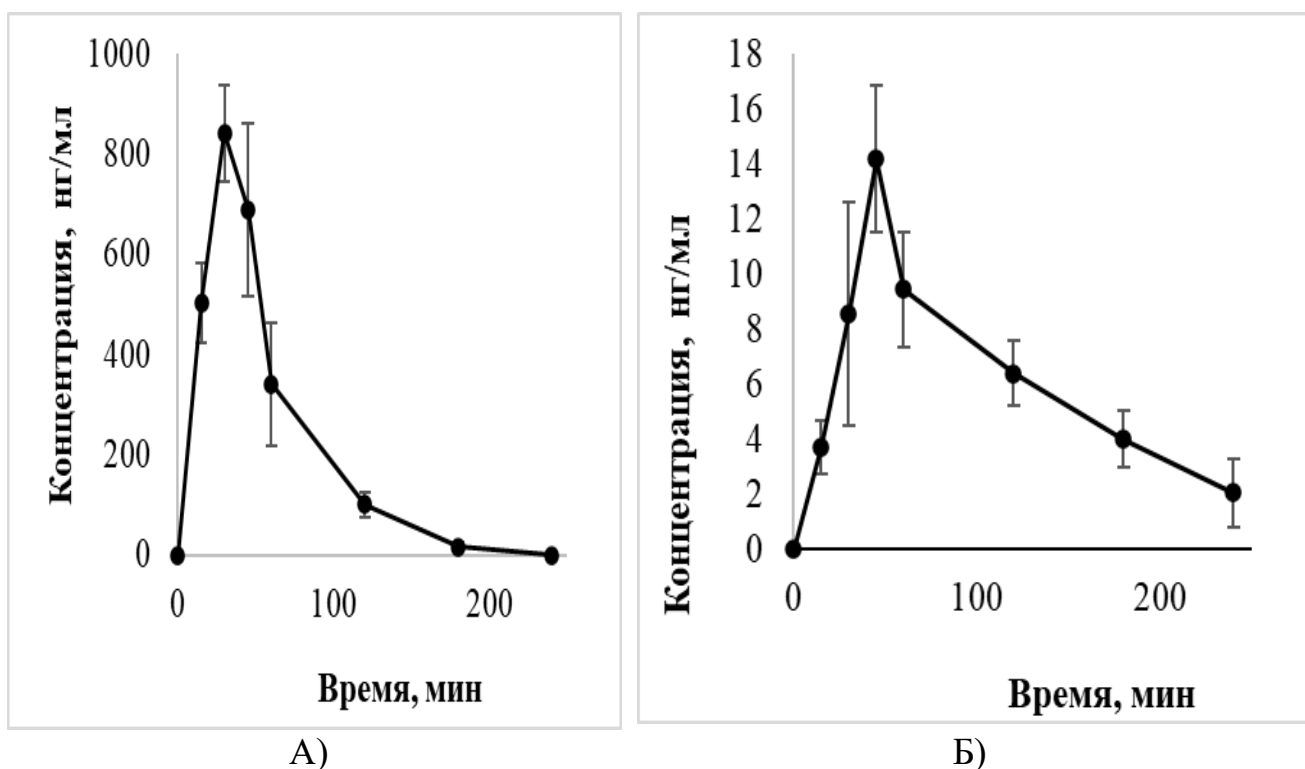


Рисунок 4.3 – Изменение концентрации ГТС-201 в крови (А) и головном мозге (Б) крыс после однократного в/б введения в дозе 5 мг/кг [152]

Было обнаружено, что в/б введение ГТС-201 крысам в дозе 5 мг/кг приводит к быстрому всасыванию вещества в кровоток, где его можно обнаружить в течение 4 ч после инъекции. Максимальная концентрация в плазме крови была достигнута через $35,0 \pm 7,7$ мин после введения и составила $867,0 \pm 69,0$ нг/мл. Время полувыведения ($T_{1/2}$) составляло $19,5 \pm 1,8$ мин, среднее время удерживания вещества в организме (MRT) – $53,8 \pm 3,3$ мин и общий клиренс в плазме (Cl/F) – $0,104 \pm 0,013$ л/мин/кг указывали на короткое присутствие исследуемого вещества в системном кровообращении животных. Кажущийся объем распределения (Vd) ГТС-201 после в/б введения в дозе 5 мг/кг был равен $2,92 \pm 0,41$ [152]. Показатель отражал распределение ЛС и степень связывания в организме. Известно, что связывание вещества во внесосудистом пространстве приводит к превышению значения Vd над фактическим объемом. В нашем случае расчет значения Vd/F дал высокие значения, что указывает на то, что ГТС-201 проникает в органы и ткани крыс [152].

Результаты метаболомного анализа представлены в Главе 5.

Таблица 4.5 – Фармакокинетические параметры ГТС-201 в крови и головном мозге крыс после однократного в/б введения ГТС-201 в дозе 5 мг/кг [152]

Фармакокинетический параметр	Биологический материал	
	Плазма (Mean ± SD)	Мозг (Mean ± SD)
Максимальная концентрация C_{max} (нг/мл)	867,0 ± 69,0	14,92 ± 3,11
Площадь под фармакокинетической кривой $AUC_{0 \rightarrow t}$ (нг/мл x мин)	48561 ± 5837	1418 ± 149
Константа элиминации ($мин^{-1}$)	0,036 ± 0,003	0,008 ± 0,001
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (нг/мл x мин)	48596 ± 5851	1760 ± 239
Время полувыведения $T_{1/2}$ (мин)	19,5 ± 1,8	87,5 ± 12,7
Среднее время удерживания в организме MRT (мин)	53,8 ± 3,3	152,0 ± 16,9
Объем распределения Vd/F (л/кг)	2,92 ± 0,41	–
Общий клиренс в плазме Cl/F (л/мин/кг)	0,104 ± 0,013	–
T_{max} (мин)	35,0 ± 7,7	40,0 ± 7,7
Доступность в головной мозг, %	–	2,9
Примечание: Mean – среднее значение, SD – стандартное отклонение.		

Таким образом, разработанные и валидированные методики позволяют надежно определять концентрации ГТС-201 и связанных с нейротрансмиссией соединений с высокой точностью и стабильностью.

Результаты фармакокинетического исследования позволили сделать вывод, что ГТС-201 характеризуется быстрым всасыванием и относительно быстрым выведением из плазмы крови, с одновременным проникновением и длительным удерживанием в ткани мозга крыс после в/б введения. Эти данные подтверждают способность вещества эффективно проникать через ГЭБ и достигать ЦНС, а также его потенциал для воздействия на мозговые функции, что обосновывает его перспективность для разработки лекарств, направленных на коррекцию нейропластичности и лечение заболеваний нервной системы.

ГЛАВА 5. МАТЕРИАЛЫ К МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО МИМЕТИКА ГТС-201

5.1. Изучение механизма анксиолитического действия ГТС-201 с помощью фармакологических анализаторов в опытах *in vivo*

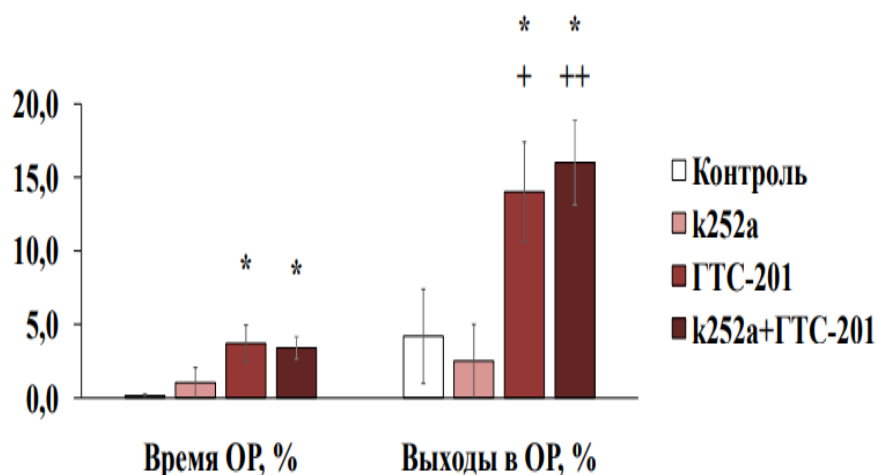
Эксперименты выполнены на половозрелых мышах-самцах линии BALB/c ($n = 85$) массой 18–22 г. В качестве фармакологического анализатора использовали ингибитор TrkB-рецепторов широкого спектра действия – соединение К-252а, которое блокирует активность киназы и аутофосфорилирование. К-252а растворяли в 0,1% ДМСО на воде для инъекций и вводили в дозе 25 мкг/кг, в/б непосредственно перед инъекцией ГТС-201 [15, 29].

Второй анализатор – соединение PD-98,059 – селективно ингибирует пострецепторный MAPK/ERK сигнальный путь. PD-98,059 растворяли в 5% ДМСО в воде для инъекций и вводили в дозе 2,5 мг/кг, в/б перед введением ГТС-201. Субстанцию ГТС-201 растворяли в воде для инъекций и вводили в дозе 1 мг/кг, в/б за 30 мин до тестирования в ПКЛ. Животные контрольных групп получали воду для инъекций в эквивалентном объеме.

Блокатор TrkB-рецепторов К-252а не изменял поведение «стресс-неустойчивых» мышей BALB/c в тесте ПКЛ, в частности, не влиял на время пребывания и число заходов в ОР лабиринта и общую двигательную активность по сравнению с контрольной группой мышей [24].

ГТС-201 в эффективной дозе 1 мг/кг при остром введении статистически значимо увеличивал время пребывания в ОР лабиринта ($p < 0,05$) и число заходов в ОР ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. Предварительная блокада TrkB-рецепторов с помощью К-252а не влияла на выраженность анксиолитического действия ГТС-201 у мышей BALB/c в тесте ПКЛ (Рисунок 5.1).

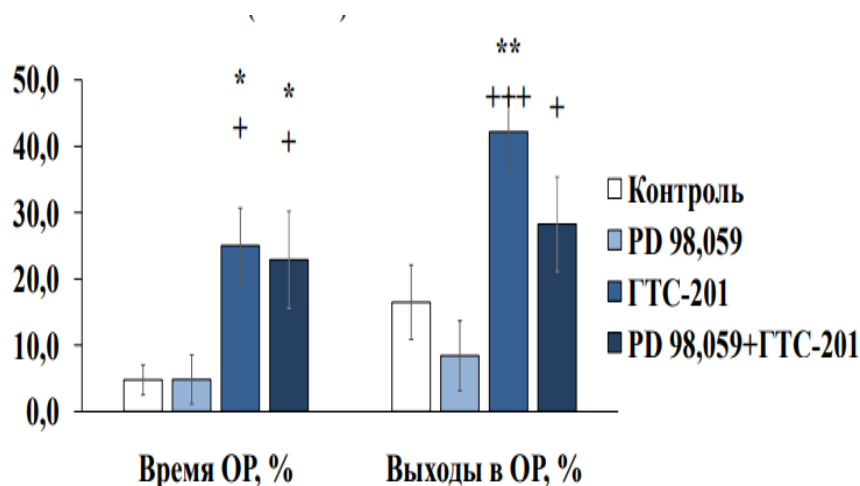
Селективный ингибитор пострецепторного MAPK/ERK сигнального пути PD-98,059 в дозе 25 мкг/кг при однократном системном введении также не изменял поведение мышей BALB/c в ПКЛ [24].



Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, + – $p < 0,05$, ++ – $p < 0,01$ по отношению к группе животных, получавших K252A, согласно критерию Дункана.

Рисунок 5.1 – Влияние блокатора TrkB-рецепторов K252A на проявление анксиолитического эффекта ГТС-201 у мышей BALB/c в тесте ПКЛ

Показано, что на фоне предварительного введения PD-98,059 анксиолитическое действие ГТС-201 в дозе 1 мг/кг, в/б у мышей BALB/c сохранялось, на что указывают статистически значимые отличия между группой «PD 98,059» и «PD 98,059 + ГТС-201» ($p < 0,05$) по показателю «Время ОР, %» (Рисунок 5.2).



Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по отношению к контрольной группе, + – $p < 0,05$, +++ – $p < 0,001$ по отношению к группе животных, получавших PD 98,059, согласно критерию Дункана.

Рисунок 5.2 – Влияние ингибитора MAPK/ERK пути PD-98,059 на проявление анксиолитического эффекта ГТС-201 у мышей BALB/c в тесте ПКЛ

Таким образом, применение ингибиторного фармакологического анализа показало отсутствие зависимости анксиолитического эффекта ГТС-201 от блокады TrkB-рецепторов и ингибирования пострецепторного MAPK/ERK сигнального пути. Установленное противотревожное действие низкомолекулярного миметика 2-й петли BDNF ГТС-201 не зависит от его взаимодействия с TrkB-рецепторами и активации ERK1/2 пути [42].

Полученные данные в отношении анксиолитического действия димерных дипептидных миметиков BDNF не противоречат выдвинутой ранее гипотезе о возможности дивергенции функций нейротрофинов с помощью низкомолекулярных миметиков их отдельных петлеобразных структур [39].

5.2. Исследование влияния ГТС-201 на метаболомный профиль у крыс

Возможность одновременного определения концентрации ГТС-201 и нейротрансмиттеров в головном мозге после в/б введения позволяет не только определить его фармакокинетические параметры, но и изучить возможный механизм действия с помощью метаболомного анализа. Широкий диапазон концентраций нейромедиаторов и метаболитов триптофана в биологических образцах представляет собой одну из основных проблем при его одновременном определении. Диапазоны калибровки анализируемых веществ были выбраны на основе концентрации каждого соединения в образцах крови и мозга крыс, определенных в предварительных экспериментах.

Подробная информация о параметрах ВЭЖХ и МС для определения эндогенных метаболитов и характеристиках калибровочных кривых представлена в Главе 4.

Чтобы выявить влияние пептидного миметика на основные нейромедиаторные системы, измеряли концентрации нейромедиаторов и их метаболитов в головном мозге и крови крыс после в/б введения ГТС-201. Основные изменения концентрации в мозге и плазме целевых нейротрансмиттеров и метаболизма триптофана приведены в Таблице 5.1.

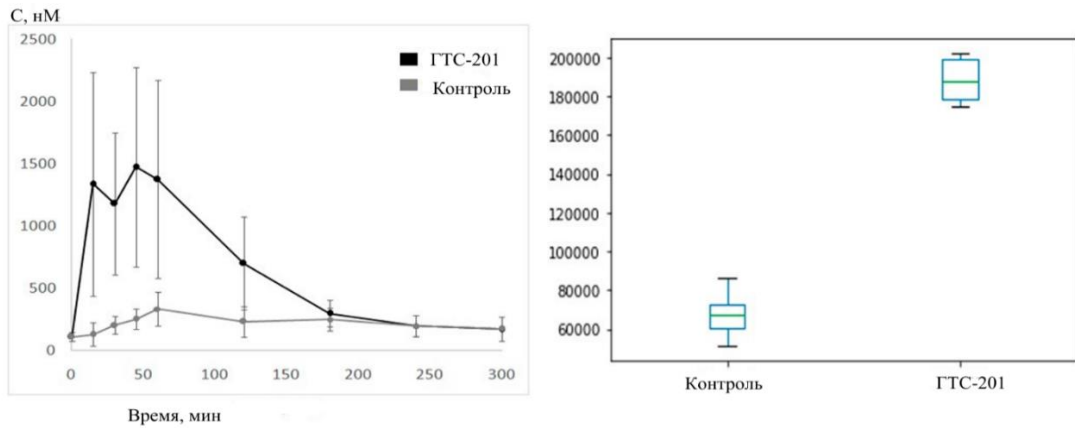
Таблица 5.1 – Изменения в концентрации целевых метаболитов, связанных с нейротрансмиттерной системой и триптофановым метаболизмом [152]

Нейротрансмиттерная система	Метаболит	Функция	Субстрат	
			Мозг	Плазма
Иннервация гамма-амино-бутировой кислоты/глутаминовой кислоты	ГАМК	Нейротрансмиттер	Н/о	
Серотонин-эргическая система/путь серотонина	Триптофан	Прекурсор	Н/о	↓
	Метилтриптофан		Н/о	↓
	Серотонин	Нейротрансмиттер	↑	Н/о
	5-гидрокси-триптофан	Прекурсор	Н/о	
	5-гидрокси-индолуксусная кислота	Метаболит	Н/о	
	Триптамин	Метаболит	Н/о	
	5-метокси-триптамин	Метаболит	Н/о	
Дофаминергическая/адренергическая система	Дофамин	Нейротрансмиттер	↑	Н/о
	Норметанефрин	Метаболит	Н/о	
	Норэпинефрин	Нейротрансмиттер	↓	Н/о
	Эпинефрин	Нейротрансмиттер	↑	Н/о
	Метанефрин	Метаболит	Н/о	Н/о
Кинурениновый путь	Кинуренин	Преобразование триптофана	Н/о	Н/о
	Кинуреновая кислота	Преобразование триптофана	Н/о	

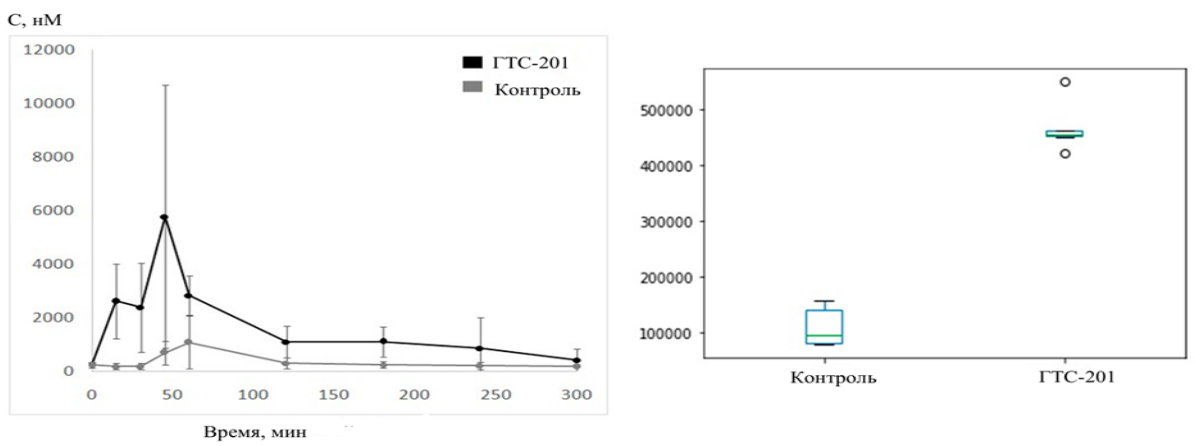
Продолжение Таблицы 5.1

Кинурениновый путь	3-гидрокси- кинуреновая кислота	Преобразование триптофана	Н/о	
	Ксантуреновая кислота	Преобразование триптофана	Н/о	↓
	Хинолиновая кислота	Преобразование триптофана	-	Н/о
Микробный катаболизм триптофана	Индол-3- пропионовая кислота	Преобразование триптофана	Н/о	
	Индол-3-уксусная кислота	Преобразование триптофана	Н/о	
	Индол-3-молочная кислота	Преобразование триптофана	Н/о	
Другие	Кортизол	Биомаркер стресса	-	↓
	3-гидрокси- триптофол	Метаболит	Н/о	
	Триптофол	Аналог серотонина и мелатонина, регулятор сна	Н/о	
	Индол-3-карбокс- альдегид		Н/о	↓
Примечание: Н/о – метаболит не определяется.				

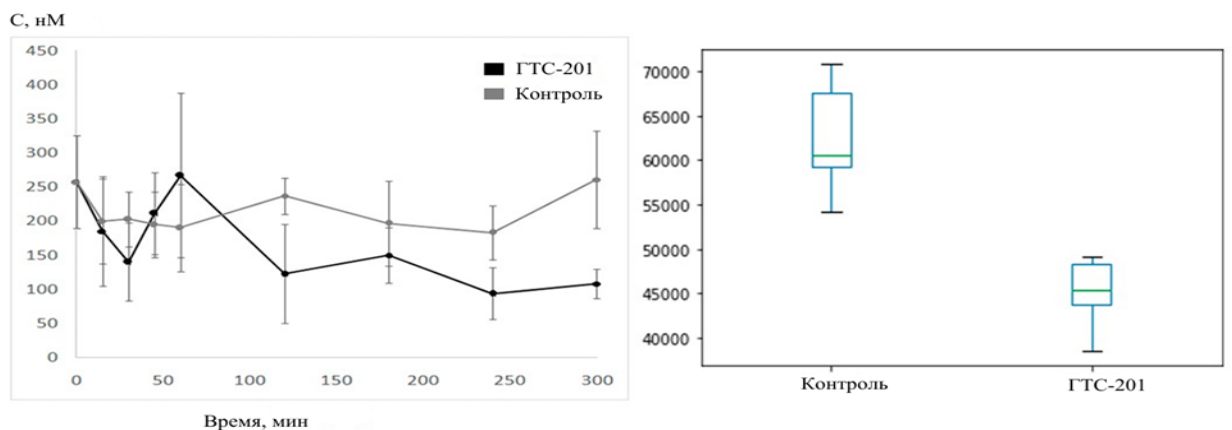
Основными значимыми наблюдаемыми различиями было повышение концентрации серотонина и дофамина в головном мозге, а также уровня кортизола в крови (Рисунок 5.3). Временные профили концентрации других метаболитов приведены в Приложении Е.



Изменение концентрации серотонина после введения препарата в мозг



Изменение концентрации дофамина после введения препарата в мозг



Изменение концентрации кортизола после введения препарата в плазме

Рисунок 5.3 – Временной профиль концентрации метаболитов, значительно измененных в образцах мозга и плазмы крыс при в/б введении ГТС-201 [152]

Тепловая карта, представляющая статистические различия во временных профилях концентрации эндогенных метаболитов между исследуемыми группами, представлена на Рисунке 5.4.

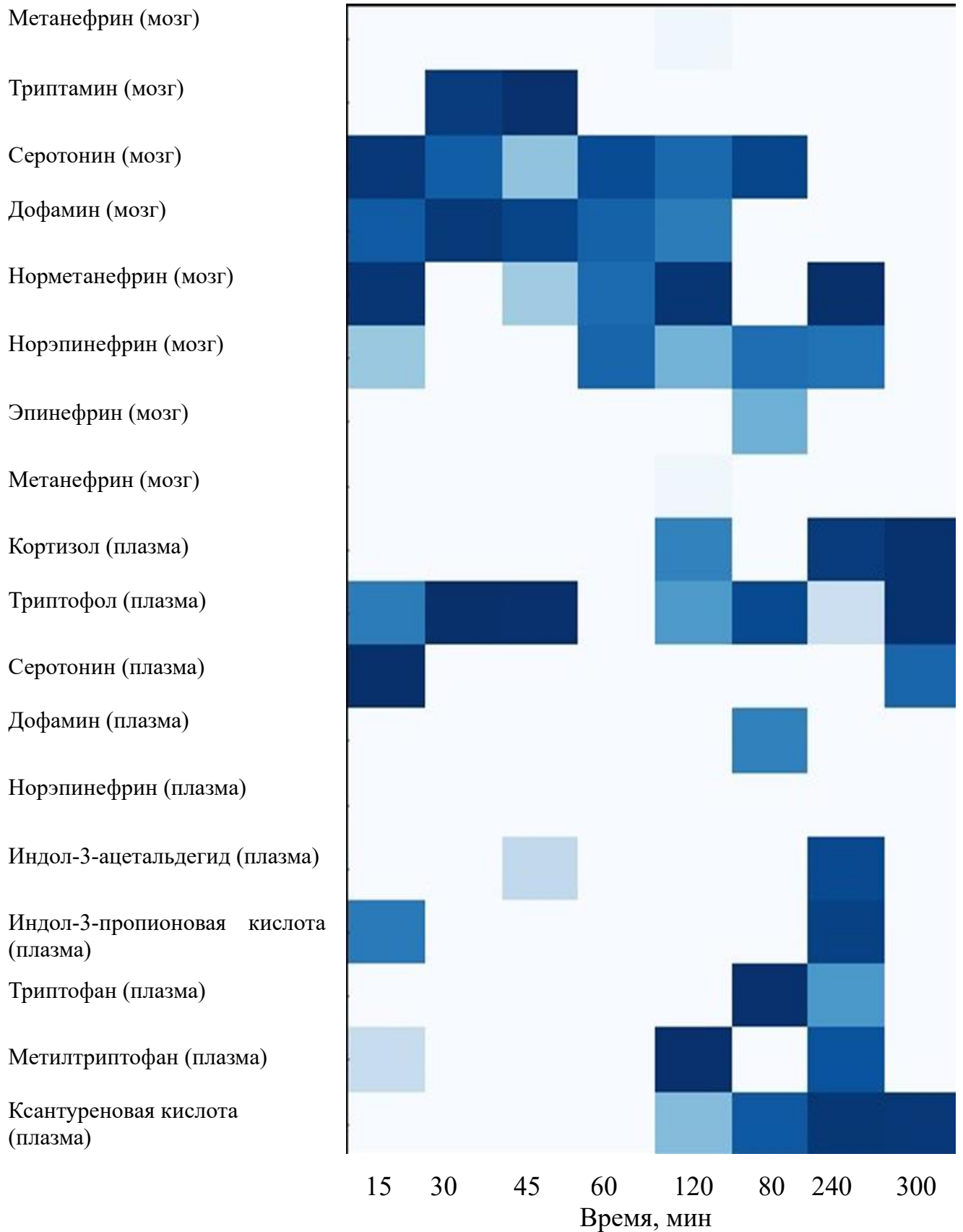


Рисунок 5.4 – Тепловая карта наиболее измененных метаболитов [152]

Пик увеличения концентрации серотонина и дофамина совпадает с T_{\max} ГТС-201 в головном мозге крыс после в/б введения. В крови крыс не было обнаружено значительного увеличения концентрации дофамина и серотонина, что также указывает на то, что в/б введение ГТС-201 приводит к увеличению синтеза дофамина и серотонина в клетках головного мозга после в/б введения ГТС-201 [152].

Таким образом, мы выявили, что ГТС-201 реализует анксиолитический эффект независимо от активации TrkB-рецепторов и MAPK/ERK сигнального пути. Вещество способствует увеличению синтеза серотонина и дофамина в головном мозге, что, вероятно, и лежит в основе его противотревожного действия. Механизм действия ГТС-201 подтверждает гипотезу о возможности дивергенции функций нейротрофинов с помощью низкомолекулярных миметиков отдельных петлеобразных структур [39]. Следовательно, ГТС-201 проявляет анксиолитический эффект через увеличение синтеза серотонина и дофамина в мозге, не вовлекая классические пути через TrkB-рецепторы и MAPK/ERK, что отличает его от традиционных нейротрофиновых механизмов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

BDNF играет центральную роль в регуляции нейropsychических функций, нейропротекции и синаптической пластичности как в ходе онтогенеза, так и во взрослом мозге. Синтез и секреция BDNF реализуются через многоэтапный каскад процессинга – от пре-про-BDNF до зрелого BDNF и про-BDNF-пептида. Баланс между этими формами оказывает критическое влияние на гомеостаз, развитие и функциональную активность нервной системы. Экспрессия BDNF строго регулируется как регионально, так и клеточно-специфично: максимальная концентрация локализована в гиппокампе и глутаматергических нейронах, но белок обнаруживается также вне ЦНС – в кардиомиоцитах, тромбоцитах, лейкоцитах, что может определять его роль при сопутствующих заболеваниях.

Действие BDNF реализуется через взаимодействие с двумя основными типами рецепторов: TrkB и p75NTR, что формирует разнообразие клеточных откликов – от поддержания выживаемости и пластичности нейронов до запуска апоптоза. По сути, зрелый BDNF – основной «сигнал выживания» для нейронов через TrkB, в то время как про-BDNF и p75NTR чаще участвуют в каскадах программированной гибели и негативной модуляции синаптической передачи.

Полиморфизмы и мутации генов BDNF и TrkB ассоциированы с развитием ряда психических и неврологических заболеваний, включая депрессию, тревожные и биполярные расстройства, а также дегенеративные нарушения (болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона). На молекулярном уровне BDNF посредством PI3K/Akt, MAPK и PLC γ -каскадов регулирует выживание клеток, нейропротекцию, экспрессию генов, дифференцировку и поддержание синаптической передачи. Нарушения данных сигнальных путей сопровождаются развитием патологии нервной системы.

BDNF также модулирует обмен ключевых медиаторов (дофамина, серотонина, норадреналина, ГАМК), что определяет его потенциальную роль в формировании эмоциональных и когнитивных функций, а также в патогенезе тревожных расстройств, болевых синдромов и зависимостей. Хотя клиническое

значение BDNF при тревоге и алкогольной зависимости изучено недостаточно, предварительные данные указывают на сложную, контекст-зависимую регуляцию и высокую перспективность исследований в этой области. Дальнейшие исследования роли BDNF в тревожных расстройствах и зависимостях требуются для создания новых подходов терапии и совершенствования клинической практики при психоневрологических заболеваниях [42].

В опытах на молодых мышах CD-1 нами было показано, что низкомолекулярные миметики 2-й (ГТС-201) и 4-й (ГСБ-106) петель BDNF обладают анксиолитической активностью в тесте ПКЛ, при этом наиболее выраженный эффект продемонстрировал ГСБ-106. Преимуществом этого вещества является выявленное ранее антидепрессивное действие [203]. Можно предположить, что более выраженный анксиолитический эффект определяет активация пострецепторных сигнальных путей MAPK/ERK1/2 и PI3K/Akt [41, 42]. ГТС-201 не обладает антидепрессивными свойствами [27], что определило наш выбор расширенного изучения анксиолитического действия на молодых и взрослых грызунах разных видов. Впервые были продемонстрированы анксиолитические свойства ГТС-201 на генетической модели тревожного поведения у «высокоэмоциональных» мышей линии BALB/c в возрасте 5 месяцев и у взрослых нелинейных крыс обоих полов [59].

BDNF и связанные с ним сигнальные механизмы поддерживают работу ЦНС, помогая нейронам справляться со стрессом. В ранее проведенных исследованиях на культуре гиппокампальных клеток HT-22 показано, что ГТС-201 связывается с TrkB-рецепторами, запуская MAPK/ERK-путь и каскад PLC- γ [27]. Однако, по данным наших *in vivo* экспериментов, анксиолитическое действие миметика BDNF не связано с активацией TrkB и ERK1/2 [42].

Снижение уровня BDNF в гиппокампе может вести к нарушению ГАМК-ергической нейропластичности и развитию тревожного поведения при старении, тогда как введение экзогенного BDNF способно этому противодействовать [186]. Результаты проведенного нами метаболомного анализа показали, что ГТС-201 после в/б введения крысам в дозе 5,0 мг/кг, попадая в мозг, запускает каскад

биохимических реакций, приводящих к повышению концентрации серотонина и дофамина в мозге на фоне снижения уровня кортизола в плазме крови при неизменном содержании ГАМК [59, 153]. Этот эффект можно связать с модуляцией серотонинергической системы – поскольку BDNF и серотонин взаимно регулируют нейропластичность и выживаемость нейронов, повышение уровня серотонина после введения ГТС-201, по-видимому, связано с его анксиолитическим эффектом.

Это предположение косвенно подтверждается снижением уровня триптофана в плазме крови крыс после однократного введения ГТС-201 [152], что позволяет предположить непосредственное влияние миметика 2-й петли BDNF на синтез серотонина [59].

Экспериментальные подтверждения анксиолитических свойств BDNF-миметиков остаются немногочисленными, однако недавние исследования продемонстрировали снижение тревожного поведения у мышей при использовании BDNF-миметика R13, который предотвращал ослабление BDNF-сигналинга при черепно-мозговой травме [42, 201].

Кроме того, низкомолекулярный BDNF-миметик LM22A-4, вызывая фосфорилирование TrkB с последующим запуском нейротрофических сигнальных путей, способствующих нейропротекции и восстановлению поведенческих реакций, нормализовывал сниженную тревожность мышей после травмы мозга при интраназальном введении [201].

В целом, полученные нами данные еще раз подчеркивают зависимость модулирующего действия BDNF и его миметиков в отношении тревожного поведения от возрастных особенностей модельных животных, что следует принимать во внимание при разработке ЛС на основе миметиков нейротрофинов [59].

В серии проведённых экспериментов впервые изучалось антиаддиктивное действие ГТС-201 на различные показатели, связанные с алкогольной мотивацией, двигательными эффектами этанола и поведенческой сенсibilизацией. Для моделирования алкогольной зависимости мы использовали нелинейных

половозрелых крыс обоего пола, которые к концу 24 недели добровольного приема раствора этанола не проявляли выраженных отличий по предпочтению и среднесуточному потреблению алкоголя [163]. ГТС-201 эффективно снижал алкогольную мотивацию у самок крыс с выраженной алкогольной зависимостью как при однократном, так и при субхроническом введении, в то время как у самцов подобного эффекта не отмечалось. Это демонстрирует половую специфичность действия вещества: у самок исходно более высокая чувствительность к алкогольному подкреплению, и именно у них ГТС-201 ослабляет влечение к алкоголю.

Как правило, при изучении зависимых от пола реакций при добровольном потреблении этанола используют селективно выведенные по предпочтению этанола линии Р крыс. Самки, предпочитающие алкоголь, демонстрируют большее потребление, чем самцы в течение первых 10 дней предоставления алкоголя, однако, после периода инициации алкогольной мотивации потребление между самцами и самками статистически значимо не отличается [166], что не противоречит нашим данными на беспородной популяции [163].

Для анализа «рецидивоподобного» поведения животные были протестированы на наличие эффекта алкогольной депривации, позволяющего оценить изменения подкрепляющего действия этанола. Увеличение потребления после лишения доступа к алкоголю отражает склонность к рецидиву, и феномен АДЭ хорошо описан как у самцов, так и у самок крыс линии Р и «высокопьющих» крыс линий НАД-1 и НАД-2 [122]. В нашем эксперименте показатель АДЭ был значительно выше у самок по сравнению с самцами ($p < 0,001$), что указывает на повышенную чувствительность к вызываемому этанолом подкрепляющему эффекту у самок, и соответствует наблюдаемым отличиям между полами у крыс линии Wistar [130, 163].

Фармакологические эффекты ГТС-201 оценивали по прошествии 6 месяцев после начала потребления этанола, то есть моделировали хронические нарушения поведения, сопоставимые с алкоголизмом у человека. Поскольку предполагаемая фармакологическая мишень BDNF претерпевает изменения в ходе хронического

действия алкоголя, длительное содержание лабораторных животных в условиях неограниченного доступа к этанолу может рассматриваться как наиболее релевантный подход с точки зрения нейробиологических механизмов формирования алкогольной зависимости [14, 163].

В предыдущих исследованиях описывалась возможность регуляции потребления этанола у лабораторных животных с помощью модулирующего действия BDNF, повышение экспрессии которого достигалось за счет добровольных физических упражнений, при этом подчеркивались половые различия в эффективности физической нагрузки и ее влиянии на снижение предпочтения этанола у самок мышей [163, 214].

Выявленная зависимость антиаддиктивного действия ГТС-201 от пола животных может быть связана с влиянием исходного уровня тревожного поведения крыс-самцов и самок на потребление этанола, как это было показано для крыс линии Sprague Dawley [213], и отчасти определяться анксиолитическими свойствами ГТС-201. Изучение модулирующего влияния пептидных миметиков BDNF на мотивационные эффекты этанола требует дальнейших исследований с обязательным использованием животных обоих полов [163].

Таким образом, *in vivo* впервые показана возможность фармакологической регуляции сформированной алкогольной мотивации с помощью низкомолекулярного дипептидного миметика 2-й петли BDNF, а также установлены межполовые различия выявленного эффекта.

ГТС-201 предотвращал индуцированное этанолом снижение спонтанной двигательной активности у мышей линии C57Bl/6, что проявлялось как сохранение пройденного расстояния и вертикальной активности. Однако само вещество не изменяло двигательную активность и продолжительность стереотипного поведения у контрольных животных [29]. Это говорит об отсутствии психостимулирующих или депрессивных эффектов у ГТС-201 и о селективном защитном эффекте против гиполокомоторных действий этанола.

В модели поведенческой сенсibilизации к этанолу на мышах DBA/2 предварительное и субхроническое введение ГТС-201 не оказывало существенного

влияния ни на развитие сенсibilизации, ни на спонтанную двигательную активность. То есть вещество не усиливало и не предотвращало появление гиперактивности, индуцированной повторным введением этанола, что указывает на отсутствие синергетического действия с алкоголем [29].

Важно, что ГТС-201 не проявлял токсичных или нежелательных поведенческих эффектов у интактных животных, не изменял двигательную активность и стереотипию *per se* и не взаимодействовал с этанолом при повторных введениях на уровне усиления или ослабления его психомоторных эффектов.

В соответствии с фармакологическими свойствами ГТС-201 его органом-мишенью является головной мозг. Фармакокинетическое исследование ГТС-201 показало, что вещество слабо проникает через ГЭБ. Доступность тканей мозга после в/б введения составила 2,9%. Однако максимальная концентрация в головном мозге ($14,92 \pm 3,11$ нг/мл) была достигнута через $40,0 \pm 7,7$ мин после введения и была значительно ниже, чем в плазме крови. $T_{1/2}$ ГТС-201 в головном мозге значительно выше, чем в плазме крови ($87,5 \pm 12,7$ мин и $19,5 \pm 1,8$ мин соответственно), что может привести к более длительному воздействию вещества в головном мозге.

Отличительной особенностью фармакокинетики пептидов является характерный для них короткий $T_{1/2}$ в кровотоке. В данном исследовании значение T_{max} ($35,0 \pm 7,7$ мин) превышало $T_{1/2}$ ($19,5 \pm 1,8$ мин), что может быть связано с низкой скоростью всасывания ГТС-201 при в/б введении и быстрым метаболизмом за счет протеолитического расщепления протеазами и пептидазами.

Димерный дипептидный миметик 2-й петли BDNF ГТС-201 имел более медленный $T_{1/2}$ из плазмы (19,5 мин) у взрослой крысы по сравнению с полноразмерным BDNF (0,92 мин) [160]. Важно отметить, что результаты настоящего исследования выявили способность ГТС-201 проникать через ГЭБ, достигая C_{max} $14,92 \pm 3,11$ нг/мл в ткани головного мозга с доступностью 2,9% после в/б введения. $T_{1/2}$ ГТС-201 в головном мозге был значительно выше, чем в плазме, что свидетельствует о накоплении вещества в ЦНС [152].

По сравнению с ранее описанным димерным дипептидным миметиком 4-й петли BDNF ГСБ-106 новый миметик ГТС-201 демонстрирует более длительный период полувыведения ($T_{1/2}$ – 39 мин), а также среднее время удержания тестируемого вещества в организме (МРВ – 84 мин), что может быть связано с более высокой изучаемой дозой ГСБ-106 (150 мг/кг). Тканевая доступность ГСБ-106 для органа-мишени (головной мозг) составила 0,005 [181].

Аналогично ГТС-201, фармакокинетические параметры были изучены для другого аналога дипептида с анксиолитическим действием, синтезированного на структуре эндогенного тетрапептида холецистокинина (ГБ-115). При пероральном введении в дозе 100 мг/кг время регистрации ГБ-115 (амид N-фенилгексаноилглицил-L-триптофана) в плазме крови крыс составило 60 мин, при этом максимальная концентрация достигала 113,02 нг/мл. Через 20 мин после введения $T_{1/2}$ составил 21,49 мин [193], что выше, чем у природных нейропептидов.

Таким образом, дальнейшая разработка препаратов на основе миметиков нейротрофинов должна быть направлена на повышение биодоступности и метаболической стабильности активного вещества.

Для понимания возможных путей механизма действия ГТС-201 на ЦНС мы применили метаболомный анализ нейротрансмиттеров и соединений, связанных с нейротрансмиссией. Метаболомика в настоящее время используется для всестороннего изучения прогрессирования заболеваний и результатов лечения, а также физиологических эффектов, вызываемых фармацевтическими препаратами и другими химическими веществами [109, 139, 181]. Одной из основных тем является изучение содержания нейромедиаторов и соединений, связанных с нейротрансмиссией, в биологических объектах для выявления механизмов нейротропного действия ксенобиотиков [145, 151, 181].

Для поиска возможных путей механизма действия ГТС-201 мы изучили метаболомные изменения, связанные с нейротрансмиттерами и метаболитами, участвующими в работе ГАМКергической, серотонинергической, дофаминергической системы и прочих метаболитов, относящихся к нейротрансмиссии.

ГТС-201, попадая в мозг, запускает каскад биохимических реакций, приводящих к увеличению концентрации серотонина и дофамина. Изменения концентрации нейромедиаторов могут выявить механизмы терапевтического действия пептида.

Поскольку было показано, что миметики пептида BDNF оказывают анксиолитическое действие на поведенческих моделях мышей, вполне объяснимо, что концентрация серотонина в головном мозге нарушается при введении ГТС-201. Серотонин является одним из основных нейромедиаторов, который играет ключевую роль в регулировании настроения и снижении депрессии и тревоги [151].

Полученные нами данные показывают, что воздействие ГТС-201 приводило к повышению уровня серотонина в мозге крыс и снижению уровня триптофана в плазме крови, что может быть связано с влиянием ГТС-201 на синтез серотонина [59].

Дофамин играет важную роль в ЦНС, регулируя уровень тревожности, настроение, концентрацию внимания и модулируя активность нейронов. BDNF и дофамин образуют тесно взаимосвязанную систему, которая регулирует нейропластичность, адаптацию мозга, мотивацию и когнитивные функции. BDNF оказывает влияние на дофаминергические нейроны, участвуя в их росте, формировании и поддержании жизнедеятельности. В свою очередь, дофамин влияет на выброс BDNF: чем сильнее активация дофаминовых систем, тем выше уровень нейротрофина [12].

Взаимосвязь между дофаминергической системой и системой BDNF предполагает, что воздействие ГТС-201 привело к увеличению синтеза дофамина и его высвобождению в дофаминергических нейронах, что связано с реализацией анксиолитических эффектов ГТС-201.

Концентрация маркера стресса кортизола в крови незначительно снижалась после в/б введения ГТС-201, однако значительные эффекты можно проследить только через 2 ч после инъекции. Исследования в области изучения взаимосвязей BDNF и кортизола показали, что уровни кортизола и BDNF отрицательно коррелируют: в перекрестном анализе уровней BDNF и кортизола у здоровых

добровольцев, которые участвовали в социальном стресс-тесте Триера, было показано, что более высокие концентрации BDNF были связаны с более быстрым восстановлением кортизола, и наоборот [50].

Более того, исследования на животных показали, что у потомства, подвергнувшегося пренатальному стрессу, отмечаются значительно более высокие уровни кортизола, в то время как BDNF в мозге был снижен [147]. Результаты, полученные в нашем исследовании, предполагают, что воздействие ГТС-201 привело к компенсирующему снижению уровня кортизола через передачу сигналов BDNF.

Таким образом, изучение фармакокинетики пептидного миметика BDNF ГТС-201 показало, что после в/б введения он быстро выводится из системного кровотока за счет метаболизма и обладает относительно небольшой биодоступностью для мозга. При попадании в мозг он вызывает увеличение концентрации серотонина и дофамина, что совпадает с T_{\max} ГТС-201 в головном мозге крыс после в/б введения. Следует отметить, что достоверного повышения концентрации дофамина и серотонина в крови не обнаружено, что также свидетельствует о том, что в/б введение ГТС-201 приводит к увеличению синтеза дофамина и серотонина клетками головного мозга. Полученные результаты фармакокинетического исследования ГТС-201 и метаболомного анализа объясняют выявленное анксиолитическое и антиаддиктивное действие ГТС-201.

ВЫВОДЫ

1. Низкомолекулярные миметики 2-й и 4-й петель BDNF под шифрами ГТС-201 и ГСБ-106 соответственно обладают дозозависимым противотревожным действием.

2. Дипептидный миметик ГТС-201 уменьшает алкогольную мотивацию у самок нелинейных крыс с выраженной алкогольной зависимостью, предотвращает индуцированное этанолом снижение спонтанной двигательной активности, не проявляя психостимулирующего или депрессивного действия, не влияет на развитие сенсibilизации и спонтанную двигательную активность.

3. Разработанные методики количественного определения миметика 2-й петли BDNF ГТС-201 и эндогенных метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС в образцах крови и головного мозга крыс соответствуют валидационным характеристикам FDA, ЕМА и ЕАЭС.

4. ГТС-201 характеризуется быстрым всасыванием и выведением из плазмы крови с одновременным проникновением и длительным удерживанием в ткани мозга крыс после в/б введения, что подтверждают способность вещества эффективно проникать через ГЭБ и его фармакологический потенциал для воздействия на мозговые функции.

5. ГТС-201 реализует анксиолитический эффект независимо от активации TrkB-рецепторов и MAPK/ERK сигнального пути. Вещество способствует увеличению синтеза серотонина и дофамина в головном мозге, снижает уровень кортизола, что, вероятно, и лежит в основе его анксиолитических и потенциально антиаддиктивных свойств.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

7,8-DHF	– 7,8-дигидроксифлавоон
АДЭ	– алкоголь-депривационный эффект
в/б	– внутривнутрино
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ВЭЖХ-МС/МС	– высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией
ГАМК	– гамма-аминомасляная кислота
ГЭБ	– гематоэнцефалический барьер
ЕАЭС	– Евразийский экономический союз
ЗР	– закрытые рукава
ЛС	– лекарственные средства
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
НПКО	– нижний предел количественного определения
ОР	– открытые рукава
ПКЛ	– приподнятый крестообразный лабиринт
ПТСР	– посттравматическое стрессовое расстройство
ТФЭ	– твердофазная экстракция
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭИПС	– этанол-индуцированная поведенческая сенсibilизация
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
ЦНС	– центральная нервная система
AP-1	– активирующий белок-1
аРС	– активный протеин С
BDNF	– мозговой нейротрофический фактор
BSA	– бычий сывороточный альбумин
CREB	– белок, связывающий цАМФ-чувствительные элементы
DAG/PKC	– диацилглицерин/протеинкиназа С

DLS	– дорсолатеральный стриатум
EMA	– Европейское медицинское агентство
FAP-1	– Fas-ассоциированная фосфатаза-1
FDA	– Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств
GDNF	– нейротрофический фактор, выделяемый клетками глиии
GHRP-2	– релизинг-пептид гормона роста 2
GTP	– гуанозинтрифосфатаза
IP3	– инозитол-трисфосфат-3-киназа
JNK	– N-концевые киназы c-Jun
K252a	– ингибитор тирозинового белка
LNGFR	– низкоаффинный рецептор фактора роста нервов
LTD	– долгосрочная депрессия
MAPK/ERK	– митоген-активируемая протеинкиназа/киназа, регулируемая внеклеточными сигналами
MC4R	– меланокортиновые рецепторы
MMR	– мониторинг множественных реакций
α -MSH	– α -меланоцит-стимулирующий гормон
mTOR	– мишень рапамицина у млекопитающих
NRAGE	– гомолог гена, кодирующего антиген меланомы, взаимодействующий с нейротрофиновым рецептором
NGF	– фактор роста нервов
NF- κ B	– ядерный фактор каппа В
NRIF	– фактор, взаимодействующий с рецептором нейротрофина
NT-3	– нейротрофин-3
NT-4	– нейротрофин-4
p75NTR	– рецептор нейротрофина p75
PBS	– фосфатно-солевой буфер
PI3K/Akt	– фосфоинозитид-3-киназа/серин-треониновая киназа

PLC	– фосфолипаза C
PLC γ	– фосфолипаза C (гамма)
PSD-95	– белок полисинаптической плотности
RIPK2	– рецептор серин/треонин-протеинкиназы 2
RhoA	– член семейства гомологов Ras A
RSD	– относительное стандартное отклонение
SHC	– домен, гомологичный второму домену белка Src
TDP 6	– димерический пептид 6
TNFR	– рецептор фактора некроза опухоли
TRAF	– фактор, ассоциированный с рецептором TNF
TrkB	– тропомиозин-киназа B
QC	– контроль качества

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 7,8-Dihydroxyflavone alleviates anxiety-like behavior induced by chronic alcohol exposure in mice involving tropomyosin-related kinase B in the amygdala / N. Wang, X. Liu, X.-T. Li, [et al.] // *Molecular Neurobiology*. – 2021. – Vol. 58. – № 1. – P. 92–105.
2. 7,8-Dihydroxyflavone, a small molecule TrkB agonist, improves spatial memory and increases thin spine density in a mouse model of disease-like neuronal loss / N.A. Castello, M.H. Nguyen, J.D. Tran, [et al.] // *PloS One*. – 2014. – Vol. 9. – № 3. – P. e91453.
3. 7,8-Dihydroxyflavone, a TrkB receptor agonist, blocks long-term spatial memory impairment caused by immobilization stress in rats / R. Andero, N. Daviu, R.M. Escorihuela, [et al.] // *Hippocampus*. – 2012. – Vol. 22. – № 3. – P. 399–408.
4. 7,8-Dihydroxyflavone exhibits therapeutic efficacy in a mouse model of Rett syndrome / R.A. Johnson, M. Lam, A.M. Punzo, [et al.] // *Journal of Applied Physiology*. – 2012. – Vol. 112. – № 5. – P. 704–710.
5. 7,8-Dihydroxyflavone improves memory consolidation processes in rats and mice / E. Bollen, T. Vanmierlo, S. Akkerman, [et al.] // *Behavioural Brain Research*. – 2013. – Vol. 257. – P. 8–12.
6. 7,8-Dihydroxyflavone leads to survival of cultured embryonic motoneurons by activating intracellular signaling pathways / T. Tsai, A. Klausmeyer, R. Conrad, [et al.] // *Molecular and Cellular Neurosciences*. – 2013. – Vol. 56. – P. 18–28.
7. 7,8-DHF enhances SHH in the hippocampus and striatum during early abstinence but has minor effects on alcohol intake in IA2BC paradigm and abstinence-related anxiety-like behavior in rats / D. Peregud, A. Kvichansky, N. Shirobokova, [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2022. – Vol. 781. – P. 136671.
8. Анксиолитическое действие низкомолекулярных миметиков мозгового нейротрофического фактора: исследование *in vivo* / Е.М. Григоревских, А.В. Надорова, Н.М. Сазонова [и др.] // *Материалы II научной конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные исследования в фармакологии» 28–29 октября, Москва 2021 г.*

9. Апрятин, С.А. Поведенческие и метаболические нарушения, опосредованные дофаминовыми системами, следовыми аминами и их рецепторами : специальность 1.5.5. «Физиология человека и животных» : диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Апрятин Сергей Алексеевич ; Институт Экспериментальной Медицины, Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи. – Санкт-Петербург, 2022. – 364 с.
10. Барчуков, В.В. Поиск кардиотропных средств в ряду линейных и циклических алкоксифенилаалканов : специальность 3.3.6. «Фармакология, клиническая фармакология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Барчуков, Владимир Валерьевич ; ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий». – Москва, 2024. – 170 с.
11. Волкова, А.А. Изучение физиологических свойств синтетических низкомолекулярных аналогов нейротрофинов NGF и BDNF в моделях болезни Альцгеймера : специальность 1.5.5. «Физиология человека и животных» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Волкова, Анна Александровна ; ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». – Москва, 2023. – 177 с.
12. Генетические предикторы регуляции активности стресс-системы / С.Н. Колюбаева, А.М. Иванов, О.В. Протасов [и др.] // Известия Российской военно-медицинской академии. – 2020. – № 2. – С. 35–45.
13. Изучение поведенческих и нейрохимических эффектов гимантана на динамику гиперлокомоторной реакции, индуцированной этанолом, у мышей линии DBA/2 / В.С. Кудрин, А.В. Надорова, В.Б. Наркевич, Л.Г. Колик // Нейрохимия. – 2018. – Т. 35. – № 1. – С. 62–69.
14. Изучение фармакологической активности низкомолекулярного миметика 2-й петли BDNF при моделировании алкогольной зависимости у крыс / Е.М. Григоревских, А.В. Надорова, Н.М. Сазонова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2023. – Т. 86. – № 11s. – С. 43. Материалы VI Съезда фармакологов России, 20–24 ноября 2023 г.

15. Колик, Л.Г. Разработка оригинального анксиолитика с антиалкогольной активностью на основе фармакологического изучения новых производных холецистокинина : специальность 14.03.06. «Фармакология, клиническая фармакология» : диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Колик, Лариса Геннадьевна ; ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова». – Москва, 2012. – 340 с.
16. Колик, Л.Г. Неконкурентный антагонист NMDA-рецепторов гимантан снижает потребление этанола у крыс со сформированной алкогольной зависимостью / Л.Г. Колик, А.В. Надорова, С.Б. Середенин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 164. – № 8. – С. 177–183.
17. Колик, Л.Г. Селанк ослабляет индуцированную этанолом гиперлокомоторную реакцию и проявление поведенческой сенсibilизации у мышей линии DBA/2 / Л.Г. Колик, А.В. Надорова, С.Б. Середенин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 162. – № 7. – С. 67–71.
18. Колик, Л.Г. Эффективность пептидного анксиолитика селанка при моделировании синдрома отмены у крыс с устойчивой алкогольной мотивацией / Л.Г. Колик, А.В. Надорова, М.М. Козловская // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 157. – № 1. – С. 61–65.
19. Маркин, П.А. Методология фармакометаболического подхода в исследовании фармакологических эффектов физиологически активных веществ на модели Danio rerio : специальность 14.03.06 «Фармакология, клиническая фармакология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Маркин, Павел Александрович ; ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). – Москва, 2022. – 207 с.
20. Межлумян А.Г. Исследование антидепрессивных свойств дипептидных миметиков нейротрофинов NGF и BDNF : специальность 3.3.6. «Фармакология, клиническая фармакология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Межлумян, Армен Гарикович ; ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова». – Москва, 2021. – 144 с.

21. Мозговой нейротрофический фактор и его низкомолекулярные миметики / Т.А. Гудашева, А.В. Тарасюк, П.Ю. Поварнина, С.Б. Середенин // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2017. – № 3. – С. 3–13.
22. Мозговой нейротрофический фактор как мишень для поиска препаратов, проявляющих антиаддиктивные эффекты / М.С. Халиманов, Е.М. Григоревских, К.А. Завадич [и др.] // Фармация и фармакология. – 2025. – Т. 13. – № 1. – С. 4–19.
23. Молекулярно-биологические аспекты депрессивных состояний: современный взгляд на проблему / В.М. Ушакова, А.Ю. Морозова, А.М. Резник [и др.] // Молекулярная биология. – 2020. – Т. 54. – № 5. – С. 725–749.
24. Надорова, А.В. Анксиолитическая активность дипептидного миметика 2-й петли BDNF не зависит от его взаимодействия с TrkB-рецепторами / А.В. Надорова, Е.М. Григоревских, Л.Г. Колик // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2023. – Т. 86. – № 11s. – С. 110. Материалы VI Съезда фармакологов России, 20–24 ноября 2023 г.
25. Надорова, А.В. Изучение антиаддиктивных свойств миметиков 2-й и 4-й петель BDNF при моделировании алкогольной зависимости у крыс / А.В. Надорова, Е.М. Григоревских, Л.Г. Колик // Материалы Всероссийского Конгресса с международным участием «Психическое здоровье в меняющемся мире», 23–24 мая 2024 г., Санкт-Петербург. Текст : непосредственный.
26. Наркология : национальное руководство / под редакцией Н.Н. Иванца, М.А. Винниковой. – 3-е изд., перераб. и доп. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2024. – 848 с. – ISBN: 978-5-9704-8363-3. Текст : непосредственный.
27. Новый дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора селективно активирует сигнальный путь MAPK-ERK / Т.А. Гудашева, А.В. Тарасюк, Н.М. Сазонова [и др.] // Доклады Академии наук». – 2017. – Т. 476. – № 1. – С. 108–112.
28. Оригинальный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 избирательно активирует пострецепторные пути TRKA, не вызывая побочных действий полноразмерного нейротрофина / Т.А. Гудашева, Т.А. Антипова, М.А.

Константинопольский [и др.] // Доклады Академии Наук. – 2014. – Т. 456. – № 2. – С. 231.

29. Оценка фармакологической безопасности нового дипептидного миметика 2-й петли BDNF при совместном введении с этанолом / А.В. Надорова, Е.М. Григоревских, А.В. Тарасюк [и др.] // Фармакокинетика и Фармакодинамика. – 2022. – № 4. – С. 55–61.

30. Патент на изобретение RU 2759023 С2 Низкомолекулярный миметик мозгового нейротрофического фактора с анальгетическим, анксиолитическим и антиаддиктивным действием / Колик Л.Г., Надорова А.В., Григоревских Е.М., Сазонова Н.М., Гудашева Т.А., Дурнев А.Д. Патент на изобретение RU 2759023 С2, 08.11.2021. Заявка № 2020116968 от 29.04.2020.

31. Патент на изобретение RU 2521226 С2 Средство для купирования алкогольного абстинентного синдрома / Середенин С.Б., Колик Л.Г., Козловская М.М., Надорова А.В. 27.06.2014. Бюл. №18 Заявка № 2012143852/15 от 15.10.2012.

32. Патент на изобретение RU 2582966 С2 Средство для снижения алкогольной мотивации при алкогольной зависимости / Середенин С.Б., Колик Л.Г., Надорова А.В. 27.04.2016 Бюл. №12. Заявка № 2014118884/15 от 12.05.2014

33. Пептидный миметик 2-й петли мозгового нейротрофического фактора ослабляет тревожную реакцию на стресс у мышей / Е.М. Григоревских, А.В. Надорова, С.А. Лебедева, Л.Г. Колик // Сборник: MedChem-Russia 2021. Материалы конференции 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием. – Волгоград, 2021. – С. 506.

34. Перегуд, Д.И. Роль нейротрофического фактора мозга BDNF в механизмах опийной абстиненции : экспериментальное исследование : специальность 1.5.24 «Нейробиология» : диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Перегуд, Данил Игорьевич ; ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». – Москва, 2023. – 222 с.

35. Поварнина, П.Ю. Нейропротекторная активность дипептидных миметиков BDNF, по-разному активирующих сопряженные с TRKB пути трансдукции сигнала, в условиях экспериментального ишемического инсульта / П.Ю. Поварнина

// Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. – Т. 83. – № 12. – С. 8–12.

36. Попова, Н.К. Нейротрофические факторы (BDNF, GDNF) и серотонинергическая система мозга / Н.К. Попова, Т.В. Ильчибаева, В.С. Науменко // Биохимия. – 2017. – Т. 82. – № 3. – С. 449–459.

37. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под редакцией А.Н. Миронова. – Ч.1. – М. : Гриф и К. – 2012. – 944 с. – ISBN 978-5-8125-1466-3. – Текст : непосредственный.

38. Савицкий, М.В. Клинико-экспериментальная фармакокинетика нового антибактериального средства Фтортиазинон : специальность 3.3.6. «Фармакология, клиническая фармакология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических / Савицкий, Марк Владиславович ; ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). – Москва, 2024. – 113 с.

39. Середенин, С.Б. Создание фармакологически активной малой молекулы, обладающей свойствами фактора роста нервов. / С.Б. Середенин, Т.А. Гудашева // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2015. – Т. 115. – № 6. – С. 63–70.

40. Синтез и биологические свойства нового дипептидного миметика 2-й петли мозгового нейротрофического фактора / Н.М. Сазонова, А.В. Тарасюк, А.Н. Шумский [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52. – № 9. – С. 14–21.

41. Сравнение нейропротекторных свойств дипептидных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель мозгового нейротрофического фактора на модели окислительного стресса *in vitro* / И.О. Логвинов, А.В. Тарасюк, Н.М. Сазонова [и др.] // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2018. – № 3. – С. 37–41.

42. Тарасюк, А.В. Дизайн, синтез и изучение связи структуры и фармакологической активности дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора : специальность 1.4.9. «Биоорганическая химия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Тарасюк,

Алексей Валерьевич ; ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова». – Москва, 2022. – 181 с.

43. Шестакова, К.М. Разработка биоаналитических методик для исследования фармакокинетики, метаболизма и фармакометаболизма инновационных лекарственных средств на основе натуральных простагландинов : специальность 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Шестакова, Ксения Михайловна ; ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). – Москва, 2022. – 166 с.

44. Экспериментальное изучение анксиолитической активности низкомолекулярных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель мозгового нейротрофического фактора / Л.Г. Колик, А.В. Надорова, Е.М. Григоревских [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. – Т. 83. – № 11. – С. 3–7.

45. A Brief Overview on BDNF-Trk Pathway in the Nervous System: A Potential Biomarker or Possible Target in Treatment of Multiple Sclerosis? / G. Schirò, S. Iacono, P. Ragonese [et al.] // *Frontiers in Neurology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 917527.

46. A Meta-Analysis of Brain-Derived Neurotrophic Factor Effects on Brain Volume in Schizophrenia: Genotype and Serum Levels / A.O. Ahmed, S. Kramer, N. Hofman [et al.] // *Neuropsychobiology*. – 2021. – Vol. 80. – № 5. – P. 411–424.

47. A Low-Molecular-Weight BDNF Mimetic, Dipeptide GSB-214, Prevents Memory Impairment in Rat Models of Alzheimer's Disease / P.Y. Povarnina, A.A. Volkova, O.N. Vorontsova [et al.] // *Acta Naturae*. – 2022. – Vol. 14. – № 4. – P. 94–100.

48. A novel dimeric dipeptide mimetic of the BDNF selectively activates the MAPK-Erk signaling pathway / T.A. Gudasheva, A.V. Tarasiuk, P.Yu. Povarnina [et al.] // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2017. – Vol. 476. – № 1. – P. 291–295.

49. A small peptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor promotes peripheral myelination / J. Xiao, R.A. Hughes, J.Y. Lim [et al.] // *Journal of Neurochemistry*. – 2013. – Vol. 125. – № 3. – P. 386–398.

50. Acute psychosocial stress increases serum BDNF levels: an antagonistic relation to cortisol but no group differences after mental training / R. Linz, L.M.C. Puhlmann, F.

- Apostolakou [et al.] // *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. – 2019. – Vol. 44. – № 10. – P. 1797–1804.
51. Adlard, P.A. The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across life-span / P.A. Adlard, V.M. Perreau, C.W. Cotman // *Neurobiology of Aging*. – 2005. – Vol. 26. – № 4. – P. 511–520.
52. Advancements in neurodegenerative diseases: Pathogenesis and novel neurorestorative interventions / W. Gao, S. Jing, C. He [et al.] // *Journal of Neurorestoratology*. – 2025. – Vol. 13. – № 2. – P. 100176.
53. Age and energy intake interact to modify cell stress pathways and stroke outcome / T.V. Arumugam, T.M. Phillips, A. Cheng [et al.] // *Annals of Neurology*. – 2010. – Vol. 67. – № 1. – P. 41–52.
54. Alcohol-induced cognitive deficits are associated with decreased circulating levels of the neurotrophin BDNF in humans and rats / D. Silva-Peña, N. Garcia-Marchena, F. Alen [et al.] // *Addiction Biology*. – 2019. – Vol. 24. – № 5. – P. 1019–1033.
55. Altered BDNF levels are associated with cognitive impairment in Parkinson's disease patients with depression / Y. Wang, L.-P. Bai, W. Liu [et al.] // *Parkinsonism & Related Disorders*. – 2022. – Vol. 103. – P. 122–128.
56. Aminooxyacetic acid ameliorates alcohol-induced learning and memory deficits through BDNF-TrkB pathway and calcium homeostasis / Z. Sun, M. Nie, X. Wang [et al.] // *European Journal of Medical Research*. – 2025. – Vol. 30. – P. 365.
57. Amitriptyline is a TrkA and TrkB receptor agonist that promotes TrkA/TrkB heterodimerization and has potent neurotrophic activity / S.-W. Jang, X. Liu, C.-B. Chan [et al.] // *Chemistry & Biology*. – 2009. – Vol. 16. – № 6. – P. 644–656.
58. Analysis of Antidepressant-like Effects and Action Mechanisms of GSB-106, a Small Molecule, Affecting the TrkB Signaling / Y.V. Vakhitova, T.S. Kalinina, L.F. Zainullina [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 24. – P. 13381.
59. Anxiolytic Action of Dipeptide Mimetic of the BDNF loop 2 in adult animals / L.G. Kolic, A.V. Nadorova, E.M. Grigorevskikh [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2024. – Vol. 177. – № 4. – P. 460–464.

60. Antidepressant effect of an orally administered dipeptide mimetic of the Brain-Derived Neurotrophic Factor / P.Y. Povarnina, T.L. Garibova, T.A. Gudasheva, S.B. Seredenin // *Acta Naturae*. – 2018. – Vol. 10. – № 3. – P. 81–84.
61. Antidepressant-like effect of losartan involves TRKB transactivation from angiotensin receptor type 2 (AGTR2) and recruitment of FYN / C.R. A. F. Diniz, P.C. Casarotto, S.M. Fred [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2018. – Vol. 135. – P. 163–171.
62. Antidepressant-like effects of BDNF and NGF individual loop dipeptide mimetics depend on the signal transmission patterns associated with Trk / A.G. Mezhlumyan, A.V. Tallerova, P.Y. Povarnina [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2022. – Vol. 15. – № 3. – P. 284.
63. Antidiabetic Properties of Low-Molecular-Weight BDNF Mimetics Depend on the Type of Activation of Post-Receptor Signaling Pathways / R.U. Ostrovskaya, S.S. Yagubova, T.A. Gudasheva, S.B. Seredenin // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2018. – Vol. 164. – № 6. – P. 734–737.
64. Autry, A.E. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders / A.E. Autry, L.M. Monteggia // *Pharmacological Reviews*. – 2012. – Vol. 64. – № 2. – P. 238–258.
65. Barde, Y.A. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain / Y.A. Barde, D. Edgar, H. Thoenen // *The EMBO journal*. – 1982. – Vol. 1. – № 5. – P. 549–553.
66. Bath, K.G. Stress effects on BDNF expression: effects of age, sex, and form of stress / K.G. Bath, A. Schilit, F.S. Lee // *Neuroscience*. – 2013. – Vol. 239. – P. 149–156.
67. Bathina, S. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications / S. Bathina, U.N. Das // *Archives of medical science: AMS*. – 2015. – Vol. 11. – № 6. – P. 1164–1178.
68. BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity / P. Kowiański, G. Lietzau, E. Czuba [et al.] // *Cellular and Molecular Neurobiology*. – 2018. – Vol. 38. – № 3. – P. 579–593.
69. BDNF and exercise enhance neuronal DNA repair by stimulating CREB-mediated production of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 / J.-L. Yang, Y.-T. Lin, P.-C. Chuang [et al.] // *Neuromolecular Medicine*. – 2014. – Vol. 16. – № 1. – P. 161–174.

70. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons / S. Dieni, T. Matsumoto, M. Dekkers [et al.] // *The Journal of Cell Biology*. – 2012. – Vol. 196. – № 6. – P. 775–788.
71. BDNF as a Promising Therapeutic Agent in Parkinson's Disease / E. Palasz, A. Wysocka, A. Gasiorowska [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 3. – P. 1170.
72. BDNF loss affects activity, sociability, and anxiety-like behaviour in zebrafish / T. Lucon-Xiccato, M. Tomain, S. D'Aniello, C. Bertolucci // *Behavioural Brain Research*. – 2023. – Vol. 436. – P. 114–115.
73. BDNF-mediated regulation of ethanol consumption requires the activation of the MAP kinase pathway and protein synthesis / J. Jeanblanc, M.L. Logrip, P.H. Janak, D. Ron // *The European Journal of Neuroscience*. – 2013. – Vol. 37. – № 4. – P. 607–612.
74. BDNF mimetic compound LM22A-4 regulates cementoblast differentiation via the TrkB–ERK/Akt signaling cascade / M. Kajiya, K. Takeshita, M. Kittaka [et al.] // *International Immunopharmacology*. – 2014. – Vol. 19. – № 2. – P. 245–252.
75. BDNF mRNA Expression in Leukocytes and Frontal Cortex Function in Drug Use Disorder / Q.S. Anders, L.V. Ferreira, L.C. Rodrigues [et al.] // *Frontiers in Psychiatry*. – 2020. – Vol. 11. – P. 469.
76. BDNF overexpression in the ventral hippocampus promotes antidepressant- and anxiolytic-like activity in serotonin transporter knockout rats / D.M. Diniz, F. Calabrese, P. Brivo [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 9. – P. 5040.
77. BDNF polymorphism: a review of its diagnostic and clinical relevance in neurodegenerative disorders / T. Shen, Y. You, C. Jaseph [et al.] // *Aging and Disease*. – 2018. – Vol. 9. – № 3. – P. 523–536.
78. BDNF pro-peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met / Mizui T., Y. Ishikawa, H. Kumanogoh [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – Vol. 112. – № 23. – P. E3067-3074.

79. BDNF pro-peptide regulates dendritic spines via caspase-3 / J. Guo, Y. Ji, Y. Ding [et al.] // *Cell Death & Disease*. – 2016. – Vol. 7. – № 6. – P. e2264.
80. BDNF Val66Met genotype and 6-month remission rates in late-life depression / W.D. Taylor, D.R. McQuoid, A. Ashley-Koch [et al.] // *The Pharmacogenomics Journal*. – 2011. – Vol. 11. – № 2. – P. 146–154.
81. BDNF Val66Met moderates memory impairment, hippocampal function and tau in preclinical autosomal dominant Alzheimer's disease / Y.Y. Lim, J. Hassenstab, C. Cruchaga [et al.] // *Brain: A Journal of Neurology*. – 2016. – Vol. 139. – № 10. – P. 2766–2777.
82. BDNF Val66Met variant and smoking in a Chinese population / X.Y. Zhang, D.C. Chen, M.H. Xiu [et al.] // *PloS One*. – 2012. – Vol. 7. – № 12. – P. e53295.
83. Behavioral effects of dimeric dipeptide bdnf mimetic GSB-106 in a rat model of depressive-like state / T.L. Garibova, V.A. Kraineva, S.O. Kotel'nikova [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2020. – Vol. 169. – № 2. – P. 286–289.
84. Benarroch, E.E. Brain-derived neurotrophic factor: Regulation, effects, and potential clinical relevance / E.E. Benarroch // *Neurology*. – 2015. – Vol. 84. – № 16. – P. 1693–1704.
85. Björkholm, C. BDNF – a key transducer of antidepressant effects / C. Björkholm, L.M. Monteggia // *Neuropharmacology*. – 2016. – Vol. 102. – P. 72–79.
86. Borodinova, A.A. Differences in the Biological Functions of BDNF and proBDNF in the Central Nervous System / A.A. Borodinova, S.V. Salozhin // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2017. – Vol. 47. – P. 251–265.
87. Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for obsessive-compulsive disorder: A meta-analysis / L.-S. Hao, Y. Du, L. Chen [et al.] // *Journal of Psychiatric Research*. – 2022. – Vol. 151. – P. 676–682.
88. Brain-derived neurotrophic factor in megakaryocytes / P. Chacón-Fernández, K. Säuberli, M. Colzani [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2016. – Vol. 291. – № 19. – P. 9872–9881.

89. Brain-derived neurotrophic factor levels across psychiatric disorders: A systemic review and network meta-analysis / Y. Zou, Y. Zhang, M. Tu [et al.] // *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. – 2024. – Vol. 131. – P. 110954.
90. Brain-derived neurotrophic factor levels in schizophrenia: a systematic review with meta-analysis / M.J. Green, S.L. Matheson, A. Shepherd [et al.] // *Molecular Psychiatry*. – 2011. – Vol. 16. – № 9. – P. 960–972.
91. Brain-derived neurotrophic factor, phosphorylated cyclic AMP response element binding protein and neuropeptide Y decline as early as middle age in the dentate gyrus and CA1 and CA3 subfields of the hippocampus / B. Hattiangady, M.S. Rao, G.A. Shetty, A.K. Shetty // *Experimental Neurology*. – 2005. – Vol. 195. – № 2. – P. 353–371.
92. Brain-derived neurotrophic factor signalling mediates the antidepressant-like effect of piperine in chronically stressed mice / Q.Q. Mao, Z. Huang, X.M. Zhong [et al.] // *Behavioural Brain Research*. – 2014. – Vol. 15. – № 261. – P. 140–145.
93. Brain plasticity and cognitive functions after ethanol consumption in C57BL/6J mice / E. Stragier, V. Martin, E. Davenas [et al.] // *Translational Psychiatry*. – 2015. – Vol. 5. – № 12. – P. e696.
94. Building healthcare capacity for neurodegenerative disease management in Nigeria: Challenges and opportunities / E. Kelechi Wisdom, T. Soyemi, S. Mayowa [et al.] // *Journal of Public Health Research*. – 2025. – Vol. 14. – № 2.
95. Camarini, R. Involvement of the opioid system in the development and expression of sensitization to the locomotor-activating effect of ethanol / R. Camarini, M.L. Nogueira Pires, H.M. Calil // *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. – 2000. – Vol. 3. – № 4. – P. 303–309.
96. Carpenter-Hyland, E.P. Homeostatic plasticity during alcohol exposure promotes enlargement of dendritic spines / E.P. Carpenter-Hyland, L.J. Chandler // *The European Journal of Neuroscience*. – 2006. – Vol. 24. – № 12. – P. 3496–3506.
97. Central and medial amygdaloid brain-derived neurotrophic factor signaling plays a critical role in alcohol-drinking and anxiety-like behaviors / S.C. Pandey, H. Zhang, A. Roy, K. Misra // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. – 2006. – Vol. 26. – № 32. – P. 8320–8331.

98. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex / S. Chiba, T. Numakawa, M. Ninomiya [et al.] // *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. – 2012. – Vol. 39. – № 1. – P. 112–119.
99. Chronically administered BDNF dipeptide mimetic GSB-106 prevents the depressive-like behavior and memory impairments after transient middle cerebral artery occlusion in rats / P.Y. Povarnina, T.A. Antipova, I.O. Logvinov [et al.] // *Current Pharmaceutical Design*. – 2023. – Vol. 29. – № 2. – P. 126–132.
100. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity / P.T. Pang, H.K. Teng, E. Zaitsev [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2004. – Vol. 306. – № 5695. – P. 487–491.
101. Colucci-D'Amato, L. Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer / L. Colucci-D'Amato, L. Speranza, F. Volpicelli // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 20. – P. 7777.
102. Corticostriatal BDNF and alcohol addiction / M.L. Logrip, S. Barac, V. Warnault, D. Ron // *Brain Research*. – 2015. – Vol. 1628. – № Pt A. – P. 60–67.
103. CTRP3 alleviates Ox-LDL-induced inflammatory response and endothelial dysfunction in mouse aortic endothelial cells by activating the PI3K/Akt/eNOS pathway / L. Chen, L. Qin, X. Liu [et al.] // *Inflammation*. – 2019. – Vol. 42. – № 4. – P. 1350–1359.
104. Curcumin can improve Parkinson's disease via activating BDNF/PI3k/Akt signaling pathways / T. Jin, Y. Zhang, B.O.A. Botchway [et al.] // *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. – 2022. – Vol. 164. – P. 113091.
105. Decreased peripheral brain-derived neurotrophic factor levels are a biomarker of disease activity in major psychiatric disorders: a comparative meta-analysis / B.S. Fernandes, M. Berk, C.W. Turck [et al.] // *Molecular Psychiatry*. – 2014. – Vol. 19. – № 7. – P. 750–751.

106. Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients with alcohol dependence / K.-H. Joe, Y.-K. Kim, S.-W. Roh [et al.] // *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. – 2007. – Vol. 31. – № 11. – P. 1833–1838.
107. Design and synthesis of dipeptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor / T.A. Gudasheva, A.V. Tarasiuk, S.V. Pomogailo [et al.] // *Bioorganicheskaiia Khimiia*. – 2012. – Vol. 38. – № 3. – P. 280–290.
108. Design of a conformationally defined and proteolytically stable circular mimetic of brain-derived neurotrophic factor / J.M. Fletcher, C.J. Morton, R.A. Zwar [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283. – № 48. – P. 33375–33383.
109. Determination of the immunostimulatory drug-glucosaminyl-muramyl-dipeptide- in human plasma using HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study / N.E. Moskaleva, P.A. Markin, R.M. Kuznetsov, S.A Appolonova // *Biomedical chromatography: BMP*. – 2020. – Vol. 34. – № 12. – P. e4948.
110. Devi, L. 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, reverses memory deficits and BACE1 elevation in a mouse model of Alzheimer's disease / L. Devi, M. Ohno // *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. – 2012. – Vol. 37. – № 2. – P. 434–444.
111. Diazepam causes sedative rather than anxiolytic effects in C57BL/6J mice / M. Pádua-Reis, D.A. Noga, A.B.L. Tort, M. Blunder // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 9335.
112. Differential regulation of the BDNF gene in cortical and hippocampal neurons / E.-E. Esvald, J. Tuvikene, A. Moistus [et al.] // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. – 2022. – Vol. 42. – № 49. – P. 9110–9128.
113. Dimeric mimetic of BDNF loop 4 promotes survival of serum-deprived cell through TrkB-dependent apoptosis suppression / L.F. Zainullina, Y.V. Vakhitova, A.Yu. Lusta [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 7781.
114. Dipeptide mimetic of the BDNF loop 4 possesses analgetic activity / T.A. Gudasheva, M.A. Konstantinopolsky, A.V. Tarasiuk [et al.] // *Doklady. Biochemistry and Biophysics*. – 2019. – Vol. 485. – № 1. – P. 123–125.

115. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters / P. Pruunsild, A. Kazantseva, T. Aid [et al.] // *Genomics*. – 2007. – Vol. 90. – № 3. – P. 397–406.
116. Dole, V.P. Toward an analogue of alcoholism in mice: scale factors in the model / V.P. Dole, R.T. Gentry // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1984. – Vol. 81. – № 11. – P. 3543–3546.
117. Effect of alcohol on Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) blood levels: a systematic review and meta-analysis / A. Shafiee, K. Jafarabady, M.A. Rafiei [et al.] // *Scientific Reports*. – 2023. – Vol. 13. – P. 17554.
118. Effect of BDNF Val66Met on disease markers in dominantly inherited Alzheimer's disease / Y.Y. Lim, J. Hassenstab, A. Goate [et al.] // *Annals of Neurology*. – 2018. – Vol. 84. – № 3. – P. 424–435.
119. Effect of clotting duration and temperature on BDNF measurement in human serum / P. Amadio, L. Sandrini, A. Ieraci [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18. – № 9. – P. 1987.
120. Effector immediate-early gene arc in the amygdala plays a critical role in alcoholism / S.C. Pandey, H. Zhang, R. Ugale [et al.] // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. – 2008. – Vol. 28. – № 10. – P. 2589–2600.
121. Effects of cigarette smoking and alcohol use on neurocognition and BDNF levels in a Chinese population / X.Y. Zhang, Y.-L. Tan, D.-C. Chen [et al.] // *Psychopharmacology*. – 2016. – Vol. 233. – № 3. – P. 435–445.
122. Effects of short deprivation and re-exposure intervals on the ethanol drinking behavior of selectively bred high alcohol-consuming rats / R.L. Bell, Z.A. Rodd, J.A. Schultz [et al.] // *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*. – 2008. – Vol. 42. – № 5. – P. 407–416.
123. Endogenous BDNF in the dorsolateral striatum gates alcohol drinking / J. Jeanblanc, D.-Y. He, S. Carnicella [et al.] // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. – 2009. – Vol. 29. – № 43. – P. 13494–13502.
124. Endogenous truncated TrkB.T1 receptor regulates neuronal complexity and TrkB kinase receptor function in vivo / L. Carim-Todd, K.G. Bath, G. Fulgenzi [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2009. – Vol. 29. – № 3. – P. 678–685.

125. Estimating the global incidence of traumatic brain injury / M.C. Dewan, A. Rattani, S. Gupta [et al.] // *Journal of Neurosurgery*. – 2019. – Vol. 130. – № 4. – P. 1080–1097.
126. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 / E. Nichols, J.D. Steinmetz, S.E. Vollset [et al.] // *The Lancet Public Health*. – 2022. – Vol. 7. – № 2.
127. Ethanol exposure affects trophic factor activity and responsiveness in chick embryo / M.B. Heaton, D.J. Swanson, M. Paiva, D.W. Walker // *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*. – 1992. – Vol. 9. – № 2. – P. 161–166.
128. Ethanol inhibits brain-derived neurotrophic factor stimulation of extracellular signal-regulated/mitogen-activated protein kinase in cerebellar granule cells / J.D. Ohrtman, E.K. Stancik, D.M. Lovinger, M.I. Davis // *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*. – 2006. – Vol. 39. – № 1. – P. 29–37.
129. Exploring female mice interstrain differences relevant for models of depression / D. de Sá-Calçada, S. Roque, C. Branco [et al.] // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. – 2015. – Vol. 9. – P. 335.
130. Female rats display enhanced rewarding effects of ethanol that are hormone dependent / O.V. Torres, E.M. Walker, B.S. Beas, L.E. O'Dell // *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. – 2014. – Vol. 38. – № 1. – P. 108–115.
131. Fenner, B.M. Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor / B.M. Fenner // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2012. – Vol. 23. – № 1–2. – P. 15–24.
132. Fletcher, J.M. Novel monocyclic and bicyclic loop mimetics of brain-derived neurotrophic factor / J.M. Fletcher, R.A. Hughes // *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*. – 2006. – Vol. 12. – № 8. – P. 515–524.
133. Flores-Bastías, O. Activation of melanocortin-4 receptor inhibits both neuroinflammation induced by early exposure to ethanol and subsequent voluntary alcohol intake in adulthood in animal models: is BDNF the key mediator? / O. Flores-Bastías, A. Adriasola-Carrasco, E. Karahanian // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2020. – Vol. 14. – P. 5.

134. Further evidence that the central nucleus of the amygdala is associated with the ethanol-induced locomotor response / K. Demarest, B. Hitzemann, E. Mahjubi [et al.] // *Alcohol Clin Exp Res.* – 1998. – Vol. 22. – № 7. – P. 1531-1537.
135. Gudasheva, T.A. Dipeptide mimetic of the brain-derived neurotrophic factor prevents impairments of neurogenesis in stressed mice / T.A. Gudasheva, P.Y. Povarnina, S.B. Seredenin // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* – 2017. – Vol. 162. – № 4. – P. 454–457.
136. Hashimoto, K. BDNF variant linked to anxiety-related behaviors / K. Hashimoto // *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology.* – 2007. – Vol. 29. – № 2. – P. 116–119.
137. Hensler, J.G. Ethanol consumption and serotonin-1A (5-HT_{1A}) receptor function in heterozygous BDNF (+/-) mice / J.G. Hensler, E.E. Ladenheim, W.E. Lyons // *Journal of Neurochemistry.* – 2003. – Vol. 85. – № 5. – P. 1139–1147.
138. Hitzemann, B. Chlordiazepoxide-induced expression of c-Fos in the central extended amygdala and other brain regions of the C57BL/6J and DBA/2J inbred mouse strains: relationships to mechanisms of ethanol action / B. Hitzemann, R. Hitzemann // *Alcohol Clinical and Experimental Research.* – 1999. Vol. 23. – № 7. – P. 1158–1172.
139. HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of desmethylmebeverine acid, mebeverine acid and mebeverine alcohol in human plasma along with its application to a pharmacokinetics study / N.E. Moskaleva, P.A. Baranov, N.V. Mesonzhnik [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* – 2017. – Vol. 138. – P. 118–125.
140. Imbalance of neurotrophin receptor isoforms TrkB-FL/TrkB-T1 induces neuronal death in excitotoxicity / O.G. Vidaurre, S. Gascon, R. Deodracias [et al.] // *Cell Death & Disease.* – 2012. – Vol. 3. – № 1. – P. e256.
141. Impact and mechanisms of action of BDNF on neurological disorders, cancer, and cardiovascular diseases / M. Lei, Q. Liu, J. Nie [et al.] // *CNS Neuroscience & Therapeutics.* – 2024. – Vol. 30. – № 12. – P. e70138.

142. Impact of genetic variant BDNF (Val66Met) on brain structure and function / Z.-Y. Chen, K. Bath, B. McEwen [et al.] // *Novartis Foundation Symposium*. – 2008. – Vol. 289. – P. 180–188.
143. Interactions between brain-derived neurotrophic factor and the TRKB receptor. Identification of two ligand binding domains in soluble TRKB by affinity separation and chemical cross-linking / M. Haniu, S. Montestrucque, E.J. Bures [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272. – № 40. – P. 25296–25303.
144. Interactions of neurotrophin-3 (NT-3), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and the NT-3.BDNF heterodimer with the extracellular domains of the TrkB and TrkC receptors / J. Philo, J. Talvenheimo, J. Wen [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1994. – Vol. 269. – № 45. – P. 27840–27846.
145. In vivo targeted metabolomic profiling of prostanit, a novel anti-PAD NO-donating alprostadil-based drug / K.M. Shestakova, N.E. Moskaleva, N.V. Mesonzhnik [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 24. – P. 5896.
146. Isoflurane produces antidepressant effects inducing BDNF-TrkB signaling in CUMS mice / S.-S. Zhang, Y.-H. Tian, S.-J. Jin [et al.] // *Psychopharmacology*. – 2019. – Vol. 236. – № 11. – P. 3301–3315.
147. Issa, G. An inverse relationship between cortisol and BDNF levels in schizophrenia: data from human postmortem and animal studies / G. Issa, C. Wilson, A.V. Terry, A. Pilai // *Neurobiology of Disease*. – 2010. – Vol. 39. – № 3. – P. 327–333.
148. Jurcau, M.-C. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases / M.-C. Jurcau, M.-C., A. Jurcau, R.-G. Diaconu // *Stresses*. – 2024. – Vol. 4. – P. 827-849
149. Kraemer, B.R. The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor / B.R. Kraemer, S.O. Yoon, B.D. Carter // *Handbook of experimental pharmacology*. – 2014. – Vol. 220. – P. 121–164.
150. Lack of serum antineuronal antibodies in children with autism / A.K. Bayram, F. Kardas, E.O. Demirci [et al.] // *Bratislavske Lekarske Listy*. – 2016. – Vol. 117. – № 2. – P. 77–79.

151. LC-MS/MS-based quantification of kynurenine metabolites, tryptophan, monoamines and neopterin in plasma, cerebrospinal fluid and brain / R. Fuertig, A. Ceci, S.M. Camus [et al.] // *Bioanalysis*. – 2016. – Vol. 8. – № 18. – P. 1903–1917.
152. LC-MS/MS determination of GTS-201, a dipeptide mimetic of the brain-derived neurotrophic factor, and neurotransmitter metabolites with application to a pharmacokinetic study in rats / P.A. Markin, N.E. Moskaleva, S.A. Lebedeva [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2023. – Vol. 223. – P. 115-125.
153. Lei, J. Projected global burden of brain disorders through 2050 (P7-15.001) / J. Lei, K. Gillespie // *Neurology*. – 2024. – Vol. 102. – № 7.
154. Lindholm, J.S.O. Mice with altered BDNF signaling as models for mood disorders and antidepressant effects / J.S.O. Lindholm, E. Castrén // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. – 2014. – Vol. 8. – P. 143.
155. Lindsley, T.A. Ethanol alters BDNF-induced Rho GTPase activation in axonal growth cones / T.A. Lindsley, S.N. Shah, E.A. Ruggiero // *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. – 2011. – Vol. 35. – № 7. – P. 1321–1330.
156. Lister, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse / R.G. Lister // *Psychopharmacology*. – 1987. – Vol. 92. – № 2. – P. 180–185.
157. Liu, C. 7,8-dihydroxyflavone, a small molecular TrkB agonist, is useful for treating various BDNF-implicated human disorders / C. Liu, C.B. Chan, K. Ye // *Translational Neurodegeneration*. – 2016. – Vol. 5. – P. 2.
158. Logrip, M.L. Dynorphin is a downstream effector of striatal BDNF regulation of ethanol intake / M.L. Logrip, P.H. Janak, D. Ron // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. – 2008. – Vol. 22. – № 7. – P. 2393–2404.
159. Logrip, M.L. Escalating ethanol intake is associated with altered corticostriatal BDNF expression / M.L. Logrip, P.H. Janak, D. Ron // *Journal of Neurochemistry*. – 2009. – Vol. 109. – № 5. – P. 1459–1468.
160. Lonsdorf, T.B. A review on experimental and clinical genetic associations studies on fear conditioning, extinction and cognitive-behavioral treatment / T.B. Lonsdorf, R. Kalisch // *Translational Psychiatry*. – 2011. – Vol. 1. – № 9. – P. e41.

161. Low-molecular mimetics of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor: Design and pharmacological properties / T. A. Gudasheva, P.Y. Povarnina, A.V. Tarasiuk, S.B. Seredenin // *Medicinal Research Reviews*. – 2020. – Vol. 41. – № 5. – P. 2746–2774.
162. Low-Molecular weight BDNF mimetic, dimeric dipeptide GSB-106, reverses depressive symptoms in mouse chronic social defeat stress / T.A. Gudasheva, A.V. Tallerova, A.G. Mezhlumyan [et al.] // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11. – № 2. – P. 252.
163. Low-Molecular-Weight mimetic of BDNF loop 2 reduces ethanol consumption in female rats / L.G. Kolik, A.V. Nadorova, E.M. Grigorevskikh [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2021. – Vol. 171. – № 4 – P. 441-444.
164. Lozano-Ureña, A. Differential contribution of TrkB and p75NTR to BDNF-dependent self-renewal, proliferation, and differentiation of adult neural stem cells / A. Lozano-Ureña, J.M. Frade // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2023. – Vol. 16. – P. 1271820.
165. Mimetics of brain-derived neurotrophic factor loops 1 and 4 are active in a model of ischemic stroke in rats / T.A. Gudasheva, P. Povarnina, I.O. Logvinov [et al.] // *Drug Design, Development and Therapy*. – 2016. – Vol. 10. – P. 3545–3553.
166. Moore, C.F. Alcohol preferring (P) rats as a model for examining sex differences in alcohol use disorder and its treatment / C.F. Moore, W.J. Lynch // *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. – 2015. – Vol. 132. – P. 1–9.
167. More Insight into BDNF against neurodegeneration: anti-apoptosis, anti-oxidation, and suppression of autophagy / S.-D. Chen, C.-L. Wu, W.-C. Hwang [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18. – № 3. – P. 545.
168. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited / T. Aid, A. Kazantseva, M. Piirsoo [et al.] // *Journal of Neuroscience Research*. – 2007. – Vol. 85. – № 3. – P. 525–535.
169. Neuroregenerative activity of the dipeptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor GSB-106 under experimental ischemic stroke / T.A. Gudasheva, P.Y. Povarnina, T.A. Antipova [et al.] // *CNS & neurological disorders drug targets*. – 2021. – Vol. 20. – № 10. – P. 954–962.

170. New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor / N.Q. McDonald, R. Lapatto, J. Murray-Rust [et al.] // *Nature*. – 1991. – Vol. 354. – № 6352. – P. 411–414.
171. Nonylphenol induces anxiety-like behavior in rats by regulating BDNF/TrkB/CREB signal network / L. Tang, S. Li, J. Yu [et al.] // *Food and Chemical Toxicology*. – 2022. – Vol. 166. – P. 113197.
172. Notaras, M. Neurobiology of BDNF in fear memory, sensitivity to stress, and stress-related disorders / M. Notaras, M. Buuse // *Molecular Psychiatry*. – 2020. – Vol. 25. – № 10. – P. 2251–2274.
173. NTRK2 (TrkB gene) variants and temporal lobe epilepsy: A genetic association study / C.M. Torres, M. Siebert, H. Bock [et al.] // *Epilepsy Research*. – 2017. – Vol. 137. – P. 1–8.
174. Numakawa, T. The role of Brain-Derived Neurotrophic Factor as an essential mediator in neuronal functions and the therapeutic potential of its mimetics for neuroprotection in neurologic and psychiatric disorders / T. Numakawa, R. Kajihara // *Molecules*. – 2025. – Vol. 30. – № 4. – P. 848.
175. Ohira, K. A new aspect of the TrkB signaling pathway in neural plasticity / K. Ohira, M. Hayashi // *Current Neuropharmacology*. – 2009. – Vol. 7. – № 4. – P. 276–285.
176. O’Leary P.D. Design of Potent Peptide Mimetics of Brain-derived Neurotrophic Factor / P.D. O’Leary, R.A. Hughes // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 28. – P. 25738–25744.
177. O’Leary, P.D. Structure-activity relationships of conformationally constrained peptide analogues of loop 2 of brain-derived neurotrophic factor / P.D. O’Leary, R.A. Hughes // *Journal of Neurochemistry*. – 1998. – Vol. 70. – № 4. – P. 1712–1721.
178. Optimization of a small tropomyosin-related kinase B (TrkB) agonist 7,8-dihydroxyflavone active in mouse models of depression / X. Liu, C.-B. Chan, Q. Qi [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2012. – Vol. 55. – № 19. – P. 8524–8537.
179. Park, H. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function / H. Park, M. Poo // *Nature Reviews. Neuroscience*. – 2013. – Vol. 14. – № 1. – P. 7–23.

180. Pharmacogenetic Analysis of the Interaction of the Low-Molecular-Weight BDNF Mimetic Dipeptide GSB-106 with TRK Receptors / T.A. Antipova, I.O. Logvinov, I.E. Deyev [et al.] // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2023. – Vol. 511. – № 1. – P. 166–168.
181. Pharmacokinetic Properties of the Novel Synthetic Cannabinoid 5F-APINAC and Its Influence on Metabolites Associated with Neurotransmission in Rabbit Plasma / K.M. Shestakova, N.V. Mesonzhnik, P.A. Markin [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2021. – Vol. 14. – № 7. – P. 668.
182. Pius-Sadowska, B. BDNF – a key player in cardiovascular system / E. Pius-Sadowska, B. Machaliński // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2017. – Vol. 110. – P. 54–60.
183. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel / Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou [et al.] // *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. – 2010. – Vol. 99. – № 3. – P. 306–314.
184. Protective Action of Neurotrophic Factors and Estrogen against Oxidative Stress-Mediated Neurodegeneration / T. Numakawa, T. Matsumoto, Y. Numakawa [et al.] // *Journal of Toxicology*. – 2011. – Vol. 2011. – P. 405194.
185. RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction / N.N.H. McGough, D.-Y. He, M.L. Logrip [et al.] // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. – 2004. – Vol. 24. – № 46. – P. 10542–10552.
186. Reduction of BDNF results in GABAergic neuroplasticity dysfunction and contributes to late-life anxiety disorder / G. Zhu, S. Xiaofei, Y. Yun [et al.] // *Behavioral Neuroscience*. – 2019. – Vol. 133. – № 2. – P. 212–224.
187. Robinson, T.E. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction / T.E. Robinson, K.P. Berridge // *Brain Research. Brain Research Reviews*. – 1993. – Vol. 18. – № 3. – P. 247–291.
188. Role of BDNF in Neuroplasticity Associated with Alcohol Dependence / D. Peregud, V.Yu. Baronets, N.N. Terebilina, N.V. Gulyaeva // *Biochemistry (Moscow)*. – 2023. – Vol. 88. – № 3. – P. 404–416.

189. Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses / H.S. Je, F. Yang, Y. Ji [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109. – № 39. – P. 15924–15929.
190. Ron, D. Targeting the intracellular signaling «STOP» and «GO» pathways for the treatment of alcohol use disorders / D. Ron, A. Berger // *Psychopharmacology*. – 2018. – Vol. 235. – № 6. – P. 1727–1743.
191. Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484) / M.L. Molendijk, P. Spinhoven, M. Polak [et al.] // *Molecular Psychiatry*. – 2014. – Vol. 19. – № 7. – P. 791–800.
192. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease / P. Scalzo, A. Kümmer, T.L. Bretas [et al.] // *Journal of Neurology*. – 2010. – Vol. 257. – № 4. – P. 540–545.
193. Short- and medium-term exposures of diazepam induce metabolomic alterations associated with the serotonergic, dopaminergic, adrenergic and aspartic acid neurotransmitter systems in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae / P.A. Markin, A. Brito, N.E. Moskaleva [et al.] // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics*. – 2021. – Vol. 38. – P. 100816.
194. Small-molecule TrkB receptor agonists improve motor function and extend survival in a mouse model of Huntington's disease / M. Jiang, Q. Peng, X. Liu [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 2013. – Vol. 22. – № 12. – P. 2462–2470.
195. Specificity in Trk receptor: neurotrophin interactions: the crystal structure of TrkB-d5 in complex with neurotrophin-4/5 / M.J. Banfield, R.L. Naylor, A.G. Robertson [et al.] // *Structure (London, England: 1993)*. – 2001. – Vol. 9. – № 12. – P. 1191–1199.
196. Steketee, J.D. Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior / J.D. Steketee, P.W. Kalivas // *Pharmacological Reviews*. – 2011. – Vol. 63. – № 2. – P. 348–365.

197. Study of structure-activity relationship in series of Gsb-106 analogues-dipeptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor / A.V. Tarasiuk, T.A. Gudasheva, N.M. Sazonova [et al.] // *Bioorganicheskaya Khimiya*. – 2014. – Vol. 40. – № 2. – P. 142–156.
198. Synaptic Ultrastructure Might Be Involved in HCN1-Related BDNF mRNA in Withdrawal-Anxiety After Ethanol Dependence / L. Hou, Y. Guo, B. Lian [et al.] // *Frontiers in Psychiatry*. – 2018. – Vol. 9. – P. 215.
199. Targeting TrkB with a Brain-Derived Neurotrophic Factor Mimetic Promotes Myelin Repair in the Brain / J.L. Fletcher, R.J. Wood, J. Nguyen [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2018. – Vol. 38. – № 32. – P. 7088–7099.
200. TDP6, a brain-derived neurotrophic factor-based trkB peptide mimetic, promotes oligodendrocyte myelination / A.W. Wong, L. Giuffrida, R. Wood [et al.] // *Molecular and Cellular Neurosciences*. – 2014. – Vol. 63. – P. 132–140.
201. The BDNF mimetic R-13 attenuates TBI pathogenesis using TrkB-related pathways and bioenergetics / P. Thapak, G. Smith, Z. Ying [et al.] // *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*. – 2023. – Vol. 1869. – № 7. – P. 166781.
202. The dopamine D3 receptor is part of a homeostatic pathway regulating ethanol consumption / J. Jeanblanc, D.-Y. He, N.N.H. McGough [et al.] // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. – 2006. – Vol. 26. – № 5. – P. 1457–1464.
203. The low molecular weight Brain-derived Neurotrophic Factor mimetics with antidepressant-like activity / T.A. Gudasheva, P. Povarnina, A.V. Tarasiuk, S.B. Seredenin // *Current Pharmaceutical Design*. – 2019. – Vol. 25. – № 6. – P. 729–737.
204. The prodrug of 7,8-dihydroxyflavone development and therapeutic efficacy for treating Alzheimer's disease / C. Chen, Z. Wang, Z. Zhang [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2018. – Vol. 115. – № 3. – P. 578–583.
205. The role of amygdaloid brain-derived neurotrophic factor, activity-regulated cytoskeleton-associated protein and dendritic spines in anxiety and alcoholism / S. Moonat, A.J. Sakharkar, H. Zhand [et al.] // *Addiction Biology*. – 2011. – Vol. 16. – № 2. – P. 238–250.

206. The TRKB rs2289656 genetic polymorphism is associated with acute suicide attempts in depressed patients: A transversal case control study / E. Deflesselle, R. Colle, L. Rigal [et al.] // *PloS One*. – 2018. – Vol. 13. – № 10. – P. e0205648.
207. Translational findings on brain-derived neurotrophic factor and anxiety: contributions from basic research to clinical practice / A.C. Domingos da Silveira da Luz, G. Pereira Dias, M.C. do Nascimento Bevilaqua [et al.] // *Neuropsychobiology*. – 2013. – Vol. 68. – № 3. – P. 129–138.
208. Traumatic brain injury: progress and challenges in prevention, clinical care, and research / A.I.R Maas, D.K. Menon, G.T. Manley [et al.] // *Lancet Neurol*. – 2022. – Vol. 21. – № 11. – P. 1004–1060.
209. Ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with electrospray ionization quantification of tryptophan metabolites and markers of gut health in serum and plasma-application to clinical and epidemiology cohorts / L. Whiley, L.C. Nye, I. Grant [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2019. – Vol. 91. – № 8. – P. 5207–5216.
210. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat / S. Pellow, P. Chopin, S.E. File, M. Briley // *Journal of Neuroscience Methods*. – 1985. – Vol. 14. – № 3. – P. 149–167.
211. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor / T. Nakahashi, H. Fujimura, C.A. Altar [et al.] // *FEBS letters*. – 2000. – Vol. 470. – № 2. – P. 113–117.
212. Various BDNF administrations attenuate SPS-induced anxiety-like behaviors / J.-B. Yin, H.-X. Liu, W. Shi [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2022. – Vol. 788. – P. 136851.
213. Varlinskaya, E.I. Ethanol intake under social circumstances or alone in sprague-dawley rats: impact of age, sex, social activity, and social anxiety-like behavior / E.I. Varlinskaya, E.M. Truxell, L.P. Spear // *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. – 2015. – Vol. 39. – № 1. – P. 117–125.
214. Voluntary exercise decreases ethanol preference and consumption in C57BL/6 adolescent mice: sex differences and hippocampal BDNF expression / X. Gallego, R.J. Cox, E. Funk [et al.] // *Physiology & Behavior*. – 2015. – Vol. 138. – P. 28–36.

215. Weidner, K.L. Mice over-expressing BDNF in forebrain neurons develop an altered behavioral phenotype with age / K.L. Weidner, D.F. Buenaventura, K.K. Chadman // Behavioral Brain Research. – 2014. – Vol. 268. – P. 222–228.
216. West, A.E. Neurotrophins: transcription and translation / A.E. West, P. Pruunsild, T. Timmusk // Handbook of Experimental Pharmacology. – 2014. – Vol. 220. – P. 67–100.
217. Yabuki, Y. Clinical Therapeutic Strategy and Neuronal Mechanism Underlying Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD) / Y. Yabuki, K. Fukunaga // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 15. – № 20.
218. Yan, Q.-S. Different expression of brain-derived neurotrophic factor in the nucleus accumbens of alcohol-preferring (P) and -nonpreferring (NP) rats / Q.-S. Yan, M.-J. Feng, S.-E. Yan // Brain Research. – 2005. – Vol. 1035. – № 2. – P. 215–218.
219. Yang, S. 7,8-Dihydroxyflavone and Neuropsychiatric Disorders: A Translational Perspective from the Mechanism to Drug Development / S. Yang, G. Zhu // Current Neuropharmacology. – 2022. – Vol. 20. – № 8. – P. 1479–1497.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А1 – Хромато-масс-спектрометрические параметры определяемых эндогенных метаболитов [137]

Вещества	Время удерживания (мин)	Родительский ион (m/z, Da)	Дочерний ион (Da)	Фрагментор (В)	СЕ (V)
ГАМК	1,1	104,0	87,0	90	10
ГАМК-d6	1,1	110,0	93,1	90	10
Триптофан	5,3	203,0	142,0	100	-15
Триптофан-d5	5,3	208,3	147,0	100	-15
Метилтриптофан	6,1	219,0	146,0	90	20
5-гидрокси-триптофан	3,3	221,0	204,0	90	10
Кинуренин	4,6	209,1	146,0	95	30
Кинуренин-d4	4,6	213,0	98,1	95	10
Кинуреновая кислота	6,6	190,1	144,1	95	20
Кинуреновая кислота-d5	6,6	195,1	149,1	95	20
Дофамин	3,2	154,1	119,1	90	20
Дофамин-d4	3,2	158,1	123,1	90	20
Серотонин	5,6	160,1	105,1	120	30
Серотонин-d4	5,6	181,1	164,0	90	7
5-гидроксииндолуксусная кислота	5,9	192,1	146,1	100	20

Продолжение Таблицы А1

Вещества	Время удерживания (мин)	Родительский ион (m/z, Da)	Дочерний ион (Da)	Фрагментор (В)	СЕ (V)
5-гидроксииндол-d5 уксусная кислота	5,9	197,1	150,1	100	20
Триптамин	6,3	161,1	144,0	95	10
5-Метокси-триптамин	6,4	191	174,0	90	10
Норметанефрин	1,78	166	134,0	100	15
Норметанефрин-d3	1,78	187	134,0	100	15
Норэпинефрин	1,1	152	107,0	110	20
Эпинефрин	1,4	184	133,0	90	5
Метанефрин	2,75	198	165,0	90	20
3-Гидрокси-кинуренин	3,9	225	162,0	90	22
Ксантуреновая кислота	5,3	206,1	160,0	95	20
Ксантуреновая кислота-d4	5,3	210,1	164,1	95	30
Хинолиновая кислота	2,7	168,1	78,1	95	30
Хинолиновая кислота-d3	2,7	171,1	81,1	95	30
Индол-3-пропионовая кислота	7,4	190,1	130,1	95	20

Продолжение Таблицы А1

Вещества	Время удерживания (мин)	Родительский ион (m/z, Da)	Дочерний ион (Da)	Фрагментор (В)	СЕ (V)
Индол-3-пропионовая кислота-d2	7,4	192,1	130,1	95	20
Индол-3-уксусная кислота	7,1	176,1	130,1	95	20
Индол-3-уксусная кислота-d4	7,1	180,1	133,1	95	20
Индол-3-молочная кислота	6,8	206,1	118,1	95	22
Индол-3-молочная кислота-d5	6,8	211	122,0	95	22
Кортизол	6,8	363	121,0	120	20
5-гидрокси-триптофол	5,5	178	160,0	100	15
Индол-3-этанол	7,1	162,1	144,1	100	13
Индол-3-карбоксальдегид	7,2	146,1	118,1	95	15
Индол-3-карбоксальдегид-13C8	7,2	154,1	126,1	95	15

Примечание: СЕ – энергия соударения. V – вольт, m – масса иона, z – заряд иона.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б1 – Калибровочные параметры для определяемых веществ [137]

Вещество	Внутренний стандарт	Концентрация внутреннего стандарта (нМ)	Диапазон калибровки (нМ)	Калибровочная кривая	R
Триптофан	Триптофан-d5	1000	100 -40000	$y=4,35x - 0,80$	0,9985
Метилтриптофан	5-Гидроксииндол- уксусная кислота-d5	100	0,2-200	$y=3,36x - 0,02$	0,9995
5-Гидрокситриптофан	Кинуренин-d4	1000	0,2-200	$y=19,47x - 0,01$	0,9993
Кинуренин	Кинуренин-d4	1000	5-5000	$y=3,20x + 0,05$	0,9997
Кинуреновая кислота	Кинуреновая кислота-d5	100	0,2-200	$y=1,08x + 0,02$	0,9987
ГАМК	ГАМК-d6	100	0,2-200	$y=0,81x + 0,04$	0,9889
Дофамин	Дофамин-d4	100	0,2-200	$y=0,84x - 0,01$	0,9990
Серотонин	Серотонин-d4	1000	2-2000	$y=0,71x - 0,04$	0,9996
5-Гидрокси-индол- уксусная кислота	Гидроксииндолуксусная кислота-d5	100	0,2-200	$y=1,44x + 0,07$	0,9805
Триптамин	Гидроксииндолуксусная кислота-d5	100	0,2-200	$y=125,67 + 0,06$	0,9956

Продолжение Таблицы Б1

Вещество	Внутренний стандарт	Концентрация внутреннего стандарта (нМ)	Диапазон калибровки (нМ)	Калибровочная кривая	R
Норметанефрин	Норметанефрин-d3	100	0,2-200	$y=24,96x - 0,12$	0,9992
Норэпинефрин	Норметанефрин-d3	100	0,2-200	$y=14,12x - 0,04$	0,9995
Эпинефрин	Норметанефрин-d3	100	0,2-200	$y=119,35x + 0,70$	0,9958
Метанефрин	Норметанефрин-d3	100	0,2-200	$y=65,44x - 0,69$	0,9980
3-Гидроксикинуренин	3-Гидроксикинуренин ¹³ C ₂	100	0,2-200	$y=0,64x + 0,03$	0,9995
Ксантуреновая кислота	Ксантуреновая кислота-d4	100	0,2-200	$y=9,55x - 0,03$	0,9998
Хинолиновая кислота	Хинолиновая кислота-d3	1000	2-2000	$y=2,34x - 0,21$	0,9983
Индол-3-пропионовая кислота	Индол-3-пропионовая кислота-d2	1000	2-2000	$y=0,79x - 0,03$	0,9997
Индол-3-уксусная кислота	Индол-3-уксусная кислота-d4	1000	2-2000	$y=1,15x - 0,01$	0,9998
Индол-3-молочная кислота	Индол-3-молочная кислота-d5	1000	2-2000	$y=2,52x - 0,02$	0,9988
Кортизол	Кортизол-d3	100	0,2-200		0,9957

Продолжение Таблицы Б1

Вещество	Внутренний стандарт	Концентрация внутреннего стандарта (нМ)	Диапазон калибровки (нМ)	Калибровочная кривая	R
Индол-3-этанол	5-Гидроксииндол- уксусная кислота-d5	100	0,2-200	$y=1,22x + 0,03$	0,9984
Индол-3-карбокси- альдегид	Индол-3-карбокси- альдегид -13C8	100	0,2-200	$y=0,59x + 0,01$	0,9966
Индол-3-масляная кислота	Индол-3-масляная кислота-d4	100	0,2-200	$y=0,053x + 0,03$	0,9984
Примечание. R – коэффициент корреляции.					

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Таблица В1 – Правильность и воспроизводимость анализа нейромедиаторов и соединений, связанных с триптофаном [137]

Внутри одного аналитического цикла (n = 6)					
Вещество	Номинальная концентрация, (нМ)	Экспериментально рассчитанная (Mean)	SD	RSD (%) (воспроизводимость)	Правильность (%)
Триптофан	40000	41391	2158	5,21	3,48
	20000	23684	1854	7,83	13,42
	300	148	5,8	3,92	-1,33
	100	105	3,8	3,68	5,41
ГАМК	160	168	5,4	3,21	5,00
	80	89	3,5	3,93	11,25
	0,6	0,63	0,04	6,35	5,00
	0,2	0,19	0,01	3,68	-2,57
Метилтриптофан	160	171	2,54	1,49	6,88
	80	86	2,4	2,79	7,50
	0,6	0,64	0,05	7,81	6,67
	0,2	0,18	0,02	5,78	-5,48

Продолжение Таблицы В1

Вещество	Номинальная концентрация, (нМ)	Экспериментально рассчитанная, (Mean)	SD	RSD (%) (воспроизводимость)	Правильность (%)
5-Гидрокситриптофан	160	158	2,65	1,68	-1,25
	80	84,1	2,5	2,97	5,12
	0,6	0,61	0,06	9,84	1,67
	0,2	0,23	0,04	8,49	12,09
Кинуренин	4000	4031,2	32,5	0,81	0,78
	2000	2078,3	21,5	1,03	3,92
	15	16,8	1,5	8,93	12,00
	5	5,6	0,42	5,91	10,89
Кинуреновая кислота	160	178,1	6,3	3,54	11,31
	80	85,4	5,8	6,79	6,75
	0,6	0,59	0,045	7,63	-1,67
	0,2	0,2	0,012	1,73	-0,89
Дофамин	160	149,8	2,5	1,67	-6,37
	80	83,1	4,9	5,90	3,87
	0,6	0,61	0,023	3,77	1,67

Продолжение Таблицы В1

Вещество	Номинальная концентрация, (нМ)	Экспериментально рассчитанная, (Mean)	SD	RSD (%) (воспроизводимость)	Правильность (%)
Дофамин	0,2	0,2	0,014	2,70	2,74
Серотонин	1600	1689	42,1	2,49	5,56
	800	863	12,5	1,45	7,88
	6	6,3	0,25	3,97	5,00
	2	2,1	0,09	4,81	3,79
5-Гидроксииндолуксусная кислота	160	180,2	21,5	11,93	12,63
	80	79,5	8,4	10,57	-0,63
	0,6	0,65	0,025	3,85	8,33
	0,2	0,19	0,009	2,87	-1,87
Триптамин	160	158,9	15,8	9,94	-0,69
	80	80,3	8,4	10,46	0,37
	0,6	0,58	0,025	4,31	-3,33
	0,2	0,2	0,011	2,18	-0,18
5-Метокситриптамин	160	164,2	2,5	1,52	2,62
	80	80,3	1,2	1,49	0,37

Продолжение Таблицы В1

Вещество	Номинальная концентрация, (нМ)	Экспериментально рассчитанная, (Mean)	SD	RSD (%) (воспроизводимость)	Правильность (%)
5-Метокситриптами́н	0,6	0,61	0,015	2,46	1,67
	0,2	0,19	0,008	2,91	-3,71
Норметанефрин	160	160,8	15,1	9,39	0,50
	80	85,3	5,8	6,80	6,63
	0,6	0,54	0,024	4,44	-10,00
	0,2	0,18	0,005	5,94	-11,87
Норэпинефрин	160	158	6,9	4,37	-1,25
	80	83	1,3	1,57	3,75
	0,6	0,63	0,025	3,97	5,00
	0,2	0,2	0,017	2,48	-0,89
Эпинефрин	160	171	5,8	3,39	6,88
	80	84	1,5	1,79	5,00
	0,6	0,59	0,056	9,49	-1,67
	0,2	0,21	0,021	5,81	6,90

Продолжение Таблицы В1

Вещество	Номинальная концентрация, (нМ)	Экспериментально- рассчитанная, (Mean)	SD	RSD (%) (воспроизводимость)	Правильность (%)
Метанефрин	160	158,7	8,9	5,61	-0,81
	80	82,5	0,45	0,55	3,13
	0,6	0,58	0,045	7,76	-3,33
	0,2	0,2	0,008	2,07	2,60
3-Гидроксикинуруенин	160	171	12,1	7,08	6,88
	80	84,5	5,8	6,86	5,63
	0,6	0,67	0,058	8,66	11,67
	0,2	0,2	0,014	2,96	3,61
Ксантуреновая кислота	160	168	12,1	7,20	5,00
	80	84	8,7	10,36	5,00
	0,6	0,62	0,054	8,71	3,33
	0,2	0,19	0,012	6,72	-7,28
Хинолиновая кислота	1600	1742	85,4	4,90	8,88
	800	865	8,6	0,99	8,13
	6	5,3	0,25	4,72	-11,67

Продолжение Таблицы В1

Вещество	Номинальная концентрация, (нМ)	Экспериментально- рассчитанная, (Mean)	SD	RSD (%) (воспроизводимость)	Правильность (%)
Хинолиновая кислота	2	1,8	0,15	12,17	-8,64
Индол-3-пропионовая кислота	1600	1756	201,3	11,46	9,75
	800	823	84,5	10,27	2,88
	6	6,8	1,2	14,65	13,33
	2	2,0	0,3	2,89	-1,04
Индол-3-уксусная кислота	1600	1578	84,9	5,38	-1,38
	800	852	71,2	8,36	6,50
	6	6,2	0,54	8,71	3,33
	2	2,0	0,09	1,97	0,89
Индол-3-молочная кислота	1600	1687	45,2	2,68	5,44
	800	816	17,1	2,10	2,00
	6	6,1	0,38	6,23	1,67
	2	2,0	0,11	2,87	1,91
Кортизол	160	168	12,4	7,38	5,00
	80	84	5,8	6,90	5,00

Продолжение Таблицы В1

Вещество	Номинальная концентрация, (нМ)	Экспериментально- рассчитанная, (Mean)	SD	RSD (%) (воспроизводимость)	Правильность (%)
Кортизол	0,6	0,62	0,09	14,52	3,33
	0,2	0,2	0,02	2,76	3,71
3-Гидрокортизол	160	168	18,7	11,13	5,00
	80	74	5,6	7,57	-7,50
	0,6	0,56	0,08	14,29	-6,67
	0,2	0,2	0,03	0,91	-0,37
Индол-3-этанол	160	148	15,7	10,61	-7,50
	80	84	5,8	6,90	5,00
	0,6	0,64	0,089	13,91	6,67
	0,2	0,21	0,03	6,71	5,94
Индол-3-карбоксальдегид	160	165	14,8	8,97	3,13
	80	87	5,7	6,55	8,75
	0,6	0,57	0,018	3,16	-5,00
	0,2	0,2	0,05	0,51	0,23

Продолжение Таблицы В1

Вещество	Номинальная концентрация, (нМ)	Экспериментально- рассчитанная, (Mean)	SD	RSD (%) (воспроизводимость)	Правильность (%)
Индол-3-масляная кислота	160	168	12,4	7,38	5,00
	80	78	5,8	7,44	-2,50
	0,6	0,57	0,058	10,18	-5,00
	0,2	0,2	0,02	3,97	-1,09
	Между аналитическими циклами (n = 18)				
Триптофан	40000	40894	1948	4,76	2,24
	20000	22888	8945	39,08	14,44
	300	152	6,2	4,08	1,33
	100	105	4,5	6,80	5,37
ГАМК	160	164	6,4	3,90	2,50
	80	87	4,2	4,83	8,75
	0,6	0,62	0,05	8,06	3,33
	0,2	0,2	0,02	2,08	-1,07
Метилтриптофан	160	168	2,48	1,48	5,00
	80	85	2,4	2,82	6,25

Продолжение Таблицы В1

Вещество	Номинальная концентрация, (нМ)	Экспериментально-рассчитанная, (Mean)	SD	RSD (%) (воспроизводимость)	Правильность (%)
Метилтриптофан	0,6	0,63	0,06	9,52	5,00
	0,2	0,19	0,02	5,09	-6,71
5-Гидрокситриптофан	160	161	1,59	0,99	0,63
	80	86,9	2,6	2,99	8,63
	0,6	0,6	0,07	11,67	0,00
	0,2	0,21	0,03	2,97	4,82
Кинуренин	4000	4089	19,1	0,47	2,23
	2000	2085	17,8	0,85	4,25
	15	15,3	1,9	12,42	2,00
	5	5,2	0,6	4,87	4,38
Кинуреновая кислота	160	169	6,1	3,61	5,63
	80	84	4,3	5,12	5,00
	0,6	0,58	0,08	13,79	-3,33
	0,2	0,2	0,01	0,98	-0,31

Продолжение Таблицы В1

Вещество	Номинальная концентрация, (нМ)	Экспериментально- рассчитанная, (Mean)	SD	RSD (%) (воспроизводимость)	Правильность (%)
Дофамин	160	150,3	2,4	1,60	-6,06
	80	82,1	6,8	8,28	2,62
	0,6	0,6	0,03	5,00	0,00
	0,2	0,2	0,01	2,78	1,28
Серотонин	1600	1597	40,8	2,55	-0,19
	800	852	15,9	1,87	6,50
	6	6,1	0,37	6,07	1,67
	2	2,1	0,11	4,81	6,08
5-Гидроксииндолуксусная кислота	160	170,5	22,6	13,26	6,56
	80	85,6	9,7	11,33	7,00
	0,6	0,62	0,05	8,06	3,33
	0,2	0,19	0,02	5,28	-3,68
Триптамин	160	162,5	16,8	10,34	1,56
	80	81,5	7,8	9,57	1,88
	0,6	0,65	0,08	12,31	8,33

Продолжение Таблицы В1

Вещество	Номинальная концентрация, (нМ)	Экспериментально- рассчитанная, (Mean)	SD	RSD (%) (воспроизводимость)	Правильность (%)
Триптамин	0,2	0,19	0,03	7,14	-7,14
5-Метокситриптамин	160	165,8	1,8	1,09	3,63
	80	84,5	0,8	0,95	5,63
	0,6	0,64	0,06	9,38	6,67
	0,2	0,2	0,01	2,07	-1,38
Норметанефрин	160	164,1	14,8	9,02	2,56
	80	84,9	6,9	8,13	6,13
	0,6	0,61	0,04	6,56	1,67
	0,2	0,19	0,01	4,42	3,91
Норэпинефрин	160	162	7,3	4,51	1,25
	80	81,9	5,4	6,59	2,38
	0,6	0,61	0,07	11,48	1,67
	0,2	0,19	0,02	3,58	-5,94
Эпинефрин	160	164	6,1	3,72	2,50
	80	82	1,8	2,20	2,50

Продолжение Таблицы В1

Вещество	Номинальная концентрация, (нМ)	Экспериментально- рассчитанная, (Mean)	SD	RSD (%) (воспроизводимость)	Правильность (%)
Эпинефрин	0,6	0,61	0,06	9,84	1,67
	0,2	0,19	0,02	2,38	-4,87
Метанефрин	160	164	7,8	4,76	2,50
	80	80,9	0,51	0,63	1,13
	0,6	0,62	0,06	9,68	3,33
	0,2	0,2	0,01	0,98	1,06
3-Гидроксикинуренин	160	156	7,9	5,03	-2,50
	80	77,7	6,7	8,61	-2,91
	0,6	0,7	0,09	13,22	12,55
	0,2	0,2	0,02	2,09	0,71
	160	164	7,8	4,71	2,47
Ксантуреновая кислота	80	80,2	6,1	7,61	0,21
	0,6	0,65	0,08	10,65	14,06
	0,2	0,2	0,03	2,96	0,38

Продолжение Таблицы В1

Вещество	Номинальная концентрация, (нМ)	Экспериментально рассчитанная, (Mean)	SD	RSD (%) (воспроизводимость)	Правильность (%)
Хинолиновая кислота	1600	1594	105,6	6,62	-0,38
	800	822	44,5	5,41	2,85
	6	5,8	0,32	5,5	-2,13
	2	2,2	0,17	8,41	-11,08
Индол-3-пропионовая кислота	1600	1614	111,5	6,91	0,89
	800	820,4	62,7	7,64	2,58
	6	5,7	0,34	5,2	-3,38
	2	2,1	0,11	4,28	6,17
Индол-3-уксусная кислота	1600	1539	82,5	5,36	-3,77
	800	803	76,1	9,46	0,41
	6	5,9	0,31	5,22	-1,14
	2	2,1	0,09	4,27	5,97
Индол-3-молочная кислота	1600	1603	109,4	6,82	0,20
	800	768	37,3	4,86	-4,00
	6	6,1	0,14	2,22	1,54

Продолжение Таблицы В1

Вещество	Номинальная концентрация, (нМ)	Экспериментально рассчитанная, (Mean)	SD	RSD (%) (воспроизводимость)	Правильность (%)
Индол-3-молочная кислота	2	2,0	0,07	2,03	3,41
Кортизол	160	152	5,5	3,64	-5,17
	80	80,3	5,8	7,24	0,45
	0,6	0,61	0,04	7,2	0,99
	0,2	1,9	0,01	3,16	-2,97
3-Гидрокситриптофол	160	162	9,1	5,48	4,89
	80	81,1	3,4	4,23	1,45
	0,6	0,57	0,07	12,06	-3,36
	0,2	2,0	0,02	2,19	1,05
Индол-3-этанол	160	162	9,1	5,48	4,89
	80	81,1	3,4	4,23	1,45
	0,6	0,57	0,07	12,06	-3,36
	0,2	2,0	0,02	2,43	2,35
Индол-3-карбоксальдегид	160	158,5	9,9	6,26	-0,94
	80	84,2	1,6	1,9	5,2

Продолжение Таблицы В1

Вещество	Номинальная концентрация, (нМ)	Экспериментально- рассчитанная, (Mean)	SD	RSD (%) (воспроизводимость)	Правильность (%)
Индол-3-карбоксальдегид	0,6	0,55	0,06	11,79	-8,56
	0,2	2,0	0,02	3,97	2,45
Индол-3-масляная кислота	160	155	12,4	7,94	-2,7
	80	79,5	6,1	7,61	-0,62
	0,6	0,53	0,07	13,32	-10,43
	0,2	2,0	0,02	3,78	1,95
Примечание: SD – стандартное отклонение, RSD – коэффициент вариации, Mean – среднее значение.					

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Таблица Г1 – Эффект матрицы и степень извлечения нейромедиаторов и соединений, связанных с триптофаном [137]

Вещество	Концентрация, (нМ)	Эффект матрицы (%)		Кэфф. экстракции (%)		Степень извлечения (%)	
		Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
Триптофан	40000	102,8	5,7	98,8	7,07	100,9	3,76
	300	102,6	3,5	103,1	4,65	99,6	2,00
ГАМК	160	102,3	4,3	97	5,53	104,1	2,64
	0,6	104,4	4,4	98	5,64	103,6	2,72
Метилтриптофан	160	102,9	2,4	95,3	3,44	105	1,12
	0,6	94,6	2,1	102,5	3,11	99,3	0,88
5-Гидрокси-триптофан	160	117,3	2,7	106,6	3,77	111,7	1,36
	0,6	98,7	2,4	104,3	3,44	102,5	1,12
Кинуренин	4000	91,3	6,8	101,6	8,28	101,6	4,64
	15	102,1	2,8	104	3,88	103,3	1,44
Кинуреновая кислота	160	94,1	4,6	80,7	5,86	104	2,88
	0,6	97,2	4,7	91,7	5,97	103,5	2,96
Серотонин	1600	92,7	2,5	94,8	3,55	102,5	1,20
	0,6	93,4	3,9	104,7	5,09	106,6	2,32

Продолжение Таблицы Г1

Вещество	Концентрация, (нМ)	Эффект матрицы (%)		Коэфф. экстракции (%)		Степень извлечения (%)	
		Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
Дофамин	160	53,2	6	96,2	7,40	104,3	4,00
	0,6	93,1	4,6	101,4	5,86	82,7	2,88
5-Гидроксииндол-уксусная кислота	160	90,7	2,7	95,3	3,77	110,5	1,36
	0,6	84,3	1,1	101,6	2,01	83,1	0,08
Триптамин	160	97,5	3,5	80,2	4,65	96,6	2,00
	0,6	103,3	3,5	93	4,65	96,6	2,00
5-Метилтриптамин	160	101,1	5,4	91,8	6,74	99,5	3,52
	0,6	100,9	3,2	102,7	4,32	103,1	1,76
Норметанефрин	160	104,1	4,2	96,6	5,42	106,2	2,56
	0,6	103,6	4,3	102,6	5,53	91,3	2,64
Метанефрин	160	104,7	3,6	102,3	4,76	103,1	2,08
	0,6	96,2	2,9	104,4	3,99	101,2	1,52
Эпинефрин	160	101,4	4,1	102,9	5,31	102,8	2,48
	0,6	95,3	3,4	94,6	4,54	99,9	1,92
Норэпинефрин	160	101,6	5,7	117,3	7,07	99	3,76

Продолжение Таблицы Г1

Вещество	Концентрация, (нМ)	Эффект матрицы (%)		Коэфф. экстракции (%)		Степень извлечения (%)	
		Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
Норэпинефрин	0,6	80,2	3,5	98,7	4,65	97,5	2,00
5-Гидрокси- кинуренин	160	93	4,2	91,3	5,42	104,2	2,56
	0,6	91,8	4,4	102,1	5,64	102,5	2,72
Ксантуреновая кислота	160	102,7	4,9	94,1	6,19	110,8	3,12
	0,6	96,6	2,7	102,5	3,77	99,4	1,36
Хинолиновая кислота	1600	90,4	4,3	106,6	5,53	98,7	2,64
	60	90,9	3,5	104,3	4,65	90,7	2,00
Индол-3- пропионовая кислота	1600	90,4	7,1	101,6	8,61	94	4,88
	60	52,9	1,9	104	2,89	84,3	0,72
Индол-3-молочная кислота	1600	92	3,9	80,7	5,09	97,5	2,32
	60	100	5,8	91,7	7,18	97,7	3,84
Индол-3-уксусная кислота	1600	99,6	6,9	94,8	8,39	97	4,72
	60	99,5	7,1	110	8,61	98,8	4,88
Кортизол	160	106,2	5,9	97,8	7,29	98	3,92
	0,6	91,3	8,6	94	10,26	95,3	6,08

Продолжение Таблицы Г1

Вещество	Концентрация, (нМ)	Эффект матрицы (%)		Коэфф. экстракции (%)		Степень извлечения (%)	
		Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
3-Гидрокси-триптофол	160	101,9	8,90	92,3	10,59	100,9	6,32
	0,6	105,8	11,80	92	13,78	102,1	8,64
Индол-3-этанол	160	100,2	3,60	52,5	4,76	100	2,08
	0,6	101,6	12,40	90,5	14,44	94,6	9,12

Примечание: Mean – среднее значение эффекта матрицы. CV – коэффициент вариации эффекта матрицы.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Таблица Д1 – Стабильность определяемых эндогенных метаболитов [137]

Хранение рабочего раствора при комнатной температуре в течение 6 часов						
Вещество	Концентрация, нМ	Bias (%)	CV (%)	Концентрация, нМ	Bias (%)	CV (%)
Триптофан	40000	100,9	8,5	300	103,3	4,5
Метилтриптофан	160	111,7	4,6	0,6	105,0	11,5
5-Гидрокситриптофан	160	99,9	8,9	0,6	97,5	2,9
Кинуренин	4000	97,5	5,1	15	103,3	6,5
Кинуреновая кислота	160	99,2	3,4	0,6	105,0	4,0
ГАМК	160	97,0	5,6	0,6	101,6	2,6
Дофамин	160	96,0	1,3	0,6	97,5	5,4
Серотонин	1600	102,6	1,9	6	101,1	1,6
5-Гидроксииндолуксусная кислота	160	106,4	7,1	0,6	100,9	5,9
Триптамин	160	103,1	11,4	0,6	111,7	11,6
5-Метокситриптамин	160	99,2	6,5	0,6	99,9	5,4
Норметанефрин	160	97,0	4,7	0,6	103,3	7,7
Норэпинефрин	160	99,5	8,9	0,6	105,0	8,0

Продолжение Таблицы Д1

Вещество	Концентрация, нМ	Bias (%)	CV (%)	Концентрация, нМ	Bias (%)	CV (%)
Эпинефрин	160	96,4	3,2	0,6	97,5	2,3
Метанефрин	160	98,7	4,6	0,6	103,3	1,5
3-Гидроксикинуреин	160	99,4	10,5	0,6	105,0	3,2
Ксантуреновая кислота	160	104,3	1,6	0,6	101,6	2,3
Хинолиновая кислота	1600	102,0	1,8	60	97,5	10,7
Индол-3-пропионовая кислота	1600	96,3	2,9	60	106,4	3,5
Индол-3-уксусная кислота	1600	104,4	11,0	60	98,8	8,5
Индол-3-молочная кислота	1600	102,9	5,7	60	103,1	8,8
Кортизол	160	94,6	4,6	0,6	97	2,6
3-Гидрокситриптофол	160	117,3	5,8	0,6	98	6,6
Индол-3-этанол	160	98,7	6,1	0,6	95,3	12,5
Индол-3-карбоксальдегид	160	91,3	4,7	0,6	102,5	8,5
Индол-3-масляная кислота	160	102,1	4,2	0,6	106,6	3,2
Три цикла замораживания и оттаивания						
Триптофан	40000	98,8	6,0	300	102,6	7,0
Метилтриптофан	160	95,9	3,4	0,6	99,3	3,5

Продолжение Таблицы Д1

Вещество	Концентрация, нМ	Bias (%)	CV (%)	Концентрация, нМ	Bias (%)	CV (%)
5-Гидрокситриптофан	160	101,6	4,4	0,6	98,1	4,8
Кинуренин	4000	97,2	4,5	15	100,9	4,9
Кинуреновая кислота	160	98,8	2,1	0,6	101,5	1,8
ГАМК	160	95,9	1,7	0,6	97,7	1,3
Дофамин	160	101,6	2,4	0,6	105,4	2,3
Серотонин	1600	97,2	2,1	6	97,7	1,8
5-Гидроксииндолуксусная кислота	160	100,9	7,4	0,6	98,1	8,7
Триптамин	160	99,2	2,6	0,6	100,9	2,4
5-Метокситриптамин	160	97,0	4,7	0,6	101,5	5,2
Норметанефрин	160	96,0	4,8	0,6	97,7	5,4
Норэпинефрин	160	102,6	2,2	0,6	102,9	2,0
Эпинефрин	160	106,4	3,9	0,6	104,4	4,1
Метанефрин	160	100,9	6,4	0,6	102,3	7,4
3-Гидроксикинуренин	160	99,2	4,7	0,6	103,2	5,2
Ксантуреновая кислота	160	97,0	2,4	0,6	102,9	2,3
Хинолиновая кислота	1600	96,0	0,5	60	104,4	0,2

Продолжение Таблицы Д1

Вещество	Концентрация, нМ	Bias (%)	CV (%)	Концентрация, нМ	Bias (%)	CV (%)
Индол-3-пропионовая кислота	1600	104,3	3,4	60	102,3	3,5
Индол-3-уксусная кислота	1600	99,9	3,4	60	95,8	3,5
Индол-3-молочная кислота	1600	103,3	5,7	60	96,8	6,5
Кортизол	160	105,0	3,0	0,6	99,7	3,1
3-Гидрокситриптофол	160	97,5	4,2	0,6	94,6	4,6
Индол-3-этанол	160	103,3	4,4	0,6	98,7	4,8
Индол-3-карбоксальдегид	160	105,0	3,5	0,6	105,4	3,7
Индол-3-масляная кислота	160	99,9	5,8	0,6	95,8	2,6
Долгосрочная стабильность в течение 30 дней при температуре -70 °С, образцы плазмы крыс						
Триптофан	40000	103,6	5,3	300	91,3	6,6
Метилтриптофан	160	105	3,2	0,6	103,1	3,7
5-Гидрокситриптофан	160	99,3	4,0	0,6	101,2	4,8
Кинуренин	4000	111,7	4,1	15	102,8	4,9
Кинуреновая кислота	160	102,5	2,2	0,6	99,9	2,3
ГАМК	160	101,6	1,9	0,6	99	1,9
Дофамин	160	103,3	2,5	0,6	97,5	2,7

Продолжение Таблицы Д1

Вещество	Концентрация, нМ	Bias (%)	CV (%)	Концентрация, нМ	Bias (%)	CV (%)
Серотонин	1600	104	2,2	6	104,2	2,3
5-Гидроксииндолуксусная кислота	160	103,5	6,4	0,6	102,5	8,1
Триптамин	160	104,1	2,5	0,6	110,8	2,8
5-Метокситриптамин	160	103,6	4,3	0,6	99,4	5,2
Норметанефрин	160	104,7	4,4	0,6	98,7	5,3
Норэпинефрин	160	96,2	2,3	0,6	90,7	2,4
Эпинефрин	160	101,4	3,6	0,6	94	4,3
Метанефрин	160	95,3	5,6	0,6	84,3	7,0
3-Гидроксикинуренин	160	101,6	4,3	0,6	97,5	5,2
Ксантуреновая кислота	160	80,2	2,5	0,6	97,7	2,7
Хинолиновая кислота	1600	93	0,9	60	101,6	0,6
Индол-3-пропиононая кислота	1600	91,8	3,2	60	97,5	3,7
Индол-3-уксусная кислота	1600	102,7	3,2	60	81,2	3,7
Индол-3-молочная кислота	1600	96,6	5,0	60	91,3	6,2
Кортизол	160	90,4	2,9	0,6	95,3	3,3
3-Гидроксиทริปтофол	160	90,9	3,9	0,6	105,8	4,7

Продолжение Таблицы Д1

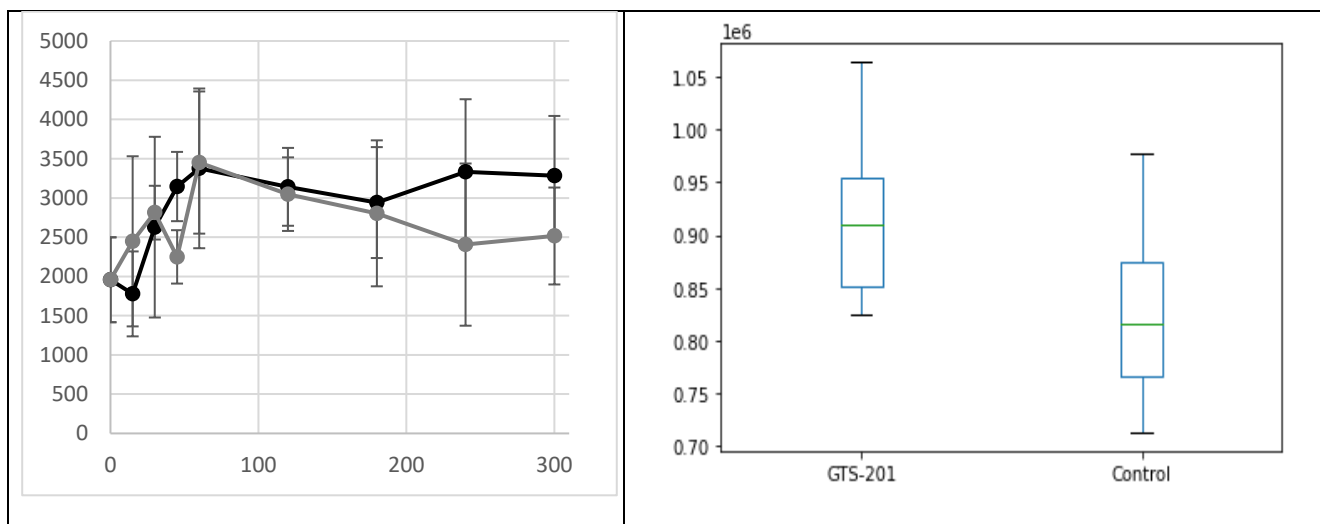
Вещество	Концентрация, нМ	Bias (%)	CV (%)	Концентрация, нМ	Bias (%)	CV (%)
Индол-3-этанол	160	90,4	4,0	0,6	90,8	4,8
Индол-3-карбоксальдегид	160	92,9	3,3	0,6	86,4	3,9
Индол-3-масляная кислота	160	92	2,6	0,6	92,9	2,9
Подготовленные пробы в течение 24 ч при 10° С в автосамплере						
Триптофан	40000	90,7	5,9	300	102,6	5,2
Метилтриптофан	160	95,9	3,8	0,6	99,3	3,4
5-Гидрокситриптофан	160	100,9	4,6	0,6	102,9	4,0
Кинуренин	4000	99,2	4,7	15	104,4	4,1
Кинуреновая кислота	160	97,0	2,8	0,6	102,3	2,5
ГАМК	160	96,0	2,5	0,6	102,6	2,3
Дофамин	160	102,6	3,1	0,6	99,3	2,8
Серотонин	1600	106,4	2,8	6	102,9	2,5
Н1АА	160	103,1	7,0	0,6	104,4	6,0
Триптамин	160	98,0	3,1	0,6	102,3	2,8
5-Метокситриптамин	160	95,3	4,9	0,6	102,6	4,3
Норметанефрин	160	100,0	5,0	0,6	101,6	4,4

Продолжение Таблицы Д1

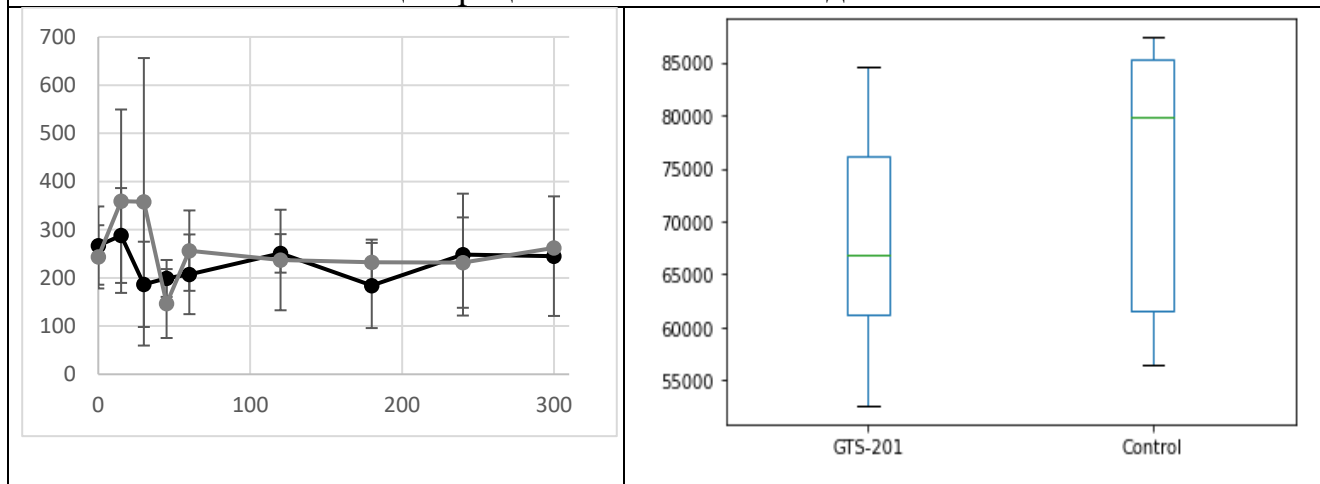
Вещество	Концентрация, нМ	Bias (%)	CV (%)	Концентрация, нМ	Bias (%)	CV (%)
Норэпинефрин	160	90,7	2,9	0,6	98,7	2,6
Эпинефрин	160	95,9	4,2	0,6	95,8	3,7
Метанефрин	160	100,9	6,2	0,6	96,8	5,4
3-Гидроксикинуренин	160	99,2	4,9	0,6	99,7	4,3
Ксантуреновая кислота	160	97,0	3,1	0,6	94,6	2,8
Хинолиновая кислота	1600	96,0	1,5	60	98,7	1,5
Индол-3-пропионовая кислота	1600	101,1	3,8	60	105,4	3,4
Индол-3-уксусная кислота	1600	101,1	3,8	60	102,3	3,4
Индол-3-молочная кислота	1600	100,9	5,6	60	102,6	4,9
Кортизол	160	111,7	3,5	0,6	101,6	3,2
3-Гидрокситриптофол	160	99,9	4,5	0,6	98,7	4,0
Индол-3-этанол	160	103,3	4,6	0,6	95,8	4,0
Индол-3-карбоксальдегид	160	105,0	3,9	0,6	96,8	3,5
Индол-3-масляная кислота	160	97,5	3,2	0,6	99,7	2,9
Примечание: Bias – отклонение среднего значения от среднего значения необработанных образцов, CV – коэффициент вариации.						

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

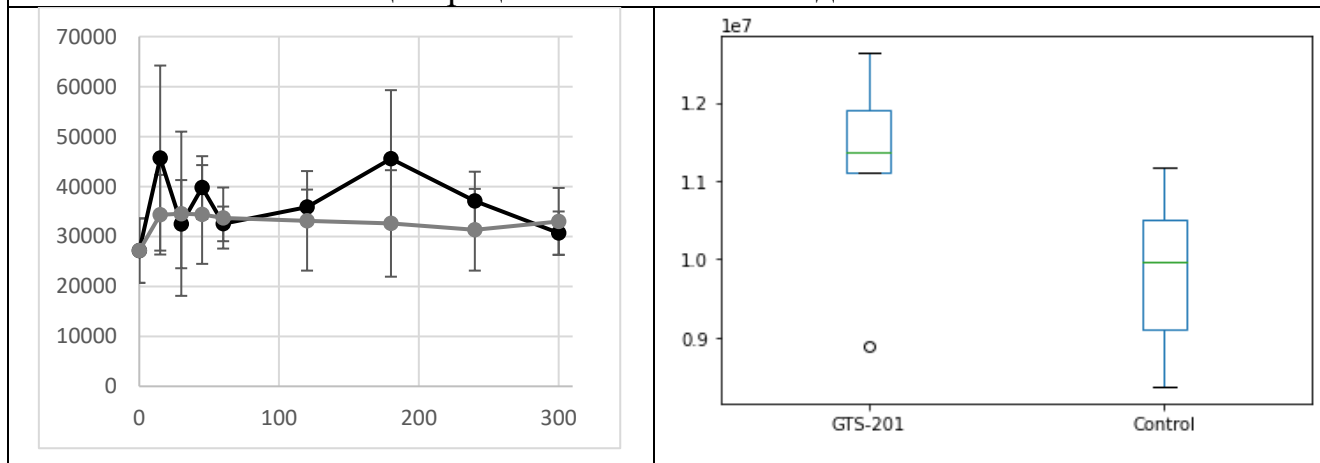
Изменение концентрации целевых метаболитов, связанных с нейротрансмиссией и метаболическими путями триптофана, в головном мозге и плазме крови крыс при в/б введении ГТС-201 [137]



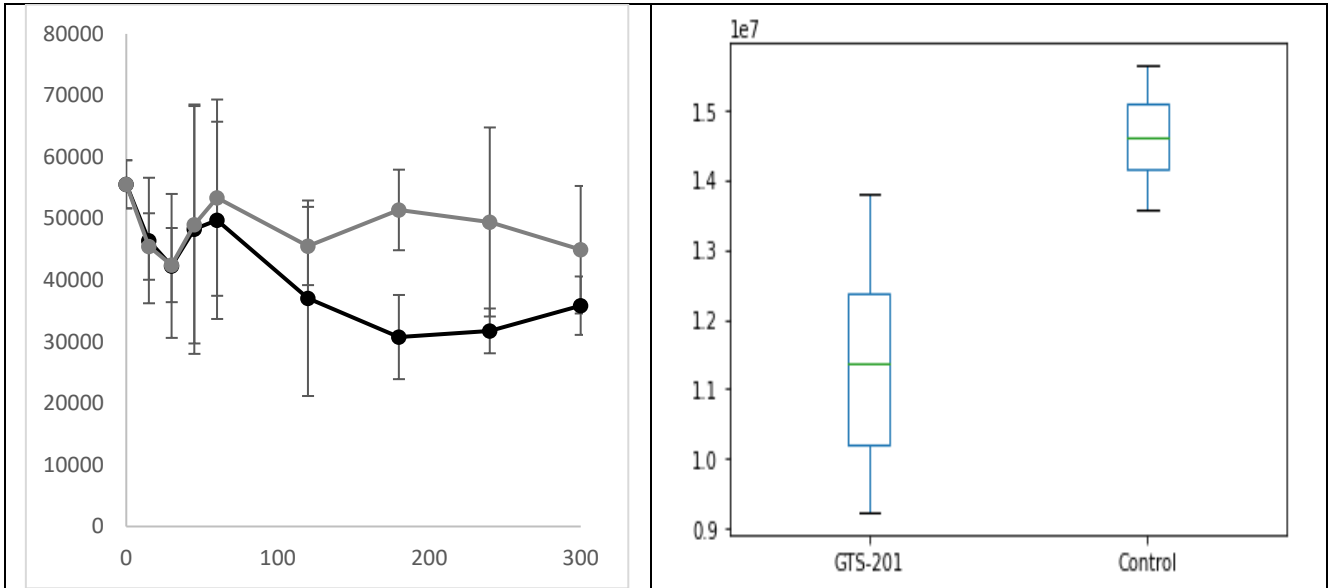
Изменение концентрации ГАМК после введения ГТС-201 в мозг



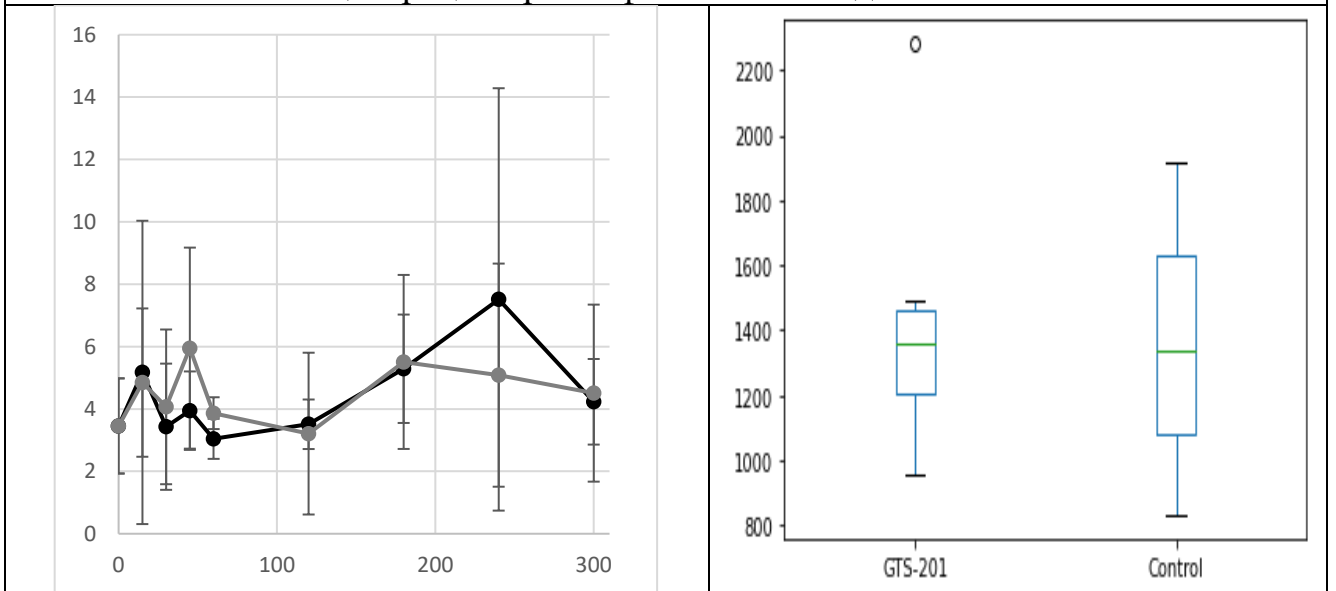
Изменение концентрации ГАМК после введения ГТС-201 в плазме



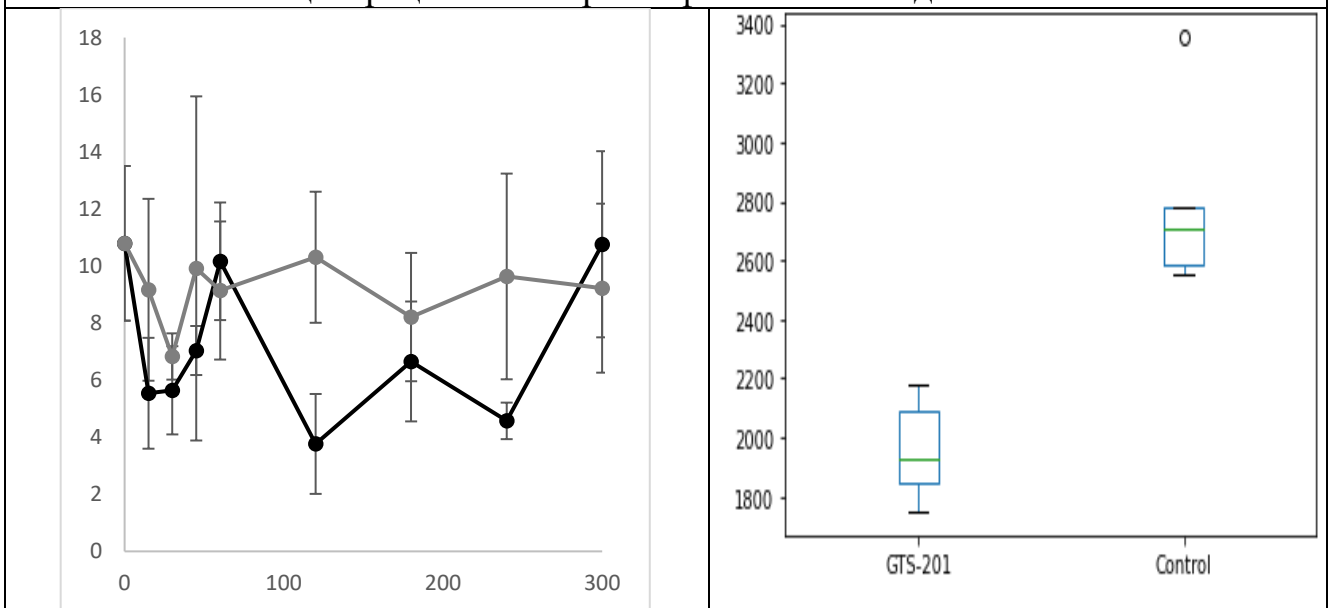
Изменение концентрации триптофана после введения ГТС-201 в мозг



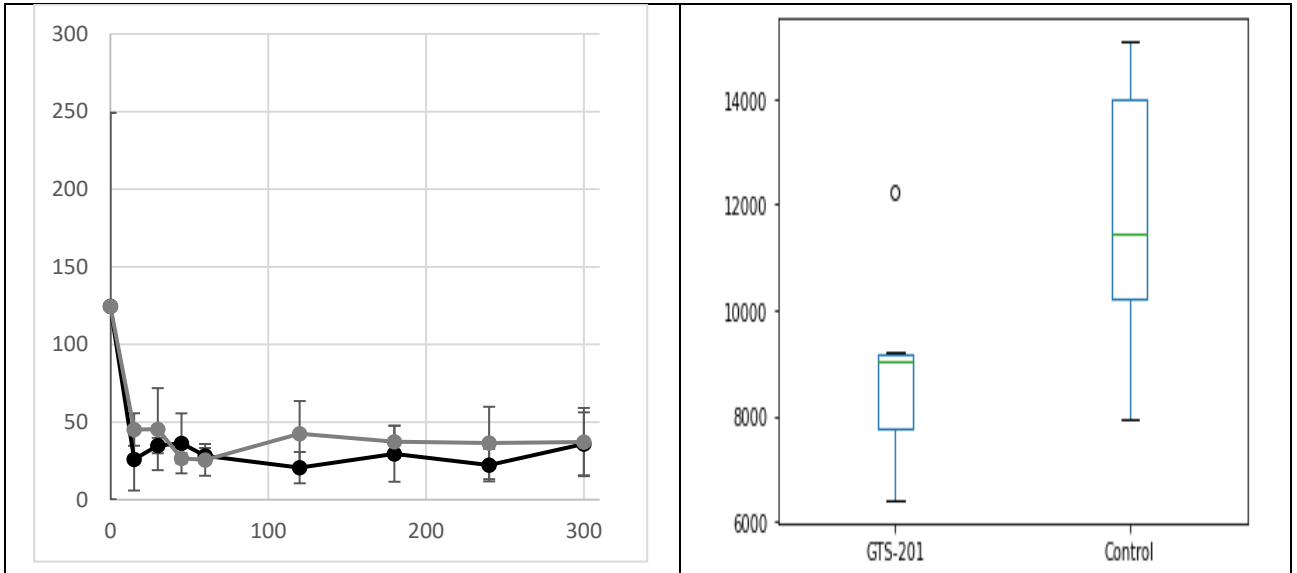
Изменение концентрации триптофана после введения ГТС-201 в плазме



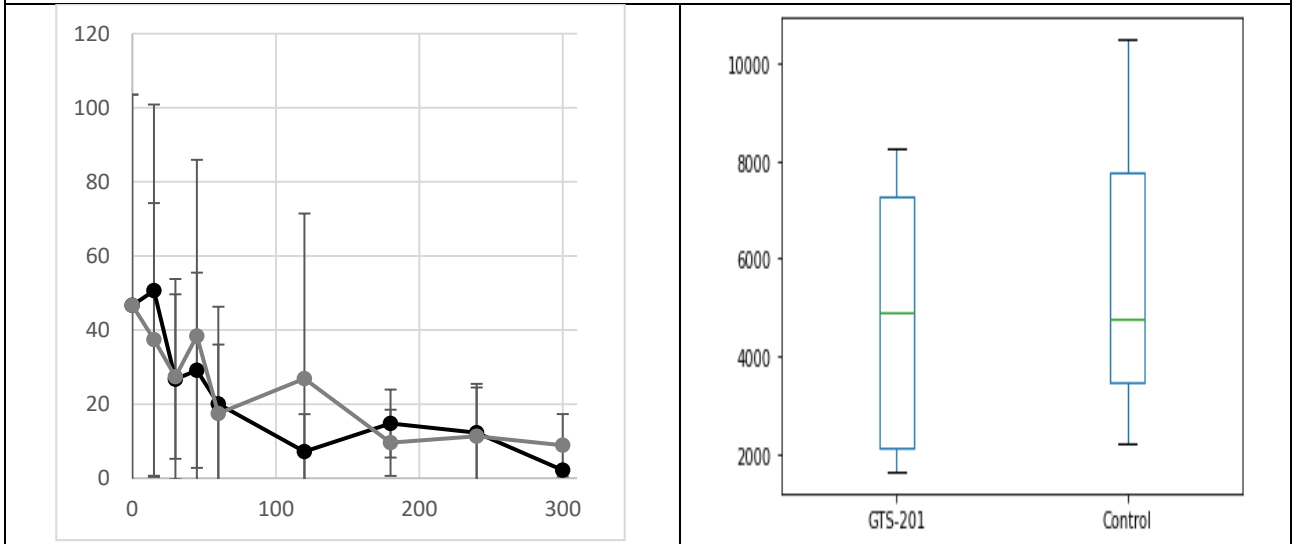
Изменение концентрации метилтриптофана после введения ГТС-201 в мозге



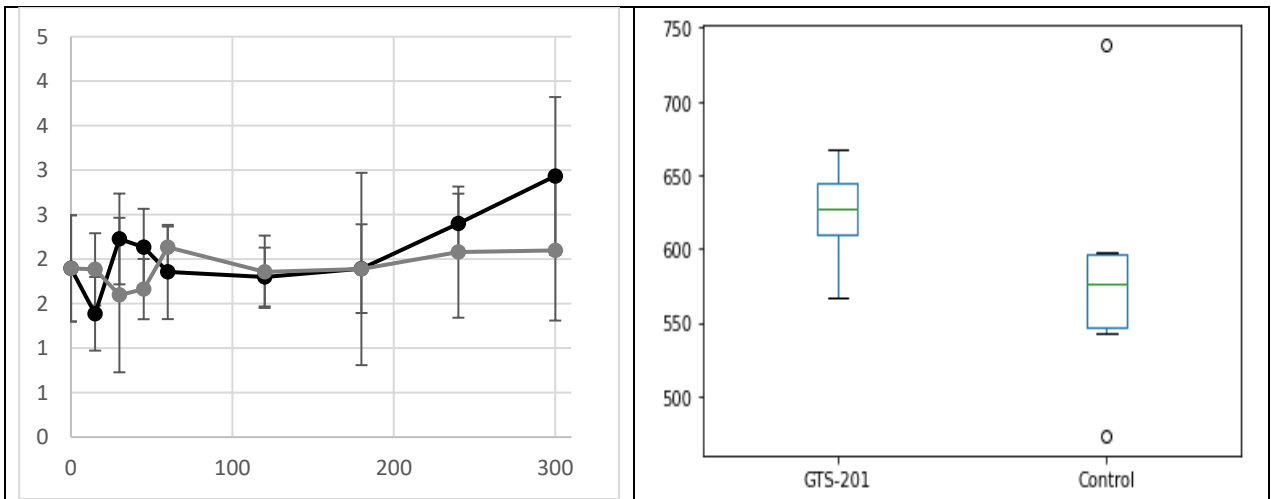
Изменение концентрации метилтриптофана после введения ГТС-201 в плазме



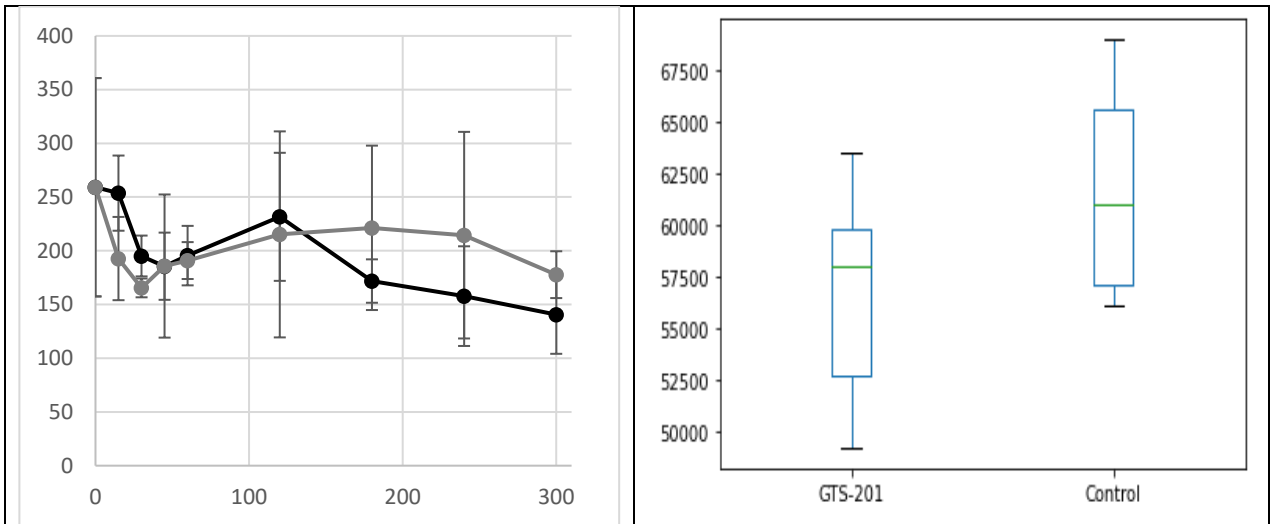
Изменение концентрации 5-гидрокситриптофана после введения ГТС-201 в мозге



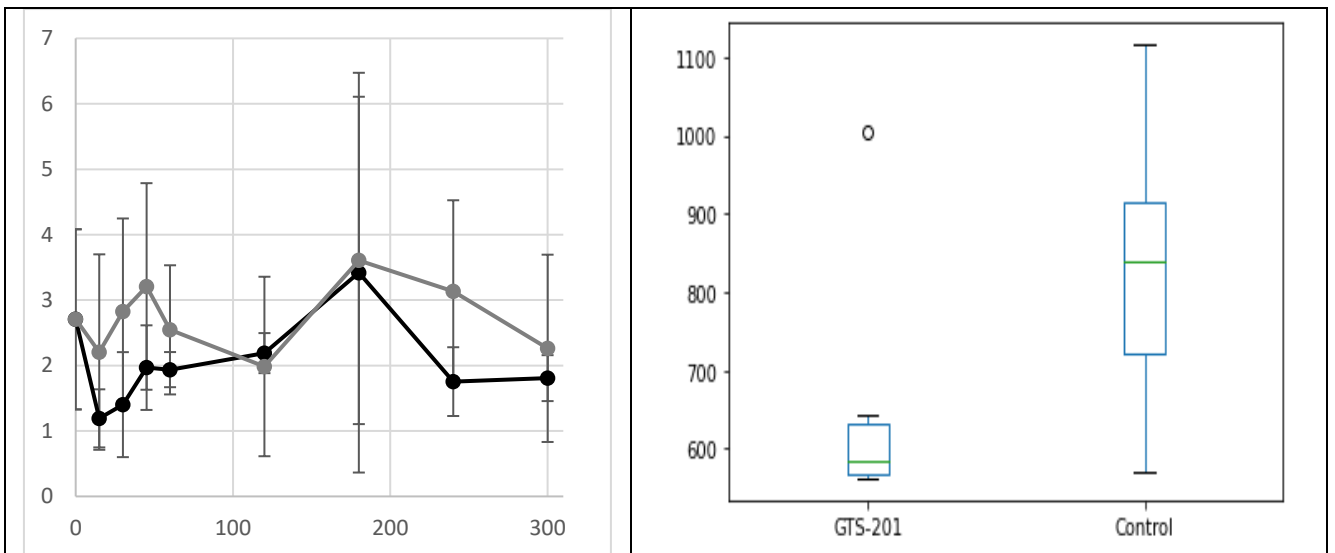
Изменение концентрации 5-гидрокситриптофана после введения ГТС-201 в плазме



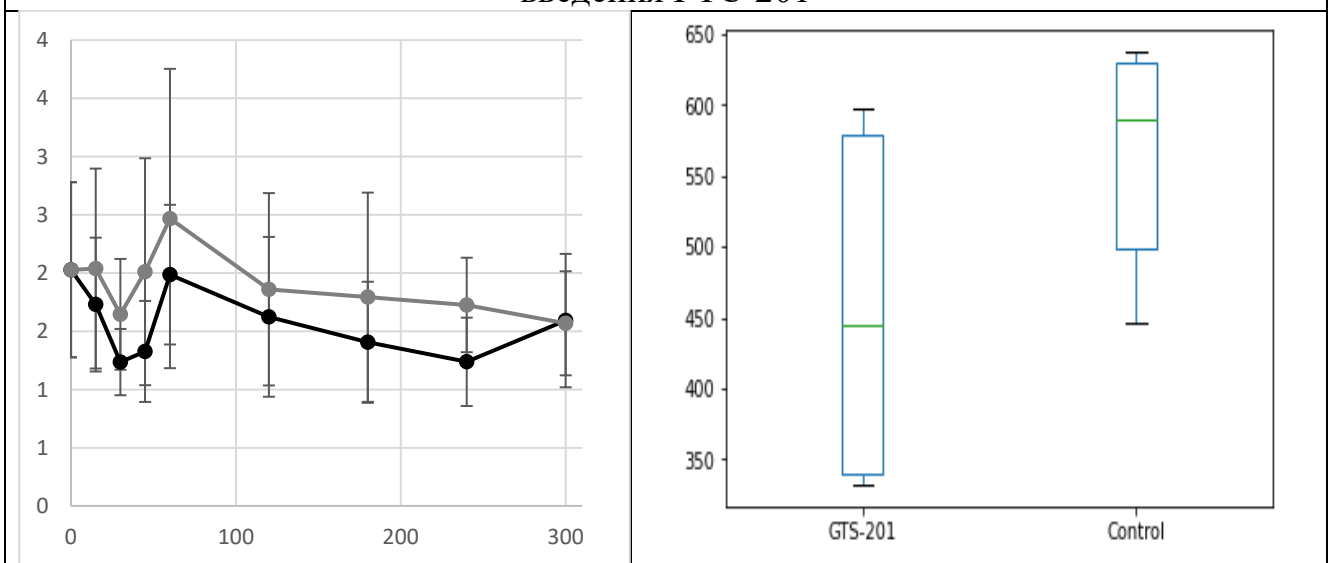
Изменение концентрации 5-гидроксииндолуксусной кислоты после введения препарата в мозге



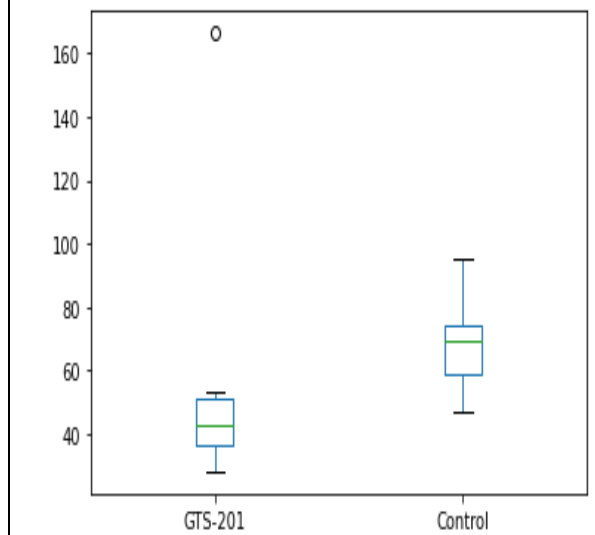
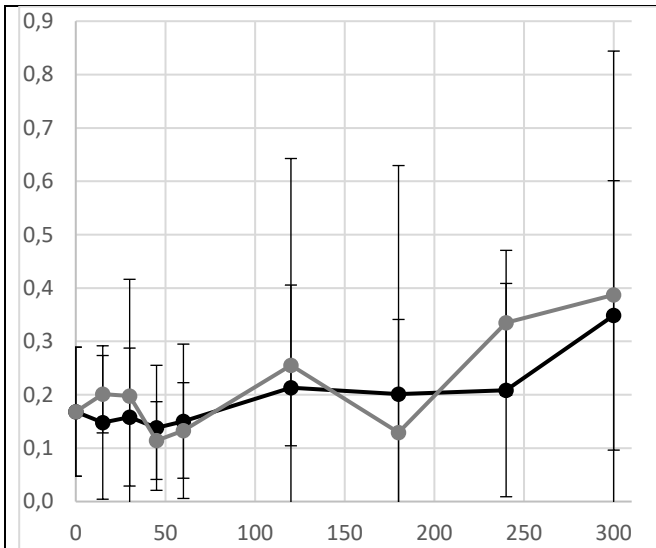
Изменение концентрации 5-гидроксииндолуксусной кислоты после введения ГТС-201 в плазме



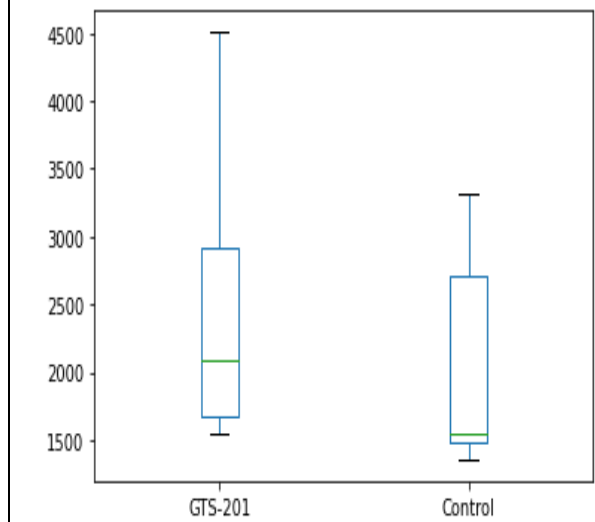
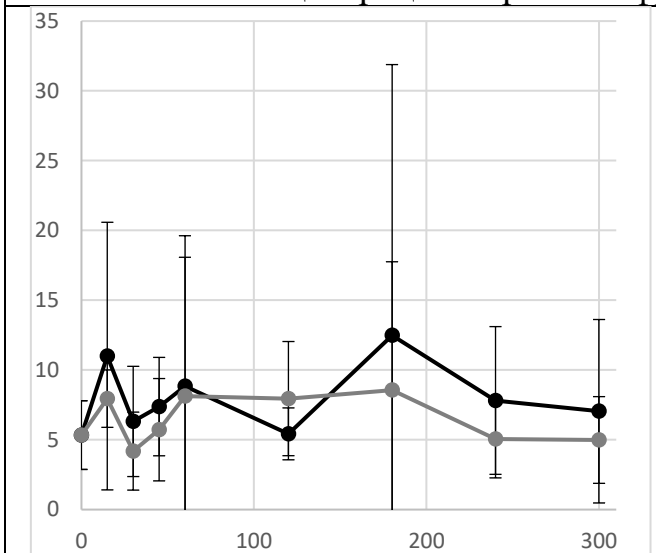
Изменение концентрации триптамина с течением времени в мозге после введения ГТС-201



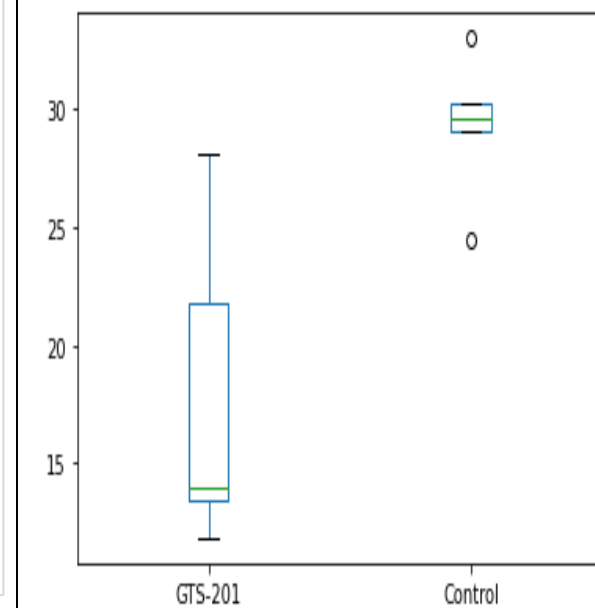
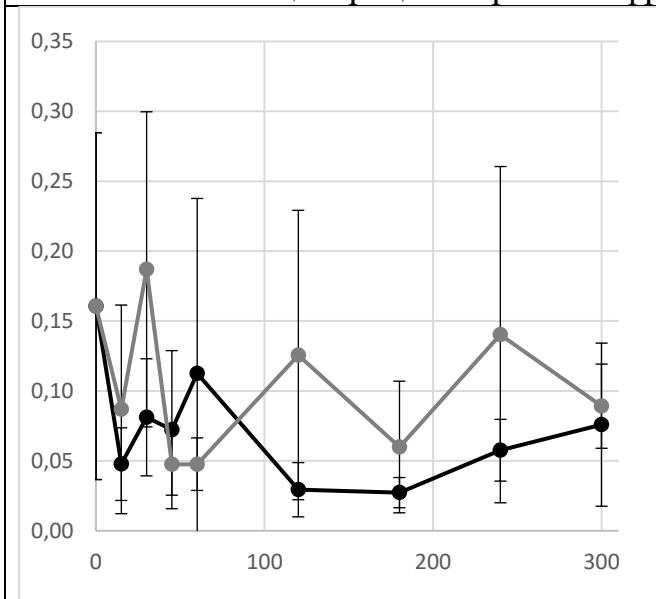
Изменение концентрации триптамина после введения ГТС-201 в плазме



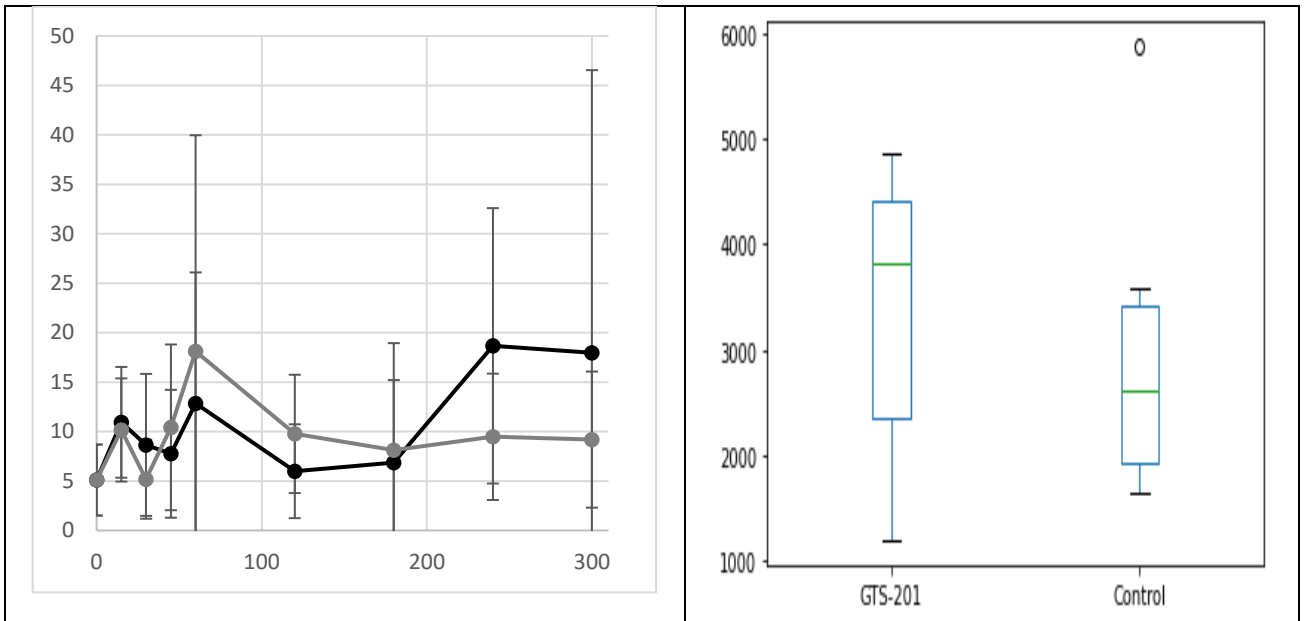
Изменение концентрации норметанефрина после введения ГТС-201 в мозг



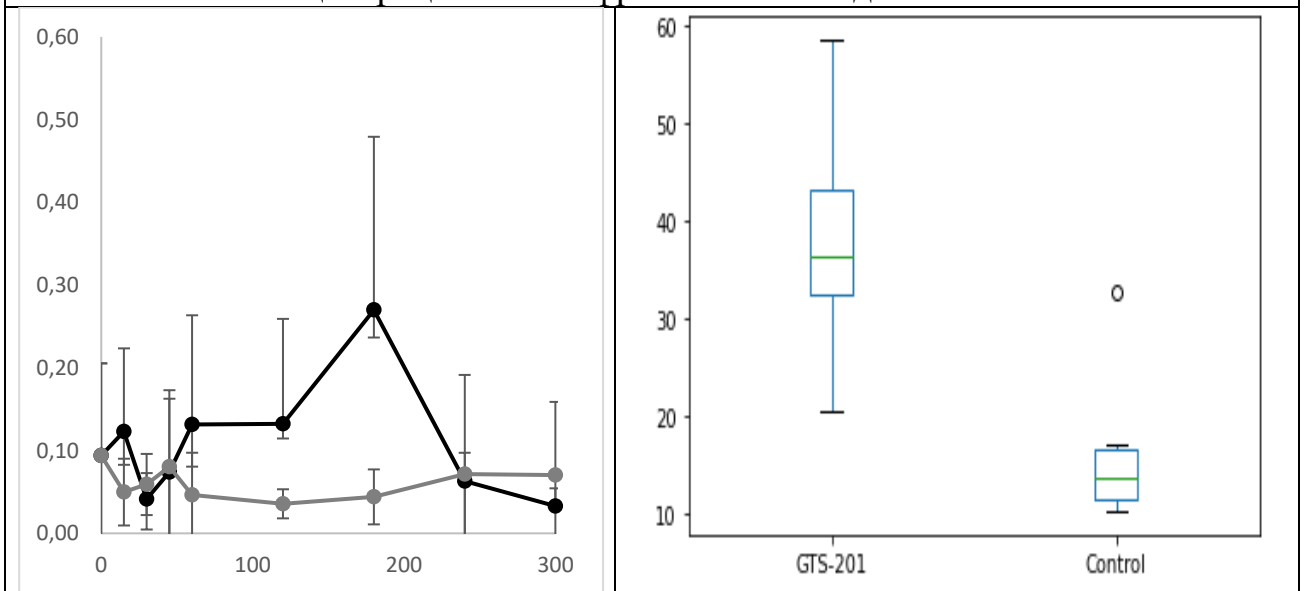
Изменение концентрации норметанефрина после введения ГТС-201 в плазме



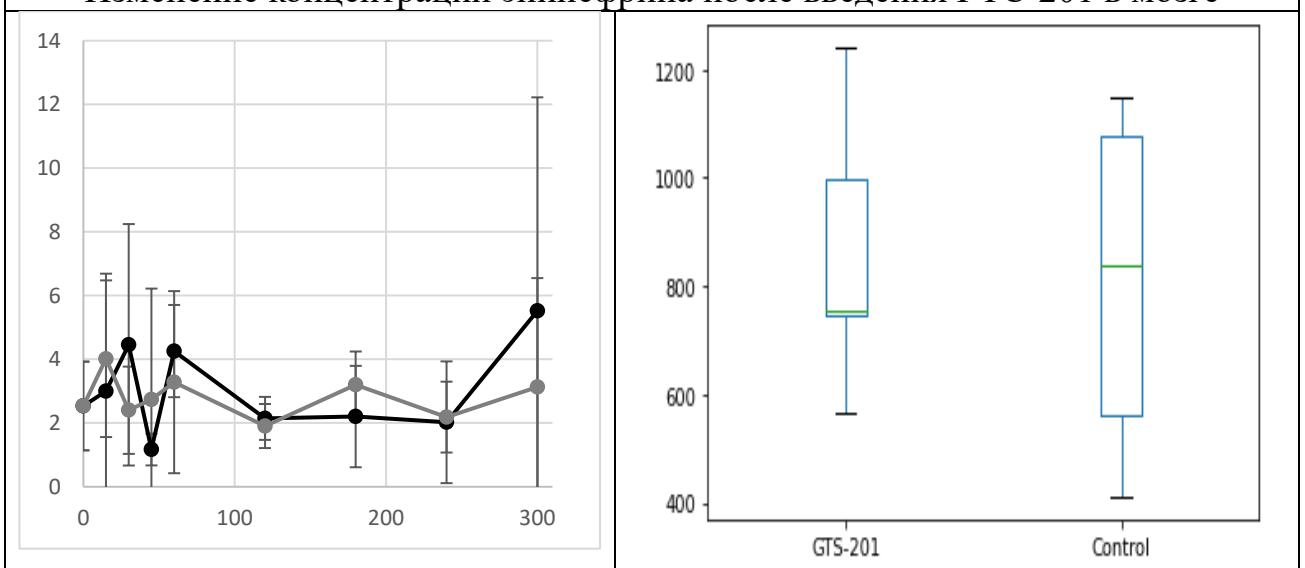
Изменение концентрации метанефрина после введения ГТС-201 в мозг



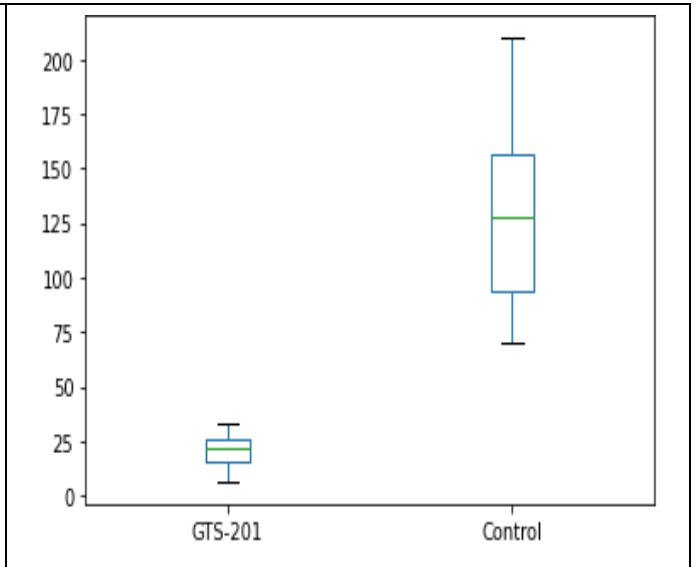
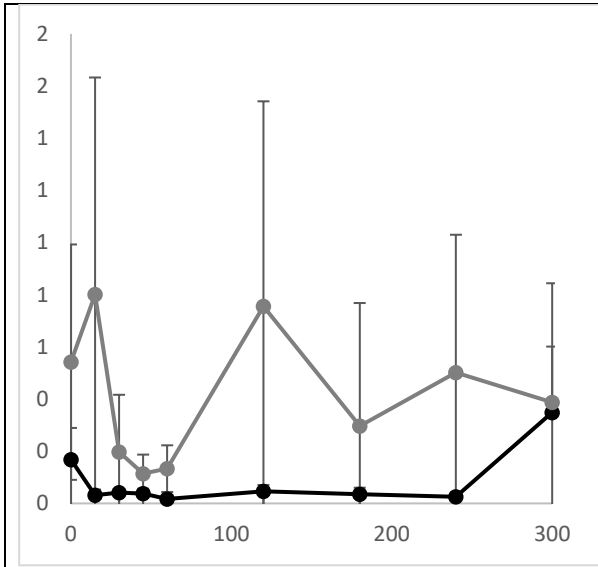
Изменение концентрации метанfetрина после введения ГТС-201 в плазме



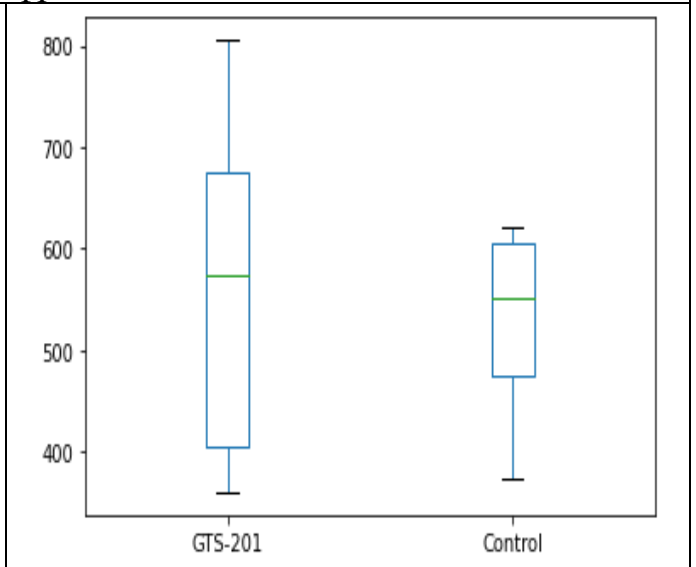
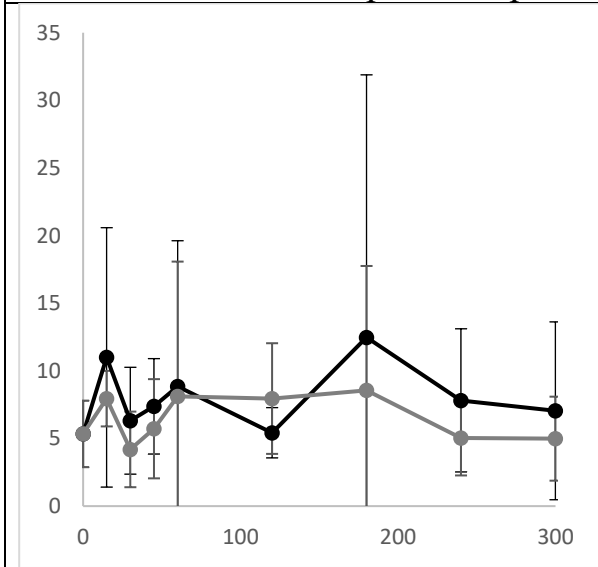
Изменение концентрации эpineфрина после введения ГТС-201 в мозге



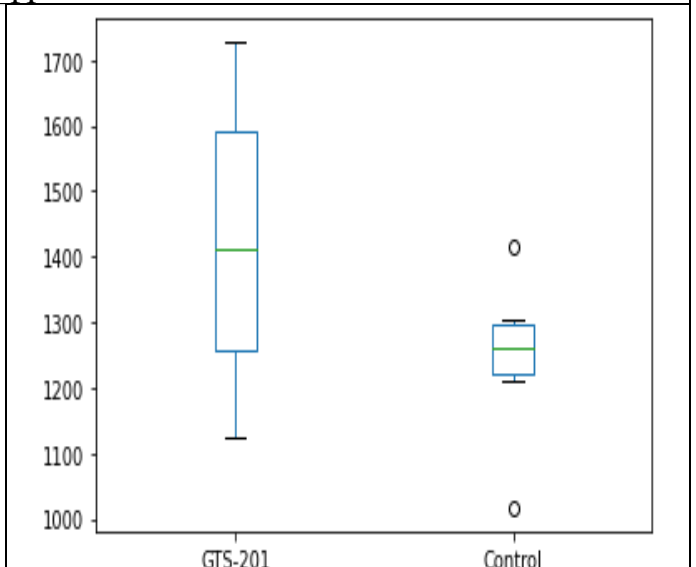
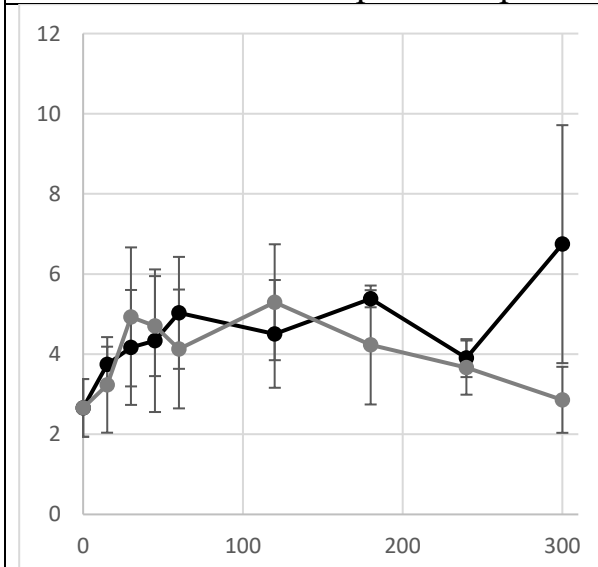
Изменение концентрации эpineфрина после введения ГТС-201 в плазме



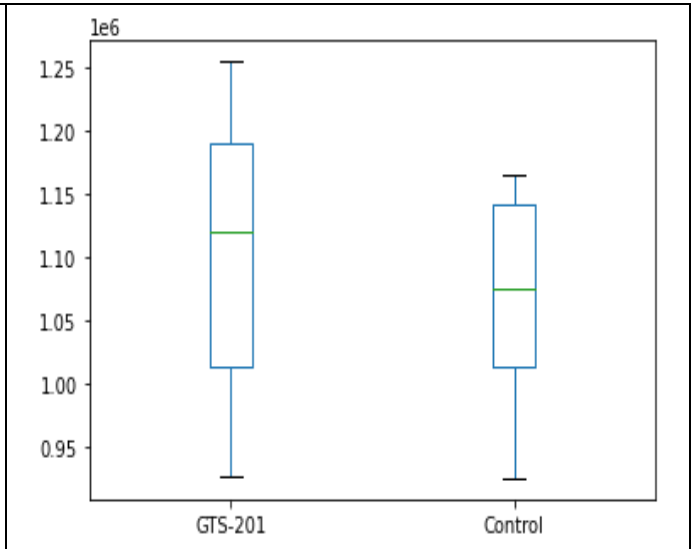
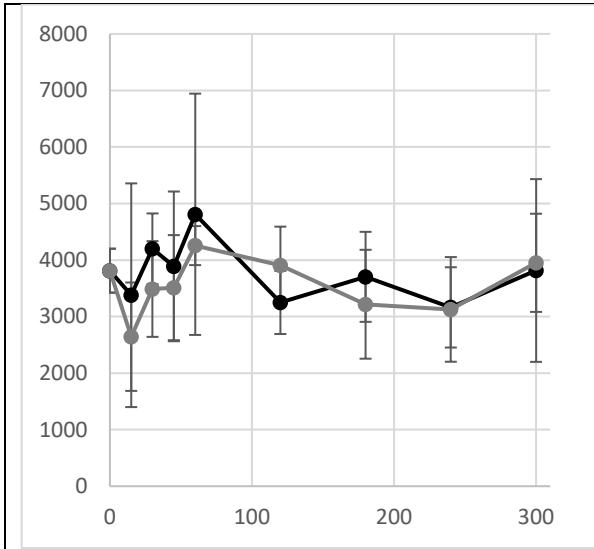
Изменение концентрации норэпинефрина после введения ГТС-201 в мозге



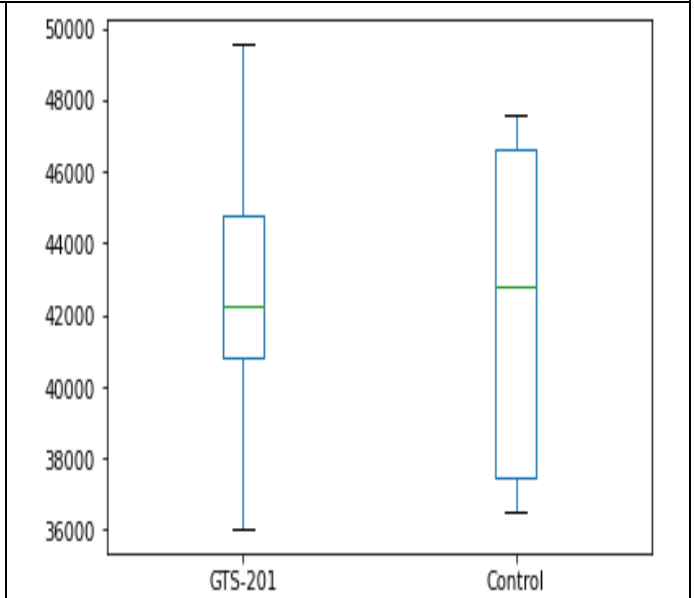
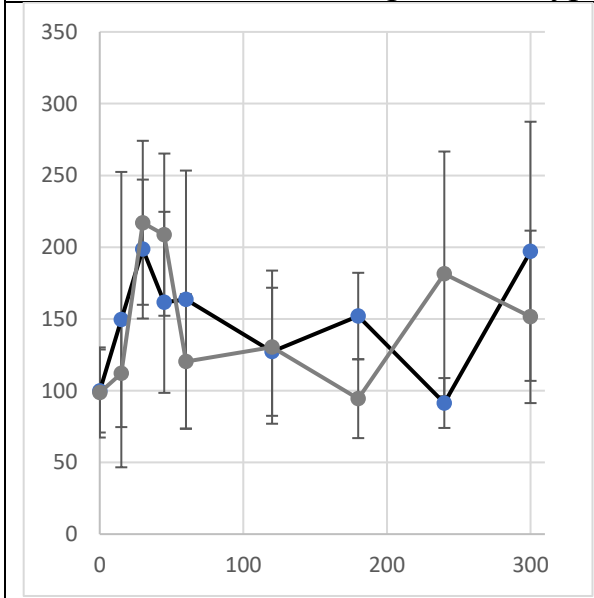
Изменение концентрации норэпинефрина после введения ГТС-201 в плазме



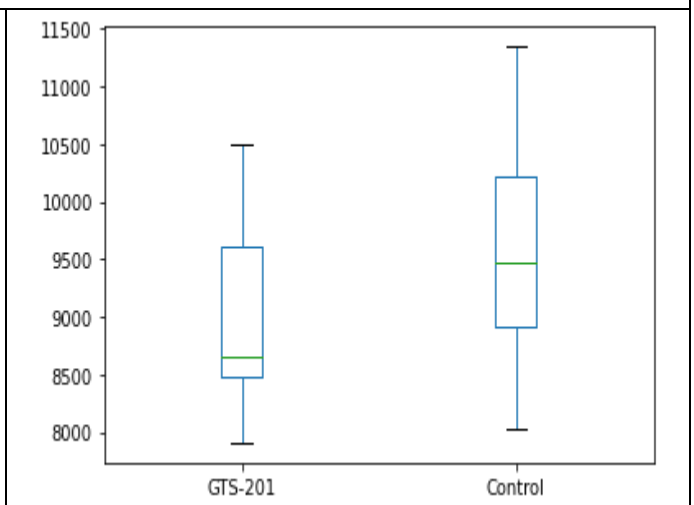
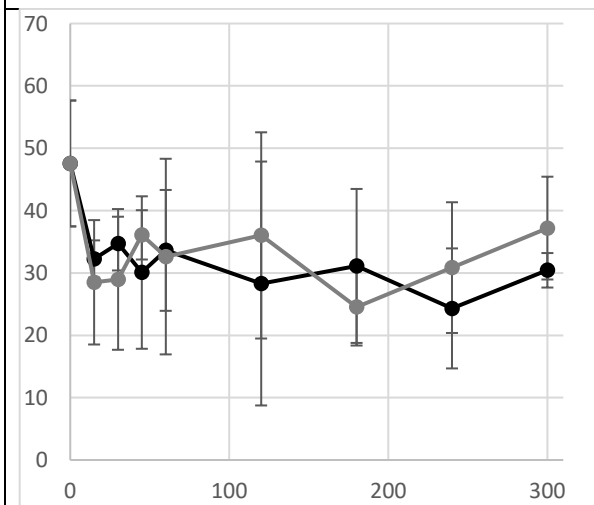
Изменение концентрации кинуренина после введения ГТС-201 в мозге



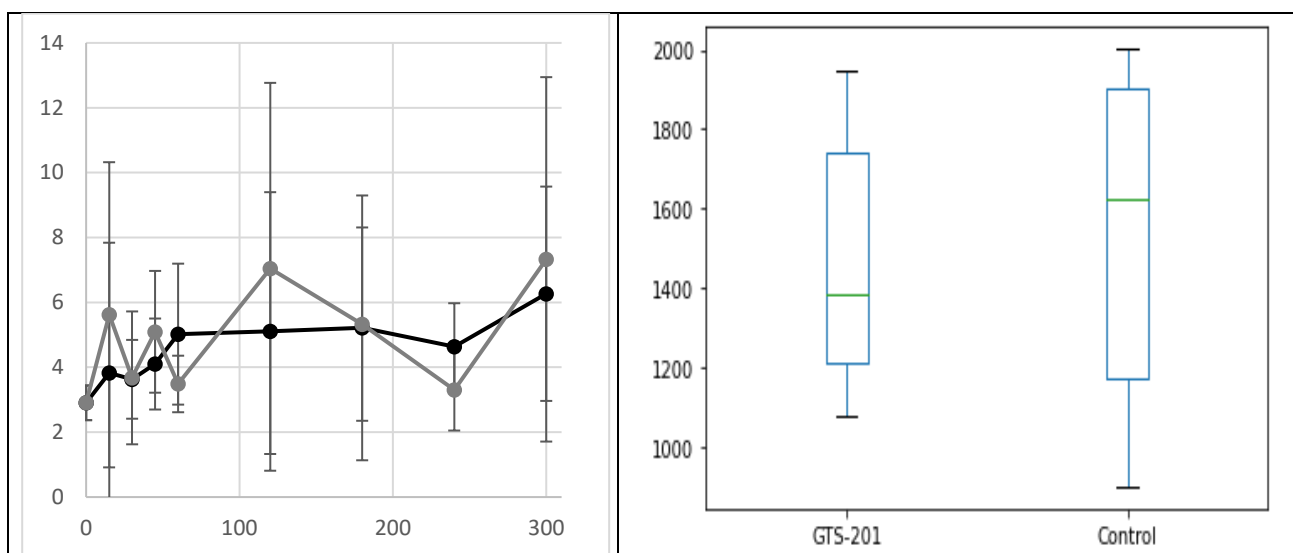
Изменение концентрации кинуренина после введения ГТС-201 в плазме



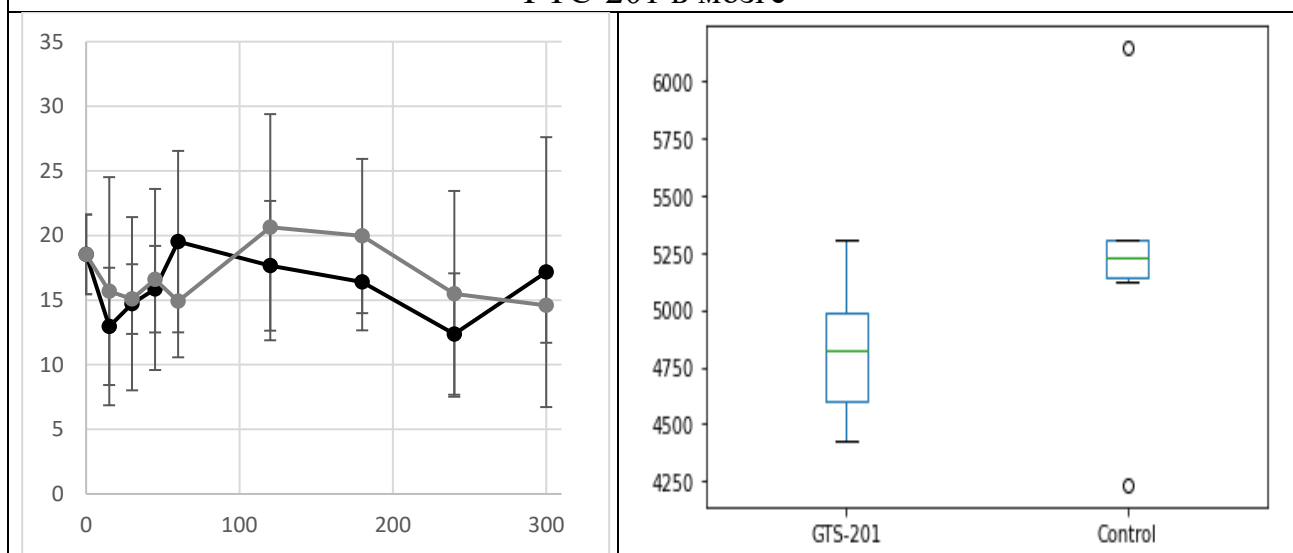
Изменение концентрации кинуреновой кислоты после введения ГТС-201 в МОЗГЕ



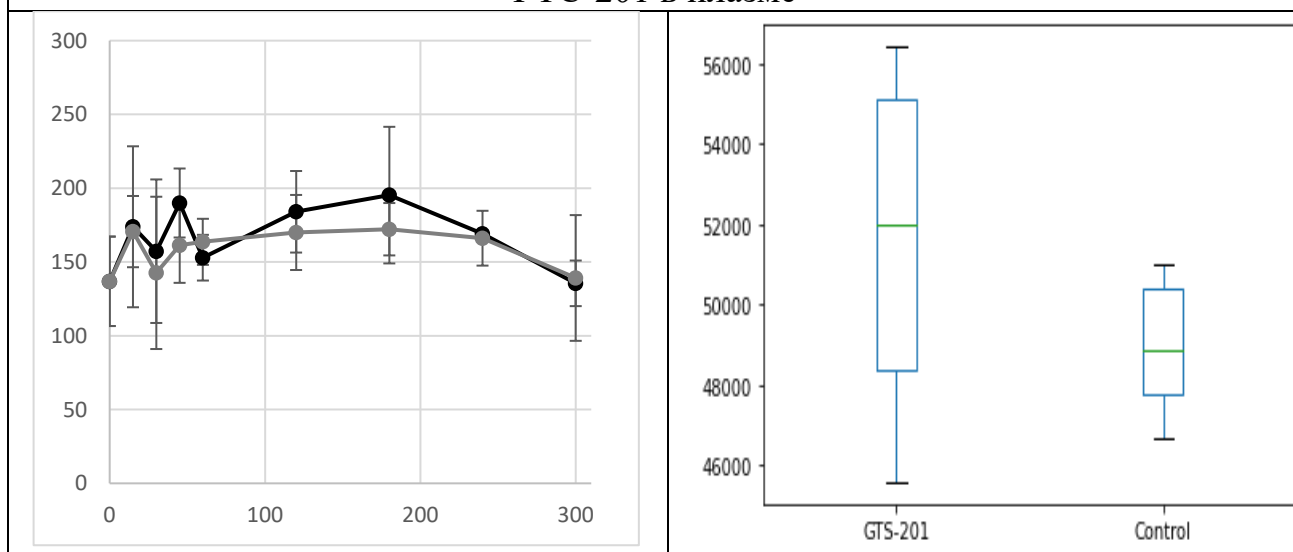
Изменение концентрации кинуреновой кислоты после введения ГТС-201 в плазме



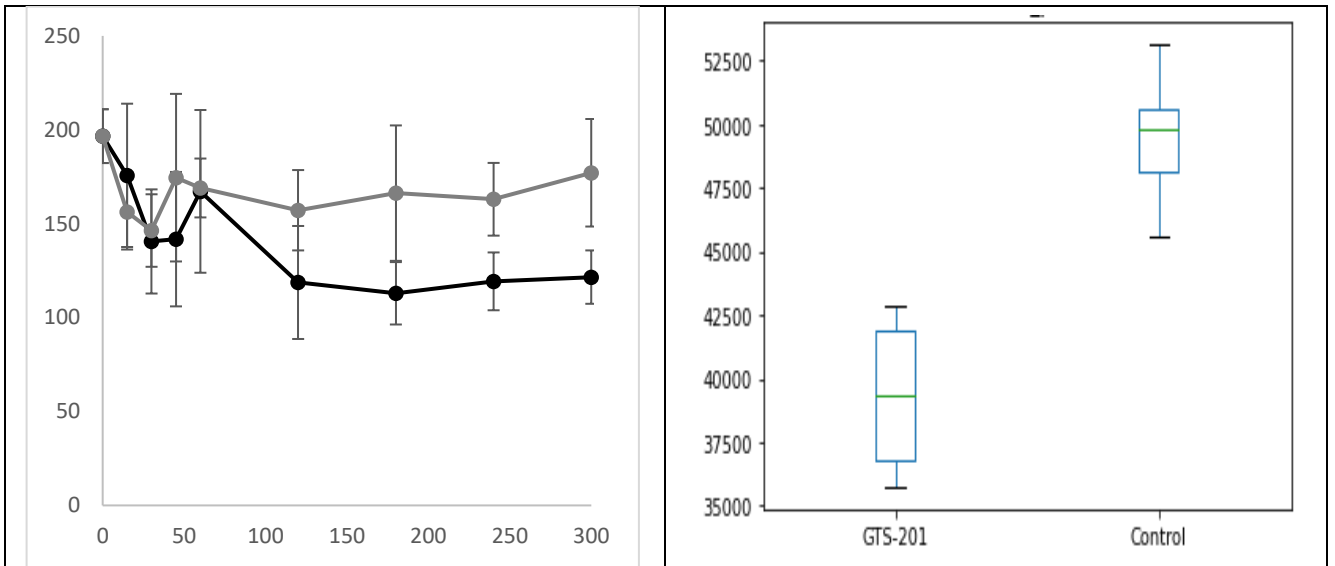
Изменение концентрации гидроксикинуруновой кислоты после введения ГТС-201 в мозг



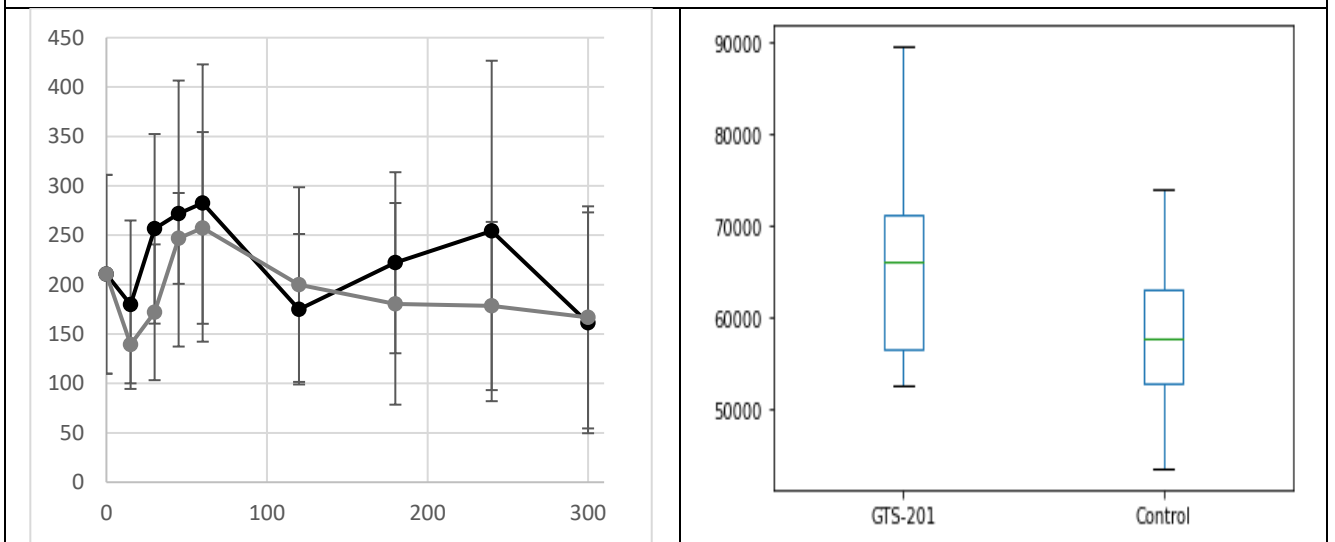
Изменение концентрации гидроксикинуруновой кислоты после введения ГТС-201 в плазму



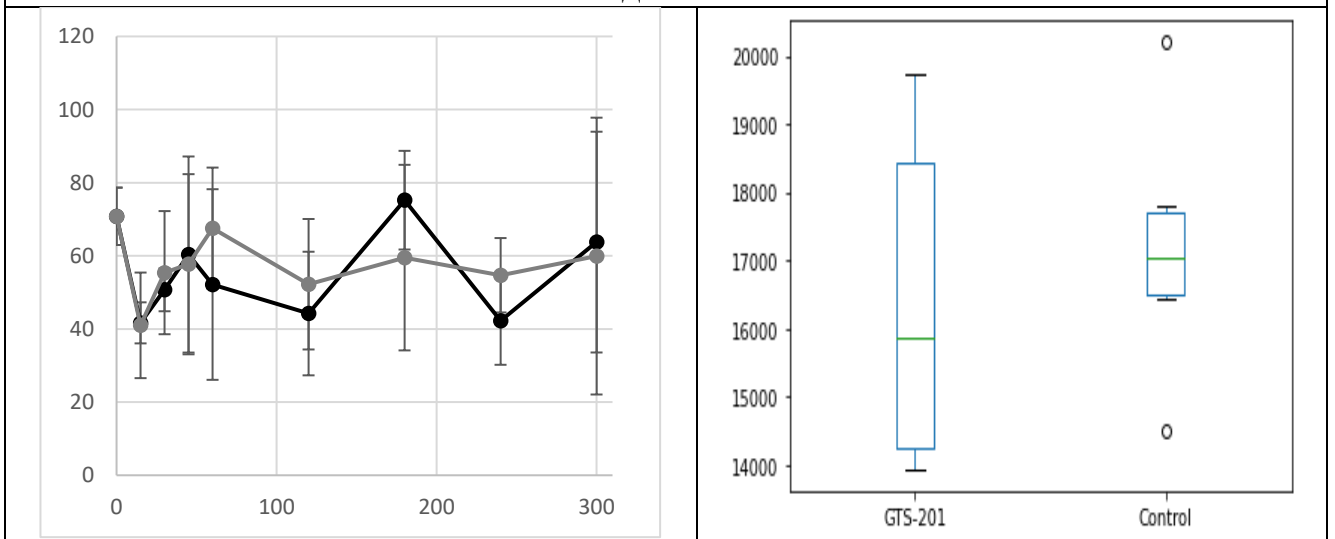
Изменение концентрации ксантуруновой кислоты с течением времени в мозге после введения ГТС-201



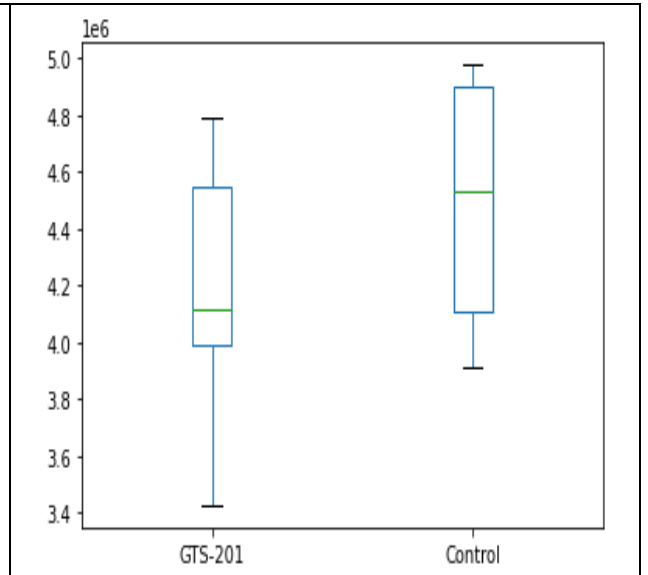
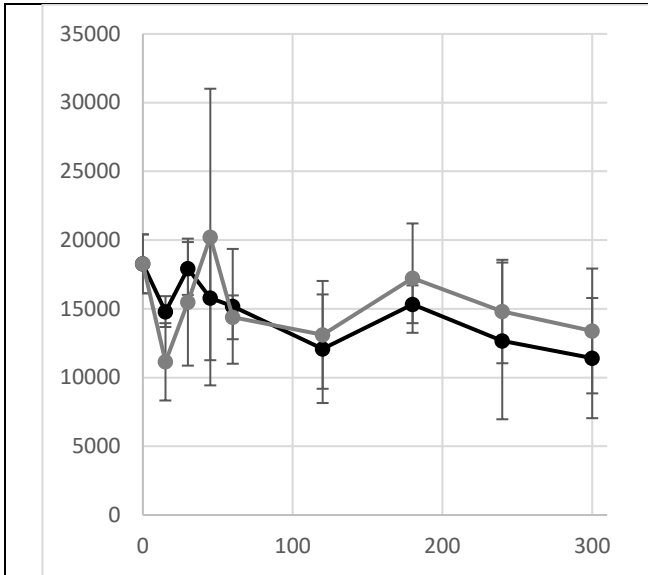
Изменение концентрации ксантуреновой кислоты после введения ГТС-201 в плазме



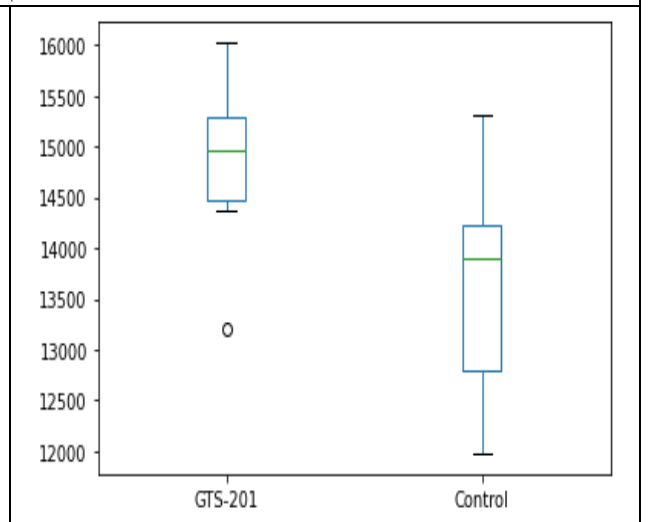
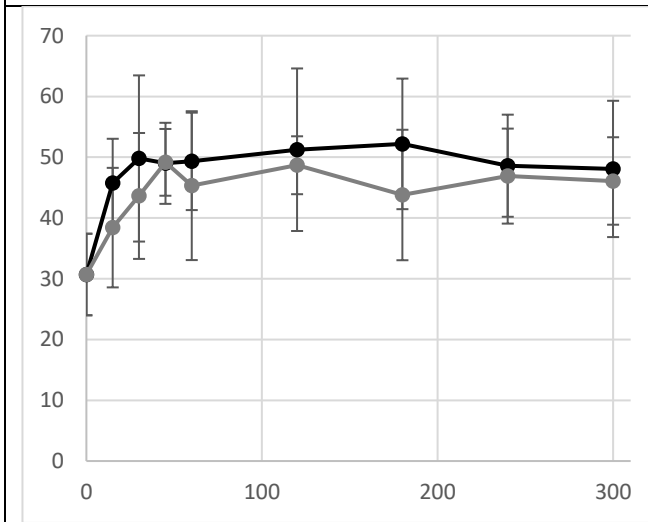
Изменение концентрации хинолиновой кислоты с течением времени в плазме после введения ГТС-201



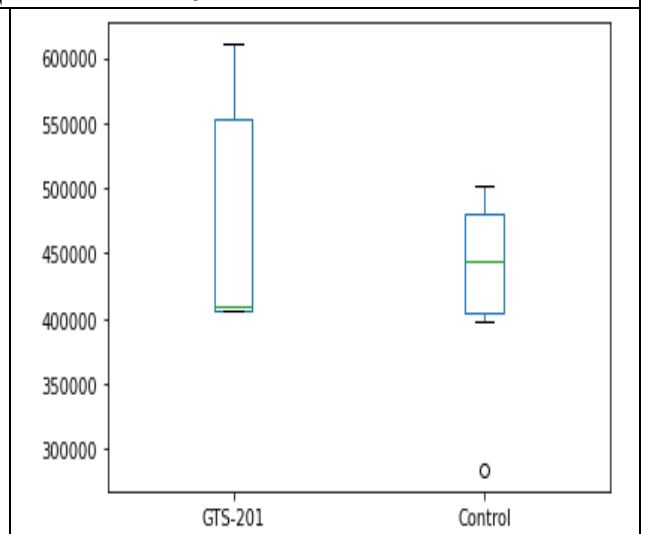
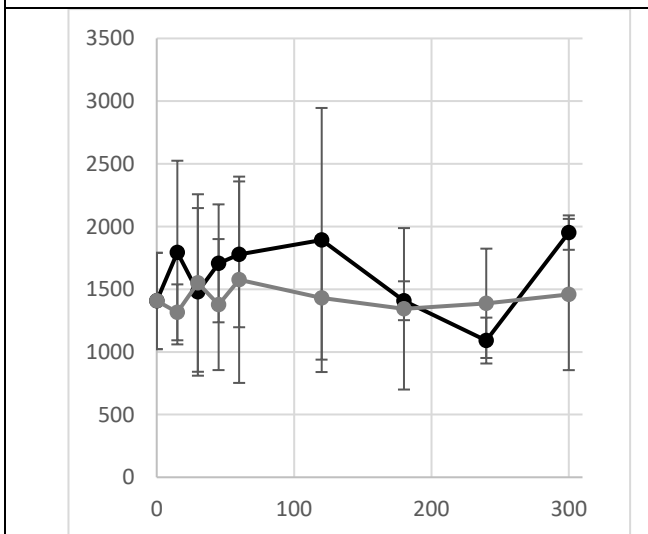
Изменение концентрации индол-3-пропионовой кислоты с течением времени в мозге после введения ГТС-201



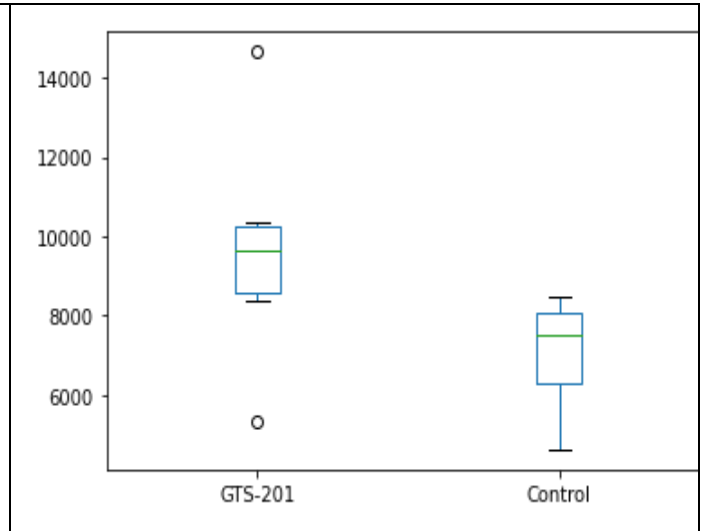
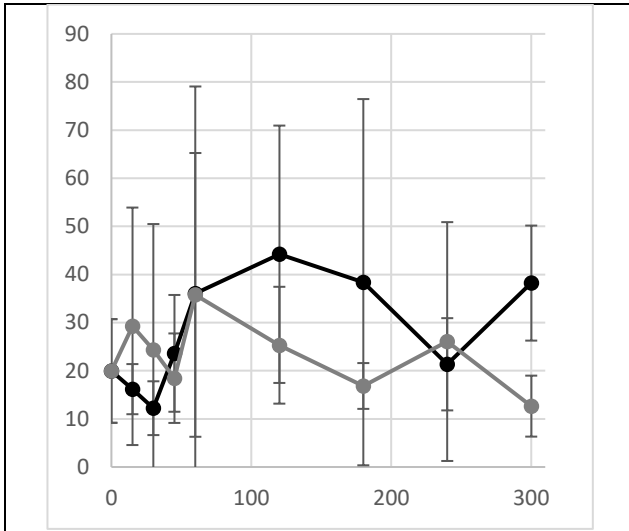
Изменение концентрации индол-3-пропионовой кислоты с течением времени в плазме после введения ГТС-201



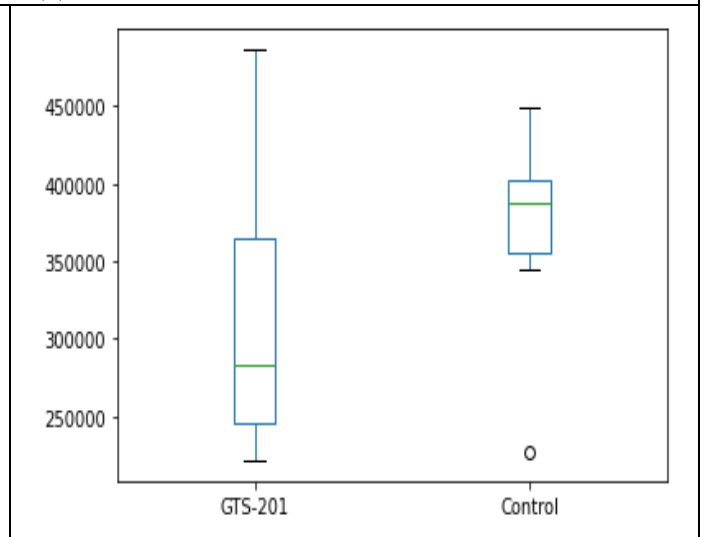
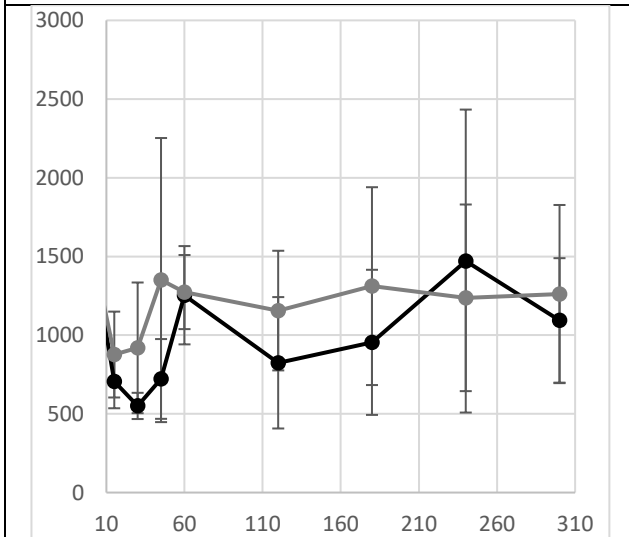
Изменение концентрации индол-3-уксусной кислоты с течением времени в мозге после введения ГТС-201



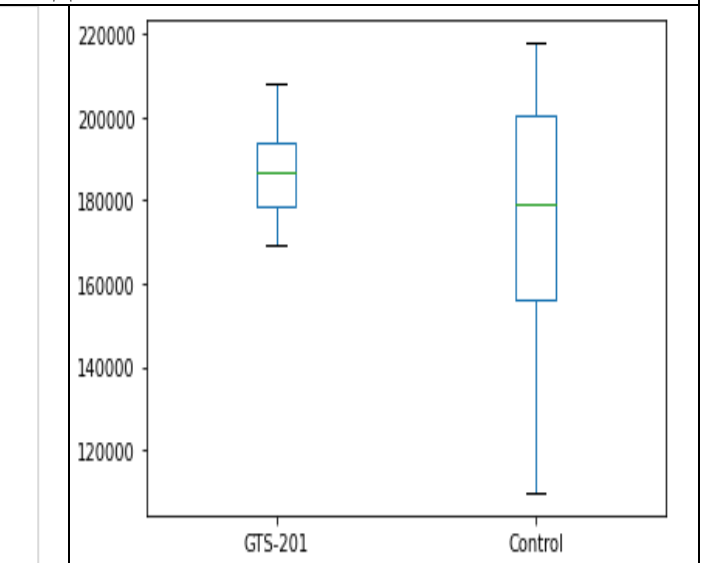
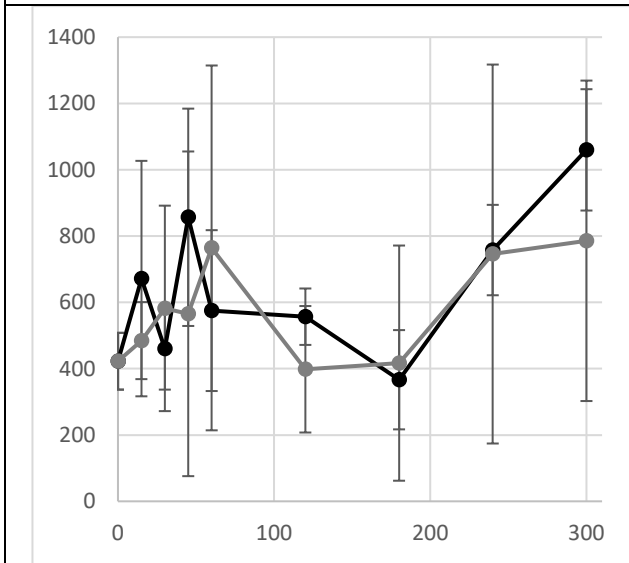
Изменение концентрации индол-3-уксусной кислоты с течением времени в плазме после введения ГТС-201



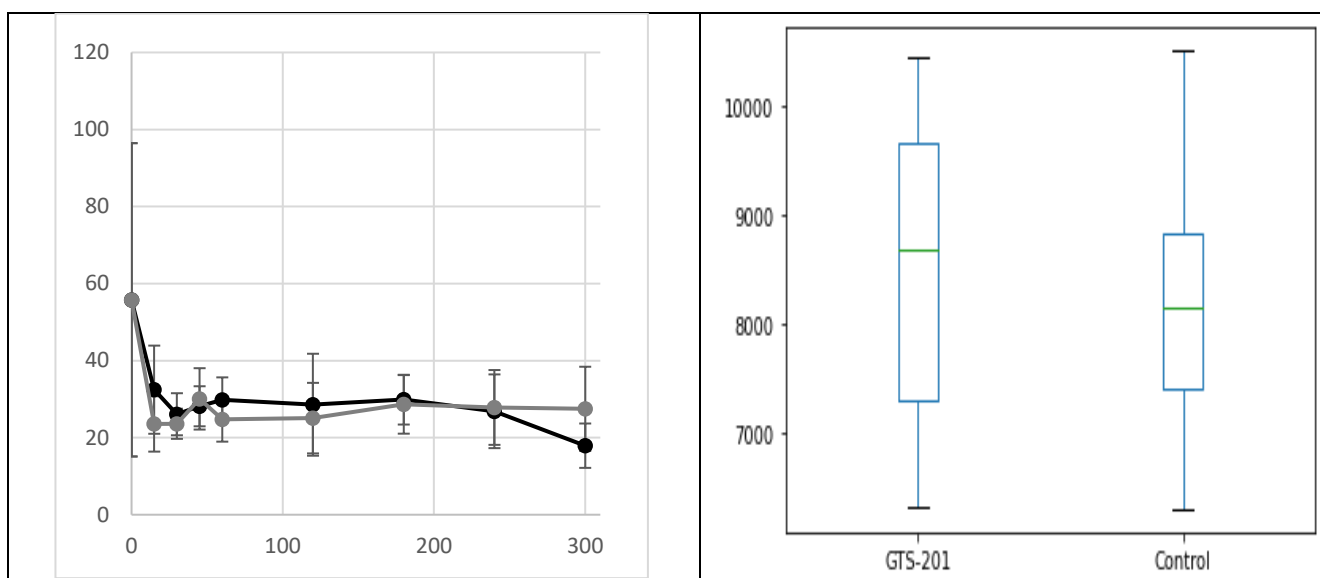
Изменение концентрации индол-3-молочной кислоты с течением времени в мозге после введения ГТС-201



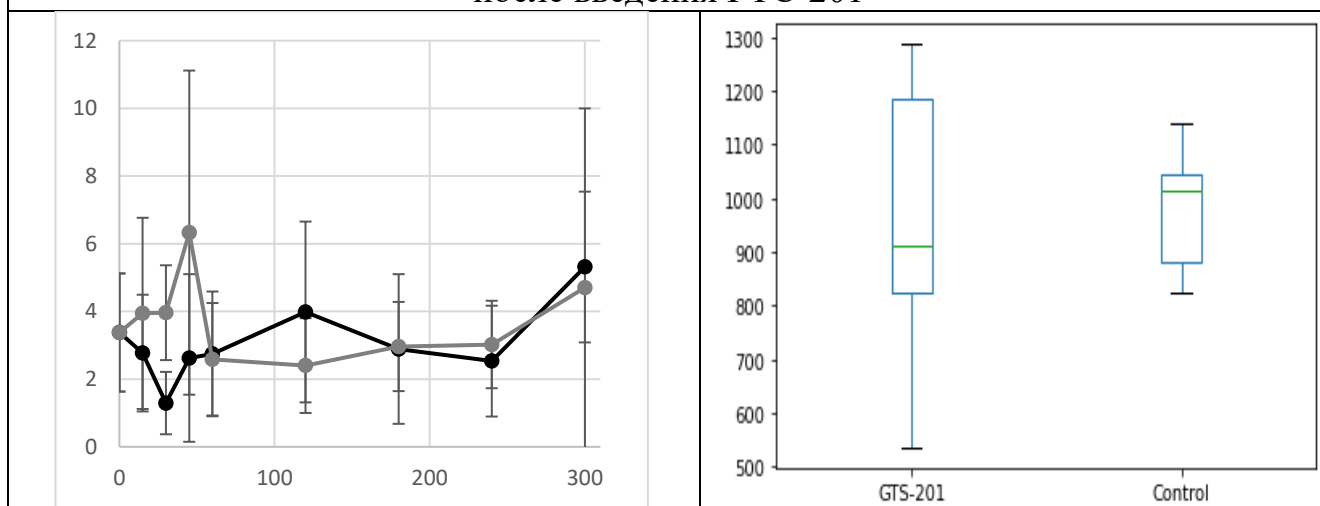
Изменение концентрации индол-3-молочной кислоты с течением времени в плазме после введения ГТС-201



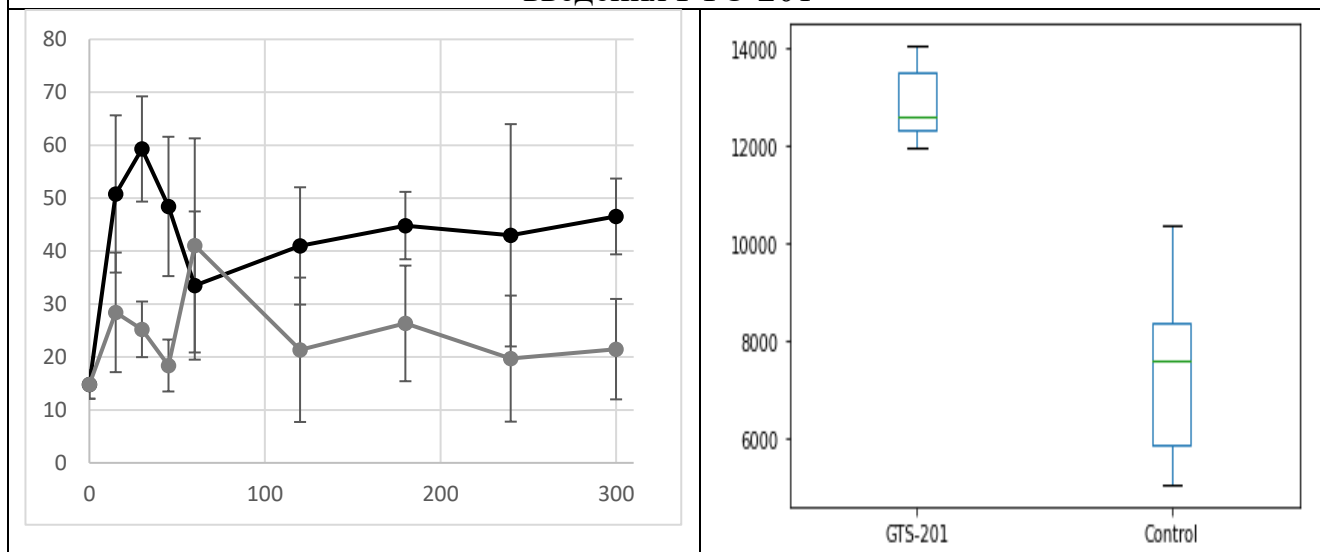
Изменение концентрации 3-гидрокситриптофола с течением времени в мозге после введения ГТС-201



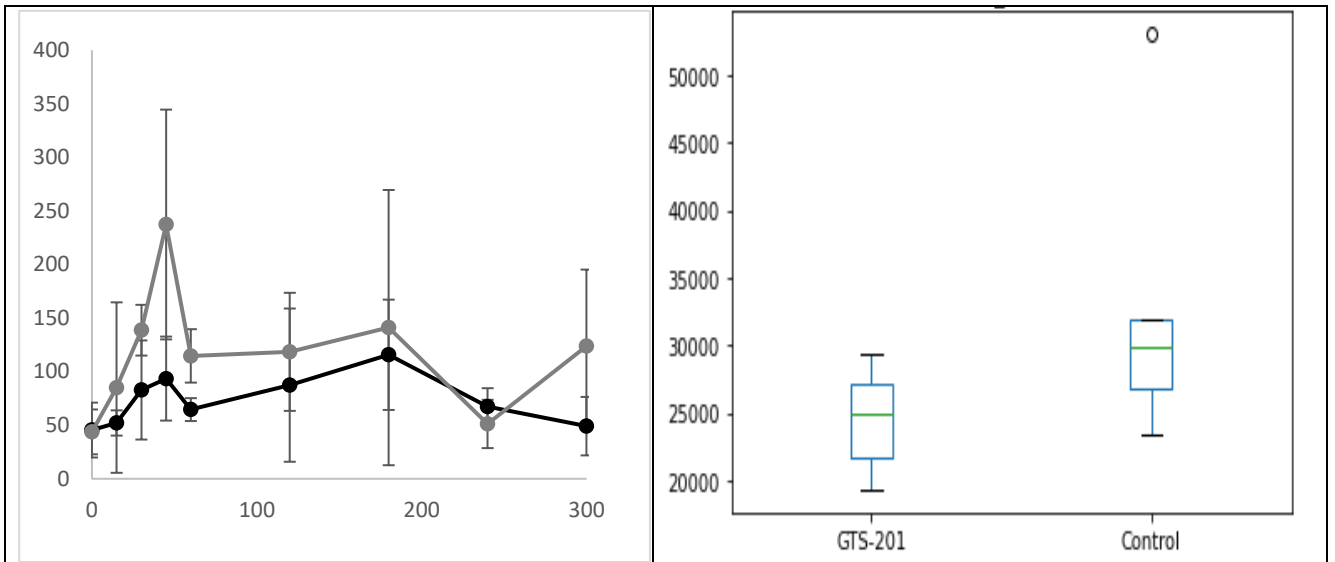
Изменение концентрации 3-гидрокситриптофола с течением времени в плазме после введения ГТС-201



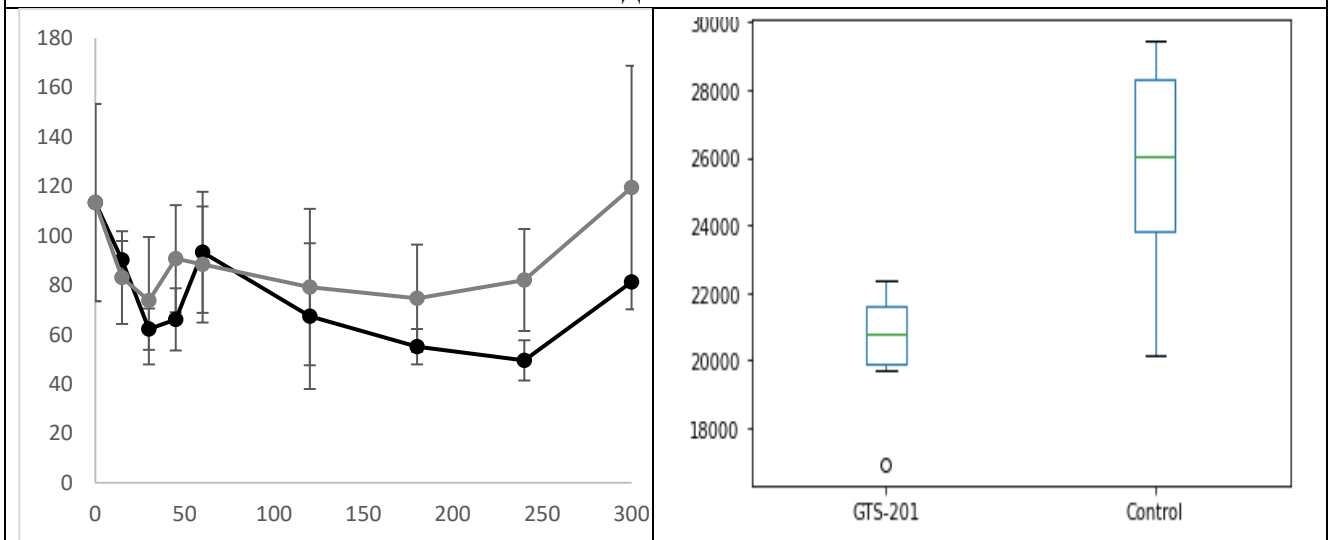
Изменение концентрации триптофола с течением времени в мозге после введения ГТС-201



Изменение концентрации триптофола с течением времени в плазме после введения ГТС-201



Изменение концентрации индол-3-карбоксальдегида с течением времени в мозге после введения ГТС-201



Изменение концентрации индол-3-карбоксальдегида с течением времени в плазме после введения ГТС-201