

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048019**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.21

(21) Номер заявки
202192460

(22) Дата подачи заявки
2020.03.13

(51) Int. Cl. **C07K 5/10** (2006.01)
A61K 38/08 (2019.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
C07K 7/64 (2006.01)

(54) **СИНТЕТИЧЕСКИЕ НЕЙРОМОДУЛИРУЮЩИЕ ПЕПТИДЫ**

(31) **62/818,458**

(32) **2019.03.14**

(33) **US**

(43) **2021.11.24**

(86) **PCT/US2020/022623**

(87) **WO 2020/186155 2020.09.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛАКТОКОР, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Мальшев Антон, Доронин Игорь,
Бабкин Геннадий, Кучумов Аскар
(US)**

(74) Представитель:
**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)**

(56) **WO-A1-2008108285
JPH-A-05194254**

(57) Описана фармацевтическая композиция, содержащая синтетический нейромодулирующий пептид. Изобретение раскрывает нейромодуляторные пептиды, как определено в формуле изобретения, и способы использования таких молекул для терапевтического применения. Было обнаружено, что нейромодулирующие пептиды, включенные в композицию, эффективны при лечении депрессии и других эмоциональных расстройств, включая тревогу.

048019

B1

048019
B1

Приоритет

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/818458, поданной 14 марта 2019 г., содержание которой полностью включено сюда посредством ссылки.

Сфера применения

Изобретение относится к композициям, которые включают белки, такие как пептидные терапевтические агенты, для лечения депрессии и других психических расстройств.

Описание текстового файла, предоставленного электронно

Содержимое текстового файла, представленного в электронном виде, полностью включено в настоящий документ посредством ссылки: копия списка последовательностей в машиночитаемом формате (имя файла: LACT-001PC_ST25.txt; дата записи: 13 марта 2020 г.; размер файла: 5,862 байта)

Обоснование

Депрессия как совокупность множества различных состояний, влияющих на эмоциональное состояние человека, затрагивает миллионы людей во всем мире, и ее лечение, как правило, все еще не является удовлетворительным. Хотя были разработаны различные лекарства для лечения депрессии и связанных с ней состояний, они, как правило, недостаточно специфичны и неэффективны примерно для 40 процентов пациентов. Кроме того, обычно проходят недели, прежде чем пациент начинает ощущать терапевтическое действие принимаемого лекарства. Более того, многие известные препараты обладают различными побочными эффектами. Тревожное расстройство, хотя и отличается от депрессии, часто её сопровождает. Многие анксиолитики обладают недостатками, схожими с имеющимися у антидепрессантов. Задача поиска эффективных методов лечения депрессии и тревожности включает определение соответствующих мишеней для усиления или подавления их функции. Другой проблемой является разработка безопасных и недорогих терапевтических средств, специфичных для этих мишеней и способных облегчить симптомы депрессии и тревоги в относительно короткие сроки.

Соответственно, остается потребность в разработке эффективных и безопасных терапевтических средств для лечения депрессии и связанных с ней аффективных расстройств.

Резюме

В различных аспектах настоящее изобретение обеспечивает композиции (состав) и способы, которые полезны для лечения различных психических, поведенческих, аффективных и невротических расстройств, включая депрессию, тревогу и расстройства, связанные со стрессом. В некоторых аспектах синтетический нейромодулирующий пептид, такой как, например, тетрапептид, в форме фармацевтической композиции можно использовать для лечения депрессии и других аффективных расстройств. В некоторых вариантах осуществления представлена композиция, которая содержит синтетический нейромодулирующий пептид, который определяется общей формулой I



где R_1 выбран из аминокислот W, F и D, R_2 выбран из аминокислот Q, D и K, R_3 выбран из аминокислот S, Q и T, и R_4 выбран из аминокислот V и E. В некоторых вариантах реализации синтетический нейромодулирующий пептид состоит из аминокислот F, Q, S и E. В некоторых вариантах реализации синтетический нейромодулирующий пептид состоит из аминокислот D, K, T и E. В некоторых вариантах реализации синтетический нейромодулирующий пептид состоит из аминокислот W, D, Q и V.

Описанные здесь нейромодулирующие пептиды и их аналоги разработаны для модуляции рецепторов гамма-аминомасляной кислоты типа A (ГАМК-A). Кроме того, в некоторых вариантах реализации нейромодулирующие пептиды и их аналоги, описанные в данном документе, могут модулировать потенциал-зависимые кальциевые каналы (voltage-gated calcium channels, VGCC). Ввиду известной связи между рецепторами ГАМК-A и психическими расстройствами, включая тревогу и депрессию, нейромодулирующий пептид по настоящему изобретению эффективен для предотвращения или лечения различных расстройств депрессивно-тревожного спектра, а также нейродегенеративных расстройств, включая болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. Неисчерпывающий список примеров состояний, которые можно лечить с помощью описанного нейромодулирующего пептида, включает тревожные расстройства, такие как, например, сепарационная тревога, избирательный мутизм, специфическая фобия (СФ), социальное тревожное расстройство, паническое расстройство, агорафобия, тревожное расстройство, вызванное лекарственными и другими препаратами, и тревожное расстройство, вызванное иными медицинским состоянием, генерализованное тревожное расстройство (ГТР), посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР), большое депрессивное расстройство (БДД), терапевтически резистентная депрессия (ТРД), послеродовая депрессия (ПД), биполярное расстройство или биполярная депрессия, обсессивно-компульсивное расстройство (ОКР) и синдром дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ), социальная фобия, возбуждение при болезни Альцгеймера, агрессия при болезни Альцгеймера и обсессивно-компульсивное расстройство.

В некоторых аспектах тетрапептиды могут быть опционально химически модифицированы. Химическая модификация может быть выбрана из амидирования, метилирования и ацетилирования одной или нескольких аминокислот. Дополнительные химические модификации могут включать добавление формила, пироглутамила (pGlu), одной или нескольких жирных кислот, мочевины, карбамата, сульфонида, алкиламина или любой их комбинации. Композиция может включать фармацевтически приемлемый

носитель. В некоторых вариантах осуществления композиция может дополнительно включать носитель для доставки, который может быть, например, липосомой, наночастицей или полисахаридом. Композицию можно вводить субъекту, который, как определено, нуждается в лечении, различными путями, и в некоторых аспектах композиция составлена для интраназального введения.

Краткое описание графиков и чертежей

Фиг. 1А, 1Б и 1В иллюстрируют влияние диазепама (diaz) в дозе 1,25 мг/кг (фиг. 1А) и 5 мг/кг (фиг. 1Б и 1В) на поведенческие параметры *Danio rerio*. Фиг. 1А. Время, проведенное в социальной зоне и вне ее, фиг. 1Б. Время, проведенное в социальной или "стайной" зоне и вне ее, фиг. 1В. Время, проведенное в светлом отсеке. По оси ординат время в секундах (фиг. 1А и 1В) или процент от контрольной группы (фиг. 1С). Данные показаны в виде среднего значения, планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего, "*" обозначают различия при уровне значимости $p < 0,05$, "***" различия при $p < 0,01$, "****" различия при $p < 0,0001$, по U-критерию Манна-Уитни.

Фиг. 2. Установка для тестирования поведения рыб в тесте "Открытое поле" (OF).

Фиг. 3. Установка для тестирования поведения рыб в тесте предпочтения "Светло-темная камера".

Фиг. 4 представляет собой вид системы тестирования поведения рыб, используемой в тесте стайного поведения.

Фиг. 5А, 5Б и 5В иллюстрируют влияние диазепама в дозе 10 мг/кг на поведенческие параметры *Danio rerio*. Фиг. 5А. Количество переходов между светлым и темным отсеками экспериментальной установки. По оси ординат количество переходов. Фиг. 5Б. Латентный период выхода из темного отсека в светлый. По оси ординат время в секундах. Фиг. 5В. Среднее расстояние, пройденное в тесте в "Открытое поле". По оси ординат длину в сантиметрах. Данные представлены в виде среднего значения, планки погрешностей указывают на стандартную ошибку среднего, "*" обозначают различия при уровне значимости $p < 0,05$, "***" различия при $p < 0,01$ по U-критерию Манна-Уитни.

Фиг. 6А и 6Б иллюстрируют влияние флувоксамина (flv) в дозах 5 мг/кг (фиг. 6А) и 10 мг/кг (фиг. 6Б) на время, проведенное испытуемыми животными на поверхности аквариума в тесте "Открытое поле". По оси ординат время в секундах. Данные представлены в виде среднего, планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего, "***" обозначают различия при уровне значимости $p < 0,01$ по U-критерию Манна-Уитни.

Фиг. 7А и 7Б иллюстрируют влияние альфа-казозепина-10 (ACZ-10) в дозе 0,6 мг/кг на поведенческие параметры *Danio rerio*. Фиг. 7А. Время, проведенное в "стайной" зоне. Фиг. 7Б. Время, проведенное на поверхности в тесте "Открытое поле". По оси ординат время в секундах. Данные представлены в виде среднего, планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего, "*" обозначают различия при уровне значимости $p < 0,05$, а "***" различия при $p < 0,01$ по U-критерию Манна-Уитни.

Фиг. 8А и 8Б иллюстрируют влияние бета-казоморфина-7 (BCM-7) в дозе 5 мг/кг на поведенческие параметры *Danio rerio*. Фиг. 8А. Время, проведенное в "стайной" зоне. По оси ординат время в секундах. Фиг. 8Б. Средний пройденный путь в тесте "Открытое поле". По оси ординат длину в сантиметрах. Данные представлены в виде среднего, планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего; а "*" обозначают различия при уровне значимости $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни.

Фиг. 9 иллюстрирует средний пройденный путь в тесте "Открытое поле" группами рыб, подвергшихся воздействию диазепама в дозах 1,25 мг/кг ("Diazepam 1,25"), 5 мг/кг ("Diazepam 5") и 10 мг/кг ("Diazepam 10") и в соответствующих контрольных группах ("Контроль-diaz 1,25", "Контроль-diaz 5" и "Контроль-diaz 10"), а также группами рыб, подвергшихся воздействию флувоксамина в дозах 5 мг/кг ("Fluvoxamine 5") и 10 мг/кг ("Fluvoxamine 10") и соответствующие контрольные группы ("Контроль-fluv 5") и ("Контроль-fluv 10"). У рыб, которым вводили ACZ-10 (0,6 мг/кг) и BCM-7 (5 мг/кг), соответствующими контролями являются "Контроль-ACZ10" и "Контроль-BCM-7" соответственно. По оси ординат длину в сантиметрах. Данные показаны как среднее, а планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего, $p = 0,1$ и $p = 0,07$ - тенденции к статистической значимости по U-критерию Манна-Уитни.

Фиг. 10А и 10Б иллюстрируют влияние нейромодулирующего пептида FQSE на поведение *Danio rerio* в тесте "Открытое поле". Фиг. 10А. Время, проведенное в верхней части аквариума. Фиг. 10Б. Латентный период отхода ото дна. По оси ординат время в секундах. Данные представлены в виде среднего, планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего, а "*" обозначают различия при уровне значимости $p < 0,05$ в соответствии с U-критерием Манна-Уитни.

Фиг. 11А и 11Б иллюстрируют сравнение эффектов ACZ10, FQSE и флувоксамина (fluvoxamine) на поведение *Danio rerio* в тесте "Открытое поле". Фиг. 11А. Время, проведенное в верхней части аквариума, %. Фиг. 11Б. Латентный период (ЛП) выхода к поверхности, %. По оси ординат показаны значения в % относительно контрольной группы. Данные представлены в виде среднего значения, планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего, а "*" обозначают различия при уровне значимости $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни.

Фиг. 12А и 12Б иллюстрируют влияние FQSE на поведение *Danio rerio* в тесте "Светло-темная камера" (СТК). Фиг. 12А. Время нахождения в светлом отсеке СТК. Фиг. 12Б. Время, проведенное в темном отсеке СТК. По оси ординат время в секундах. Данные представлены в виде среднего, планки по-

грешностей указывают стандартную ошибку среднего, а "*" обозначают различия при уровне значимости $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни.

Фиг. 13А и 13Б иллюстрируют эффекты тестируемых веществ на поведение *Danio rerio* в тесте "Светло-темная камера". Фиг. 13А. Время, проведенное в светлом отсеке СТК, в %. Фиг. 13Б. Время, проведенное в темном отсеке СТК, в %. По оси ординат значения в % относительно контрольной группы. Данные представлены в виде среднего, планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего, "*" обозначают различия при уровне значимости $p < 0,05$, а "***" различия при $p < 0,01$ по U-критерию Манна-Уитни.

Фиг. 14А и 14Б иллюстрируют влияние FQSE на поведение *Danio rerio* в тесте стайного поведения. Фиг. 14А. Время, проведенное вне стайного отсека. Фиг. 14Б. Латентный период выхода из стайного отсека. По оси ординат время в секундах. Данные представлены в виде среднего, планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего, "*" обозначают различия при уровне значимости $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни.

Фиг. 15А и 15Б иллюстрируют эффекты тестируемых веществ на поведение *Danio rerio* в тесте стайного поведения. Фиг. 15А. Время, проведенное за пределами стайного отсека, в %. Фиг. 15Б. Латентный период (ЛП) выхода из стайного отсека, в %. По оси ординат значения в % относительно контрольной группы. Данные представлены в виде среднего, планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего, "*" обозначают различия при уровне значимости $p < 0,05$, а "***" различия при $p < 0,01$ по U-критерию Манна-Уитни.

16А и 16Б иллюстрируют эффекты тестируемых веществ на поведение *Danio rerio* в тесте "Открытое поле". Фиг. 16А. Время, проведенное у поверхности воды. Фиг. 16Б. Сравнение эффектов FQSE (1 мг/кг) и флувоксамина (fluvoxamine, 10 мг/кг), время пребывания у поверхности воды в %. По оси ординат значения в % относительно контрольной группы. Данные представлены в виде среднего, планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего, "*" обозначают различия при уровне значимости $p < 0,05$ в соответствии с U-критерием Манна-Уитни.

Фиг. 17А и 17Б иллюстрируют эффекты тестируемых веществ на поведение *Danio rerio* в тесте "Открытое поле". Фиг. 17А. Латентный период выхода к поверхности воды, с. По оси ординат время в секундах. Фиг. 17Б. Сравнение эффектов FQSE (1 мг/кг) и флувоксамина (10 мг/кг), латентный период выхода к поверхности, %. По оси ординат значения в % относительно контрольной группы. Данные представлены в виде среднего значения, планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего, "*" обозначают различия при уровне значимости $p < 0,05$, а "***" различия при $p < 0,01$ по U-критерию Манна-Уитни.

Фиг. 18 иллюстрирует среднюю пройденный путь в тесте "Открытое поле" в группах рыб, которым вводили диазепам в дозе 1,25 мг/кг ("Diazepam 1,25"), 5 мг/кг ("Diazepam 5") и 10 мг/кг ("Diazepam 10") и в соответствующих контрольных группах ("control-diaz 1,25", "control-diaz 5" и "control-diaz 10"), а также в группах рыб, получавших флувоксамин в дозах 5 мг/кг ("Fluvoxamine 5") и 10 мг/кг ("Fluvoxamine 10") и в соответствующих контрольных группах ("Control-fluv 5" и "Control-fluv 10"). Для групп рыб, которым вводили 0,6 мг/кг ACZ-10 ("ACZ-10 0,6"), контрольные группы названы соответственно "Control-ACZ, -10 0,6"; BCM-7 5мг/кг - соответственно "BCM-7 5" и "Control-BCM-7 5"; тетрапептид FQSE в дозах 1 и 10 мг/кг ("FQSE 1" и "FQSE 10") - "Control-FQSE 1" и "Control-FQSE 10". По оси ординат длина пройденного пути в сантиметрах. Данные показаны как средние значения, а планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего.

Фиг. 19А, 19В и 19С иллюстрируют поведенческие характеристики *Danio rerio* после инъекции FLPY в дозе 1 мг/кг в тесте "Светло-темная камера" (СТК). Фиг. 19А. Время, проведенное близко к поверхности (Открытое поле). Фиг. 19В. Время нахождения в светлом отсеке СТК. Фиг. 19С. Время, проведенное вне стайного отсека. По оси ординат время в секундах. Данные показаны как средние значения, а планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего.

Фиг. 20А, 20Б и 20В иллюстрируют поведенческие параметры *Danio rerio* после введения FLPY в дозе 10 мг/кг. Фиг. 20А. Время, проведенное у поверхности в тесте "Открытое поле". Фиг. 20Б. Время, проведенное в светлом отсеке в тесте "Светло-темная камера". Фиг. 20В. Время, проведенное вне "стайной" зоны. По оси ординат время в секундах. Данные показаны как средние значения, а планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего.

Фиг. 21А, 21Б и 21В иллюстрируют поведенческие параметры *Danio rerio* в тесте на стайное поведение после введения ДКТЕ в дозе 1 мг/кг. Фиг. 21А. Время, проведенное вне "стайной" зоны. Фиг. 21Б. Латентный период посещения "стайной" зоны. Фиг. 21В. Время, проведенное возле "стайной" зоны. По оси ординат время в секундах. Данные представлены в виде среднего значения, планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего. "*" обозначают различия при уровне значимости $p < 0,05$, а "***" различия при $p < 0,01$ по U-критерию Манна-Уитни.

Фиг. 22 иллюстрирует латентный период посещения дна в тесте "Открытое поле" для контрольной группы и группы рыб, получавшей 1 мг/кг ДКТЕ. По оси ординат время в секундах.

Фиг. 23 иллюстрирует сравнение эффектов тестируемых веществ на поведение *Danio rerio* в тесте на стайное поведение. Время, проведенное вне "стайной" зоны, %. Проиллюстрированы следующие

группы: диазепам 1,25 мг/кг ("Diazepam 1,25"), FQSE 10 мг/кг, ДКТЕ 1 мг/кг ("ДКТЕ 1") и советуемые контрольные группы. По оси ординат показано изменение во времени в % относительно контрольной группы. Данные представлены в виде среднего, планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего. "*" обозначают различия при уровне значимости $p < 0,05$, а "***" различия при $p < 0,01$ по U-критерию Манна-Уитни.

24А и 24Б иллюстрируют параметры двигательной активности рыб, получивших ДКТЕ в дозе 1 мг/кг в тесте "Открытое поле". Фиг. 24А. Длина трека в сантиметрах. Фиг. 24Б. Средняя скорость, в см/с. Данные представлены в виде среднего, а планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего.

Фиг. 25А, 25Б и 25В иллюстрируют поведенческие параметры *Danio rerio* после введения ДКТЕ в дозе 10 мг/кг. Фиг. 25А. Время, проведенное у поверхности ("Открытое поле"). Фиг. 25Б. Время в светлом отсеке СТК. Фиг. 25В. Время, проведенное вне "стайной" зоны. По оси ординат время в секундах.

Фиг. 26А, 26Б и 26В показаны поведенческие параметры *Danio rerio* после инъекции WDQV в дозе 1 мг/кг. Фиг. 26А. Время, проведенное у поверхности ("Открытое поле"). Фиг. 26Б. Время в светлом отсеке в тесте "Светло-темная камера". Фиг. 26В. Время, проведенное вне "стайной" зоны. По оси ординат время в секундах. Данные представлены в виде среднего значения, а планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего.

Фиг. 27А, 27Б, 27В и 27Г показаны поведенческие параметры *Danio rerio* после инъекции WDQV в дозе 10 мг/кг в тесте "Светло-темная камера" (СТК). Фиг. 27А. Общее время в светлом отсеке СТК. Фиг. 27Б. Время в светлом отсеке СТК за каждую минуту эксперимента. Фиг. 27В. Время в темном отсеке СТК. Фиг. 27Г. Время в темном отсеке СТК за каждую минуту эксперимента. По оси ординат время в секундах. Данные представлены в виде среднего значения, планки погрешностей показывают стандартную ошибку среднего. "*" обозначают различия при уровне значимости $p < 0,05$, а "***" различия при $p < 0,01$ по U-критерию Манна-Уитни.

Фиг. 28А и 28Б иллюстрируют сравнение эффектов WDQV в дозе 10 мг/кг в тесте "Светло-темная камера" (СТК) с эффектами диазепам (diaz 5 мг/кг) и FQSE (10 мг/кг). Фиг. 28А. Время проведенное в светлом отсеке СТК, %. Фиг. 28Б. Время проведенное в темном отсеке СТК, %. По оси ординат % времени относительно контрольной группы. Данные представлены в виде среднего значения, планки погрешностей показывают стандартную ошибку среднего. "*" обозначают различия при уровне значимости $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни.

Фиг. 29 иллюстрирует длину трека (см) в тесте "Открытое поле" в группах рыб, которым вводили диазепам в дозах 1,25 мг/кг ("Diazepam 1,25"), 5 мг/кг ("Diazepam 5") и 10 мг/кг ("Diazepam 10") и в соответствующих контрольных группах ("Контроль-diaz 1,25", "Контроль-diaz 5" и "Контроль-diaz 10"), а также в группах рыб, которым вводили флувоксамин в дозах 5 мг/кг ("Fluvoxamine 5") и 10 мг/кг ("Fluvoxamine 10") и в соответствующих контрольных группах ("Контроль-fluv 5" и "Контроль-fluv 10"). Для группы рыб, которым вводили 0,6 мг/кг ACZ-10 ("ACZ-10 0,6"), соответствующей контрольной группой является "Контроль-ACZ-10"; для группы рыб, которым вводили 5 мг/кг ВСМ-7 ("ВСМ-7 5"), соответствующей контрольной группой является "Контроль-ВСМ-7"; и для группы рыб, которым вводили тетрапептид WDQV в дозе 10 мг/кг ("WDQV 10"), соответствующей контрольной группой является "Контроль-WDQV 10". Данные представлены в виде среднего значения, планки погрешностей показывают стандартную ошибку среднего.

Фиг. 30 иллюстрирует пройденное расстояние в сантиметрах в тесте "Открытое поле" (ОП) мышами BALB/C, получавшими инъекции пептида FQSE в дозе 1, 5, 10, 20 мг/кг. Каждый столбец представляет собой среднее \pm стандартная ошибка среднего. Значимые различия обозначаются символом "*" (однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера; $p < 0,05$).

Фиг. 31 иллюстрирует количество стоек в тесте "Открытое поле" (ОП) мышами BALB/C, получавшими инъекции пептида FQSE в дозе 1, 5, 10 и 20 мг/кг. Каждый столбец представляет собой среднее количество стоек на группу \pm стандартная ошибка среднего. Значимые различия отмечены символом "*" (однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера; $p < 0,05$).

Фиг. 32 иллюстрирует количество выходов в центр в тесте "Открытое поле" (ОП) мышами BALB/C, получавшими инъекции пептида FQSE в дозе 1, 5, 10, 20 мг/кг. Каждый столбец представляет собой среднее общее расстояние \pm стандартная ошибка среднего. Значимые различия отмечены символом "*" (однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера; $p < 0,05$).

Фиг. 33 иллюстрирует пройденный путь в сантиметрах в тесте "Приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ) мышами BALB/C, получавшими инъекции пептида FQSE в дозе 1, 5, 10 и 20 мг/кг. Каждый столбец представляет собой среднее общее расстояние \pm стандартная ошибка среднего. Значимое отличие от контрольной группы обозначено символом "*", значимое отличие от группы диазепам обозначено символом "#" (однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера; $p < 0,05$).

Фиг. 34 иллюстрирует длительность замираний в тесте "Приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ) у мышей BALB/C, получавших инъекции пептида FQSE в дозе 1, 5, 10 и 20 мг/кг. Каждый столбец представляет собой среднее \pm стандартная ошибка среднего. Значимые различия от контрольной

группы обозначено символом "*" (однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера; $p < 0,05$).

Фиг. 35 иллюстрирует время в секундах, проведенное на открытых рукавах в тесте "Приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ) мышами BALB/C, получавшими пептид FQSE в дозе 1, 5, 10 и 20 мг/кг. Каждый столбец представляет собой среднее \pm стандартная ошибка среднего. Значимые различия от контрольной группы обозначены символом "*" (однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера; $p < 0,05$).

Фиг. 36 иллюстрирует выходы на открытые рукава в тесте "Приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ) мышами BALB/C, получавшими пептид FQSE в дозе 1, 5, 10 и 20 мг/кг. Каждый столбец представляет собой среднее \pm стандартная ошибка среднего. Значимые различия от контрольной группы обозначены символом "*" (однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера; $p < 0,05$).

Фиг. 37 иллюстрирует поведение риска мышью BALB/C в тесте "Приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ), получавших для пептида FQSE в дозе 1, 5, 10 и 20 мг/кг. Каждый столбец представляет собой среднее количество актов свешиваний с открытых рукавов \pm стандартная ошибка среднего. Достоверно значимое отличие от контрольной группы обозначено символом "*" (однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера; $p < 0,05$).

Фиг. 38 иллюстрирует индекс тревожности (ИТ, %) мышью BALB/C в тесте "Приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ) для пептида FQSE в дозе 1, 5, 10 и 20 мг/кг. Каждый столбец представляет собой среднее \pm стандартная ошибка среднего. Значимое отличие от контрольной группы обозначено символом "*" (однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера; $p < 0,05$).

Фиг. 39 иллюстрирует результаты теста "Условно-оборонительное закапывание стеклянных шаров" (Marble burying test = MBT) мышью BALB/C, получавших пептид FQSE в дозе 1, 5, 10 и 20 мг/кг. Каждый столбец представляет собой среднее количество закопанных шаров \pm стандартная ошибка среднего. Значимое отличие от контрольной группы обозначено символом "*" (однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера; $p < 0,05$).

Фиг. 40 иллюстрирует длительность иммобилизации в секундах в тесте "Неизбегаемое плавание по Порсольту (двухдневная модификация)" мышью BALB/C, получавших пептид FQSE в дозе 1, 5, 10 и 20 мг/кг. Каждый столбец представляет собой среднюю продолжительность иммобилизации \pm стандартная ошибка среднего. Значимое отличие от контрольной группы обозначено символом "*" (однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера; $p < 0,05$).

Фиг. 41 иллюстрирует продолжительность в секундах пассивного плавания в тесте "Неизбегаемое плавание по Порсольту (двухдневная модификация)" мышью BALB/C, получавших пептид FQSE в дозе 1, 5, 10 и 20 мг/кг. Каждый столбец представляет собой среднюю продолжительность пассивного плавания \pm стандартная ошибка среднего. Значимое отличие от контрольной группы обозначено символом "*" (однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера; $p < 0,05$).

Фиг. 42 иллюстрирует продолжительность в секундах активного плавания в тесте "Неизбегаемое плавание по Порсольту (двухдневная модификация)" мышью BALB/C, получавших пептид FQSE в дозе 1, 5, 10 и 20 мг/кг. Каждый столбец представляет собой среднюю продолжительность пассивного плавания в группе \pm стандартная ошибка среднего. Значимые отличия от контрольной группы обозначены символом "*" (однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом LSD Фишера; $p < 0,05$).

Фиг. 43А, 43Б и 43В иллюстрирует поведение крыс в тесте "Открытое поле" (ОП). Фиг. 43А. Влияние различных доз FQSE и диазепама (DZ) на время в центре ОП (в секундах). Фиг. 43Б. Влияние различных доз FQSE и диазепама (DZ) на количество входов в центральную зону ОП. Фиг. 43В. Влияние различных доз FQSE и диазепама (DZ) на общее пройденное расстояние в ОП (сантиметры, см). Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Значимые отличия ($p < 0,05$) от контрольной группы отмечены "*", "#"- от группы, получавшей диазепам (DZ). Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом LSD Фишера.

Фиг. 44 иллюстрирует влияние различных доз FQSE и диазепама (DZ) на процент времени, проведенного на открытых рукавах в тесте "Приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ). Значимые отличия ($p < 0,05$) от контрольной группы обозначены символом "*". Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом LSD Фишера.

Фиг. 45А и 45Б иллюстрирует поведение крыс в тесте "Неизбегаемое плавание по Порсольту (двухдневная модификация)". Фиг. 45А. Влияние различных доз FQSE (0,01, 0,1, 0,5, 1, 3 мг/кг) и кетамина (10 мг/кг, K10) на длительность иммобилизации (в секундах). 45Б. Влияние различных доз FQSE (0,01, 0,1, 0,5, 1, 3 мг/кг) и кетамина (10 мг/кг, K10) на время активного плавания (в секундах). Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Значимые отличия ($p < 0,05$) от контрольной группы обозначены символом "*". Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом LSD Фишера.

Фиг. 46 иллюстрирует график экспериментов (день эксперимента-тест). SPT - sucrose preference test (тест на предпочтение раствора сахарозы), CMS - chronic mild stress (хронический непредсказуемый мяг-

кий стресс), EPM - elevated plus-maze (тест приподнятый крестообразный лабиринт), SI - social interaction (тест на социальное взаимодействие), FUST - female urine sniffing test (тест на половую мотивацию и ангедонию), NSFT - novelty suppressed feeding test (тест подавления потребления пищи в новой среде), FST - forced swim test (тест принудительного плавания).

Фиг. 47А и 47Б иллюстрируют поведение крыс в тесте "Приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ) после хронического стресса (CMS = chronic mild stress) и однократного введения веществ. Фиг. 47А. Время, проведенное на открытых рукавах, в секундах. Фиг. 47Б. Время замирания, в секундах. Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$ значимые отличия от контрольной группы, # - $p < 0,05$ - значимые отличия от группы, получавшей растворитель (CMS+r-ль), \$ - $p < 0,05$ от группы диазепама (Диаз 0,5). Критерий Краскела-Уоллиса с post hoc тестом Данна.

Фиг. 48 иллюстрирует продолжительность социальных взаимодействий (в секундах) в тесте на социальный контакт (SI) после CMS и четырех инъекций веществ. Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$ значимые отличия от контрольной группы, # - $p < 0,05$ - значимые отличия от группы, получавшей растворитель (CMS+r-ль). Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом LSD Фишера.

Фиг. 49 иллюстрирует индекс предпочтения мочи самки (в %) в FUST после CUMS и восьми инъекций веществ. Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$ значимые отличия от контрольной группы, # - $p < 0,05$ - значимые отличия от группы, получавшей растворитель (CMS+r-ль). Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом LSD Фишера.

Фиг. 50 иллюстрирует кривые накопления Каплана-Майера (тест пищевая мотивация в новых условиях = NSFT). По оси x - латентный период (ЛП, в секундах) еды, Y - доля животных, которые не начали есть. Исследуемые вещества вводились на протяжении 11 дней. * - $p < 0,05$ значимые отличия от контрольной группы, # - $p < 0,05$ - значимые отличия от группы, получавшей растворитель (CMS+r-ль). Критерий Хи-квадрат с post hoc тестом Кокса-Мантеля.

Фиг. 51 иллюстрирует индекс предпочтения сахарозы (%) после CMS и шестнадцати инъекций исследуемых веществ. Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$ значимые отличия от контрольной группы. Тест Краскела-Уоллиса с post hoc тестом Данна.

Фиг. 52 иллюстрирует длительность иммобилизации (в секундах) в тесте принудительного плавания (FST) после CMS и восемнадцати инъекций исследуемых веществ. Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$ значимые отличия от контрольной группы, # - $p < 0,05$ - значимые отличия от группы, получавшей растворитель (CMS+r-ль). Тест Краскела-Уоллиса post hoc тестом Данна.

Фиг. 53А, 53Б и 53В иллюстрируют поведение крыс в парадигме "Вызванное мочой хищника условное избегание места" (predator odor-induced conditioned place aversion = РОСПА). Фиг. 53А. Демонстрирует условное избегание места после воздействия отрицательным ("~") стимулом (моча пумы) или при отсутствии запаха. Тестирование проводилось через 24 ч после предъявления стимула. Фиг. 53Б. Условное избегания места после воздействия без "-" стимула, предварительно получивших вещества после предъявления не пахнущего ватного диска, и до тестирования, проведенного через 24 ч после предъявления. Фиг. 53В. Условное избегание места после предъявление "-" стимула (запах хищника в виде смоченной в моче рыси ватного диска) в группах, предварительно получавших вещества после "-" стимула, и до тестирования, проведенного через 24 ч после предъявления запаха. Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$ между группами. Однофакторный дисперсионный анализ с post hoc тестом Ньюмена-Кейлса. VEN - группа крыс, получавшая инъекции растворителя, DOX - группа крыс, получавшая инъекция доксазозина.

Фиг. 54 иллюстрирует продолжительность замирания в тесте "Открытое поле" в секундах. Результаты представлены в виде графиков "ящик с усами" с максимальными и минимальными значениями. * - Значимые различия от контрольной группы, # - Значимые различия от группы выученной беспомощности (ВБ), $p \leq 0,05$. Тест Краскела-Уоллиса post hoc тестом Данна.

Фиг. 55А и 55Б иллюстрируют поведение крыс в тесте "Открытое поле" в парадигме выученной беспомощности (ВБ). Фиг. 55А. Продолжительность вертикальной двигательной активности животных (стойки), в секундах. Фиг. 55Б Горизонтальная двигательная активность (пробег), количество секторов. Результаты представлены в виде графиков "ящик с усами" с максимальными и минимальными значениями. * - Значимые отличия от контрольной группы. Однофакторный дисперсионный анализ с post hoc тестом Тьюки.

Фиг. 56А и 56Б иллюстрируют поведение крыс в тесте "Приподнятый крестообразный лабиринт" в парадигме "выученной беспомощности" (ВБ). Фиг. 56А. Время, проведенное на открытых лучах, в секундах. Фиг. 56Б. Число выглядываний из закрытых рукавов лабиринта. Результаты представлены в виде графиков "ящик с усами" с максимальными и минимальными значениями.

Фиг. 57А и 57Б иллюстрируют поведение крыс в тесте "Принудительное плавание" в парадигме "выученной беспомощности" (ВБ). Фиг. 57А. Длительность иммобилизации, в секундах. Фиг. 57Б. Продолжительность активного плавания, в секундах. Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm SEM. * - Значимые различия от контрольной группы; & - отличие от контрольной группы на уровне тенденции ($p < 0,1$); # - Значимые различия от группы ВБ, $p \leq 0,05$. Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом LSD Фишера.

Фиг. 58 иллюстрирует базальный уровень кортикостерона в плазме крыс, нмоль/л. Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,1$ - тенденция к статистической значимости по сравнению с контрольной группой, # $p < 0,05$ - значимые отличия по сравнению с группой ВБ. Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным LSD-тестом Фишера.

Фиг. 59 иллюстрирует вызванные стрессом изменения кортикостерона плазмы крыс после острого стресса и введения физиологического раствора или дексаметазона (ДМТ), нмоль/л. Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$ - значимые отличия от соответствующей группы "стресс+ физ. р-р.". Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным LSD-тестом Фишера.

Фиг. 60 иллюстрирует общее пройденное расстояние (количество квадратов) тесте "Открытое поле" животными после хронического предсказуемого стресса (ХПС) и введения веществ (контроль = конт, растворитель = р-ль, флувоксамин = ФО, FQSE 0.3 и FQSE 3 - пептид в дозе 0.3 и 3 мг/кг соответственно). Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

Фиг. 61А и 61Б иллюстрирует поведение крыс в тесте "Принудительное плавание" после хронического предсказуемого стресса (ХПС) и введения веществ (контроль = конт, растворитель = р-ль, флувоксамин = ФО, FQSE 0.3 и FQSE 3 - пептид в дозе 0.3 и 3 мг/кг соответственно). Фиг. 61А. Время активного плавания (активное плавание + клайминг), в секундах. Фиг. 61Б. Время пассивного плавания (пассивное плавание + иммобилизация), в секундах. Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * - статистически значимые различия при $p \leq 0,05$; # - $p < 0,05$ по сравнению с группой "ХПС+р-ль". Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным LSD-тестом Фишера.

Фиг. 62 иллюстрирует пример результатов вестерн-блоттинга (WB) в образцах гомогената коры и гиппокампа крыс Sprague-Dawley после хронического предсказуемого стресса (ХПС) и введения веществ (контроль = конт, растворитель = р-ль, флувоксамин = ФО, FQSE 0.3 и FQSE 3 - пептид в дозе 0.3 и 3 мг/кг соответственно).

Фиг. 63А и 63Б иллюстрируют интегральную площадь GAPDH, полученную с помощью вестерн-блоттинга (нормализованную к общему белку), по сравнению с контрольной группой, в %. Фиг. 63А. Содержание GAPDH в коре головного мозга. Фиг. 63Б. Содержание GAPDH в гиппокампе. Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

Фиг. 64А и 64Б иллюстрируют интегральную площадь BDNF, полученную с помощью вестерн-блоттинга (нормализованную к общему белку), по сравнению с контрольной группой, в %. Фиг. 64А. Содержание BDNF в коре головного мозга. Фиг. 64Б. Содержание BDNF в гиппокампе. Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой и # - $p < 0,05$ по сравнению с группой "ХПС + р-ль". Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным LSD-тестом Фишера.

Фиг. 65А и 65Б иллюстрируют интегральную площадь p70s6k (Thr421/Ser424), полученную вестерн-блоттингом (нормализованную к общему белку), по сравнению с контрольной группой, в %. Фиг. 65А. Содержание p70s6k (Thr421/Ser424) в коре головного мозга. Фиг. 65Б. Содержание p70s6k (Thr421/Ser424) в гиппокампе. Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка. * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой и # - $p < 0,05$ по сравнению с группой "ХПС + р-ль". Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным LSD-тестом Фишера.

Фиг. 66А и 66Б иллюстрируют интегральную площадь p-ERK1 (Thr202), полученную с помощью вестерн-блоттинга (нормализованную к общему белку), по сравнению с контрольной группой, в %. Фиг. 66А. Содержание p-ERK1 (Thr202) в коре головного мозга. Фиг. 66Б. Содержание p-ERK1 (Thr202) в гиппокампе. Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой и # - $p < 0,05$ по сравнению с группой "ХПС+р-ль". Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным LSD-тестом Фишера.

Фиг. 67А и 67Б иллюстрируют интегральную площадь p-ERK 2 (Tyr204), полученную вестерн-блоттингом (нормализованную к общему белку), по сравнению с контрольной группой, в %. Фиг. 67А. Содержание p-ERK 2 (Tyr204) в коре головного мозга. Фиг. 67Б. Содержание p-ERK 2 (Tyr204) в гиппокампе. Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой и # - $p < 0,05$ по сравнению с группой "ХПС+р-ль". Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным LSD-тестом Фишера.

Фиг. 68А и 68Б иллюстрируют интегральную площадь p-PKC (PKC гамма Thr514), полученную с помощью вестерн-блоттинга (нормализованную к общему белку), по сравнению с контрольной группой,

в %. Фиг. 68А. Содержание р-РКС (РКС gamma Thr514) в коре головного мозга. Фиг. 68Б. Содержание р-РКС (РКС gamma Thr514) в гиппокампе. Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой и # - $p < 0,05$ по сравнению с группой "ХПС+р-ль". Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным LSD-тестом Фишера.

Фиг. 69А и 69Б иллюстрируют интегральную площадь р-GSK3 β (Ser9), полученную вестерн-блоттингом (нормализованную к общему белку), по сравнению с контрольной группой, в %. Фиг. 69А. Содержание р-GSK3 β (Ser9) в коре головного мозга. Фиг. 69Б. Содержание р-GSK3 β (Ser9) в гиппокампе. Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой и # - $p < 0,05$ по сравнению с группой "ХПС+р-ль". Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным LSD-тестом Фишера.

Фиг. 70 иллюстрирует влияние SR 95531 и FQSE на связывание [3 H]-SR 95531 с ГАМК рецепторами коры головного мозга крыс *in vitro*.

Фиг. 71 иллюстрирует влияние FQSE и кетансерина на связывание [3 H]-FQSE с FQSE-связывающими кортикальными сайтами *in vitro*. Кривая кетансерина была использована в качестве примера, она аналогична для всех выбранных лигандов с $IC_{50} > 100$ мкмоль/л.

Фиг. 72 иллюстрирует влияние FQSE и ГАМК на связывание [3 H]-FQSE с FQSE-специфическими сайтами в коре головного мозга крысы *in vitro*. Кривая ГАМК использовалась в качестве примера, она аналогична для всех выбранных лигандов с $IC_{50} > 100$ мкмоль/л.

Фиг. 73 иллюстрирует влияние FQSE, диазепам и прегненолона на связывание [3 H]-FQSE с FQSE-специфическими сайтами связывания в коре головного мозга крысы *in vitro*.

Фиг. 74 иллюстрирует влияние FQSE и isoguvacine на связывание [3 H]-FQSE с сайтами связывания FQSE коры головного мозга *in vitro*. Кривая isoguvacine была использована в качестве примера, она аналогична для всех выбранных лигандов с $IC_{50} > 100$ мкмоль/л.

Фиг. 75А, 75Б, 75С иллюстрируют поведение мышей в тесте "Приподнятый крестообразный лабиринт" после введения FQSE, бикикуллина (Бик) и бикикуллина+FQSE. Фиг. 75А. Время, проведенное на открытых лучах, секунды. Фиг. 75Б. Количество входов на открытые лучи. Фиг. 75В. Индекс тревожности (ИТ), %. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$ значимые отличия относительно контрольной группы, # - $p < 0,05$ - относительно группы "бик", \$ - $p < 0,05$ — относительно группы "Бикикуллин + FQSE". Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным LSD-тестом Фишера.

Фиг. 76 иллюстрирует длительность активного плавания в тесте "Неизбегаемое плавание по Порсолту (двухдневная модификация)" после введения FQSE, бикикулина (Бик) и бикикулина + FQSE. Результаты выражены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$ представляет значимые отличия относительно контрольной группы, # - $p < 0,05$ - относительно группы "Бик", \$ - $p < 0,05$ - относительно группы "Бик + FQSE". Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным LSD-тестом Фишера.

Фиг. 77 иллюстрирует, что FQSE подавляет липополисахарид (ЛПС)-индуцированную гиперэкспрессию мРНК генов TNF α , IL-1 β и IL-6 в первичных глиальных клетках мышей. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Все группы с ЛПС продемонстрировали значительную разницу по сравнению с контролем (без ЛПС). # - $p < 0,05$ значимые отличия от ЛПС. * - $p < 0,05$ значимые отличия от контроля. Статистический анализ проводился с использованием непарного t-критерия.

Фиг. 78 иллюстрирует, что уровень экспрессии мРНК IKK β не зависит ни от присутствия ЛПС, ни от FQSE в первичных глиальных клетках мыши. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

Подробное описание

В настоящем документе представлены пептидные композиции, которые используются, например, для лечения депрессии, тревожности, аффективных расстройств, связанных со стрессом. В некоторых аспектах были разработаны нейромодулирующие терапевтические композиции на основе пептидов для ряда психических состояний в пределах спектра депрессивных и тревожных расстройств. Мишени центральной нервной системы (ЦНС) были выбраны для достижения высокой специфичности и эффективности нейромодулирующих пептидных композиций. В сочетании с ожидаемым профилем безопасности пептидов, их композиции в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают безопасное и эффективное лечение.

В вариантах осуществления в соответствии с настоящим открытием рецептор ГАМК-А, который является ионотропным рецептором, был выбран в качестве мишени для описанной группы нейромодулирующих пептидов. Эндогенный лиганд ГАМК-А представляет собой гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК), которая является основным тормозным нейромедиатором в центральной нервной системе. Рецепторы ГАМК-А являются преобладающим типом рецепторов ГАМК в головном мозге. Рецепторы ГАМК-А состоят из 5 субъединиц. Существует не менее 19 различных изоформ субъединиц, кодируемых разными генами и сгруппированных в субъединицы α , β , γ , δ , ϵ и σ , из которых наиболее изучены α ,

β и γ . См. Nutt (2006). GABA-A Receptors: Subtypes, Regional Distribution, and Function. *J. Clin. Sleep. Med.* 2: S7-11. Активный сайт рецептора ГАМК-А на стыке между субъединицами α и β является сайтом связывания для ГАМК и некоторых соединений. ГАМК-А-рецептор может модулироваться рядом терапевтических агентов, включая бензодиазепины, барбитураты, анестетики, этанол, цинк и нейростероиды.

Бензодиазепины (БЗД) связываются с так называемым сайтом связывания бензодиазепина, расположенным на стыке α - и γ -субъединиц рецепторов ГАМК-А. См. Barnard (1998) Subtypes of gamma-aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.* 50 (2): 291-313. Таким образом, бензодиазепины связываются с рецепторным участком белкового комплекса рецептора ГАМК-А, который отличается от сайта связывания ГАМК. Как только бензодиазепин связывается с участком рецептора ГАМК-А, бензодиазепин аллостерически изменяет конформацию рецептора ГАМК-А, увеличивая сродство рецептора ГАМК-А к ГАМК. В то же время нейростероиды связываются с ГАМК-А-рецепторами на участке, который отличается от участков узнавания ГАМК, бензодиазепинов и барбитуратов. Это приводит к аллостерической модуляции связывания ГАМК или изменению проводимости канала. Модуляция нейростероидами лишена субъединичной селективности, т.к. они связываются с сайтом, который является консервативным у большинства членов семейства рецепторов ГАМК-А. Эффект нейростероидов на рецептор ГАМК-А зависит от типа стероидов (агонист или антагонист), типа рецепторов (синаптический или внесинаптический), субъединичного состава и внутренней структуры стероида. См. Wang, M. (2011). Neurosteroids and GABA-A receptor function. *Front. Endocrinol.* 2, 44).

Авторы настоящего изобретения обнаружили нейромодулирующие пептиды с новыми структурами и обладающие способностью связываться с аллостерическим сайтом БЗД между α - и γ -субъединицами и/или другим аллостерическим модуляторным сайтом рецептора ГАМК-А, таким как сайт связывания между α - и β -субъединицы и/или связывание с нейростероидным сайтом ГАМК-А. Было обнаружено, что анксиолитическая и антидепрессивная активность этих пептидов сопоставима с диазепамом и флувоксамином. Это было подтверждено экспериментами на рыбках Данио (*Danio rerio*) и грызунах, что более подробно обсуждается в примерах ниже. В некоторых вариантах реализации нейромодулирующие пептиды в соответствии с различными вариантами реализации настоящего открытия могут модулировать потенциал-управляемые кальциевые каналы (VGCC), также называемые потенциал-зависимыми кальциевыми каналами (VDCCs), которые представляют собой группу потенциал-управляемых кальциевых каналов (VDCC), обнаруженных в мембране возбудимых клеток (например, в мышечных, глиальных клетках, нейронах и т.д.) с проницаемостью для иона кальция Ca^{2+} . См. Yamakage et al. Calcium channels - basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels - a review. *Canadian Journal of Anaesthesia.* 2002. 49 (2):151-64. При физиологическом мембранном потенциале или потенциале покоя VGCC обычно закрыты; они активируются (т.е. открываются) при деполяризации мембран. Концентрация ионов Ca^{2+} вне клетки обычно в несколько тысяч раз выше, чем внутри клетки, а активация VGCC обеспечивает приток Ca^{2+} в клетку, что, в зависимости от типа клетки, приводит к активации кальций-чувствительных калиевых каналов, мышечному сокращению, возбуждению нейронов, усилению экспрессии генов или высвобождению гормонов или нейротрансмиттеров. См. Wilson et al. Thromboxane A2-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca^{2+} entry and Ca^{2+} sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. *The Biochemical Journal.* 2005. 389 (Pt 3):763-74).

Было показано, что THDOC (тетрагидродезоксикортикостерон; $3\alpha,21$ -дигидрокси- 5α -прегнан-20-он), DHEA (дегидроэпиандростерон) и прегненолон действуют как антагонисты VGCC, обратимо блокируя VGCC в нейронах гиппокампа взрослых млекопитающих. См. Reddy & Kulkarni. Development of neurosteroid-based novel psychotropic drugs. *Prog Med Chem.* 2000; 37:135-75. THDOC является положительным аллостерическим модулятором рецептора ГАМК-А и обладает седативным, анксиолитическим и противосудорожным действием. См. Reddy & Rogawski Stress-induced deoxycorticosterone-derived neurosteroids modulate GABA(A) receptor function and seizure susceptibility. *The Journal of Neuroscience.* 2000. 22 (9): 3795-805. Было показано, что бензодиазепины, такие как, например, диазепам, флуразепам и дезалкилфлуразепам, и другие положительные модуляторы ГАМКА напрямую ингибируют активность VGCC L-типа (L-VGCC). См. Earl & Tietz. Inhibition of recombinant L-type voltage-gated calcium channels by positive allosteric modulators of GABAA receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011 Apr;337(1):301-311. Габапентиноидные препараты (например, габапентин и прегабалин), являющиеся аналогами ГАМК, могут действовать путем прямого ингибирования VGCC. См. Patel et al. Mechanisms of the gabapentinoids and $\alpha 2 \delta$ -1 calcium channel subunit in neuropathic pain. *Pharmacol Res Perspect.* 2016. Feb 27;4(2).

Авторы настоящего изобретения с помощью компьютерных вычислений создали набор пептидов, в котором предполагается, что подобранные пептиды являются пептидами-аллостерическими модуляторами ГАМК-А со сродством к БЗД и сайту связывания нейростероидов (NS) ГАМК-А. В другой серии экспериментов оценивали другой сайт связывания между α - и β -субъединицами (называемый сайтом связывания альфа-бета или α - β). Алгоритм трехмерного докинга был использован для выбора более подходящих пептидов из выборки пептидов. В результате было идентифицировано семейство тетрапептидов

с новыми последовательностями. В некоторых аспектах с помощью вычислений был создан ряд тетрапептидов в качестве потенциальных лекарств, и было протестировано подмножество тетрапептидов. Поведенческое тестирование *in vivo* подтвердило, что три иллюстративных пептида, FQSE, DKTE и WDQV, обладают анксиолитической и антидепрессивной активностью, сравнимой с диазепамом и флувоксаминном, что более подробно обсуждается ниже. Авторы настоящего изобретения разработали и оценили нейромодулирующие пептиды, которые, как было установлено, обладают способностью связываться с сайтом БЗД (альфа-гамма) и/или сайтом альфа-бета и/или сайтом нейростероидов ГАМК-А рецепторов. В некоторых аспектах авторы настоящего изобретения провели вычислительный анализ и эксперименты на моделях животных, как описано в данном документе, и в результате была идентифицирована группа тетрапептидов, определяемая следующей общей формулой:



В некоторых аспектах R_1 представляет собой аминокислоту, расположенную в сайте БЗД, или в сайте связывания α - β , или в сайте нейростероида ГАМК-А. N-конец пептида может быть расположен в сайте БЗД, или в сайте связывания α - β , или в сайте нейростероида ГАМК-А, или в непосредственной близости от сайта БЗД, или в сайте связывания α - β , или в сайте нейростероида ГАМК-А. Альтернативно, C-конец пептида может быть расположен в сайте БЗД, или в сайте связывания α - β , или в сайте нейростероида ГАМК-А. В нижеследующем описании пептид определяется как последовательность, идущая от N-конца до C-конца. В некоторых аспектах тетрапептид в соответствии с настоящим раскрытием не содержит пролин.

В некоторых вариантах реализации изоэлектрическая точка пептида меньше 6.

Авторы изобретения оценили эффективность трех иллюстративных пептидов, FQSE, DKTE и WDQV, а также протестировали другие (известные) тестируемые вещества, используя модели *in vivo* и *in vitro*, как более подробно обсуждается ниже в разделе "Примеры".

Ранее наблюдалось, что высокая тревожность у рыбок Данио связана с увеличением времени, проведенным в темном отсеке светло-темной камеры (увеличение скототаксиса - предпочтения темноты), а также с усилением стайного рефлекса, выражающегося в стремлении к тесному контакту с другими рыбками Данио. Увеличение времени, проведенного на поверхности аквариума (или уменьшение времени, проведенного на дне) в тесте "Открытое поле" также связано с противотревожным эффектом у рыб: такие изменения в поведении Данио под влиянием антидепрессанта флуоксетина (СИОЗС) были описаны ранее. См. Egan, R.J. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.*, 205(1):38-44. Было показано, что увеличение скототаксиса вызвано смещением баланса ориентировочно-исследовательской и оборонительной мотивации в сторону оборонительного поведения, а стайный рефлекс является основной защитной реакцией на хищника у стайных рыб. См. Maximino (2011) Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35: 624-631; Nguyen (2014) Aquatic blues: Modeling depression and antidepressant action in zebrafish. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 55:26-39. Таким образом, *Danio rerio* является подходящей моделью для оценки эффектов потенциальных анксиолитиков.

Выводы авторов настоящего изобретения согласуются с опубликованными данными по этому предмету, согласно которым поведение *Danio rerio* в условиях открытого поля, светло-темной камеры и установки, оценивающей стайный рефлекс, является адекватной моделью для оценки тревожного поведения, а также для оценки эффектов антидепрессантов и анксиолитических препаратов. См. Maximino (2014). Fingerprinting of Psychoactive Drugs in Zebrafish Anxiety-Like Behaviors. *PLoS One*. 9. P. e103943). При тестировании на Данио было установлено, что FQSE является лидирующим пептидом с выраженной анксиолитической активностью без седативных эффектов.

Согласно результатам, полученным в тестах "Открытое поле" (ОП), "Приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ) и "Условное оборонительное закапывание стеклянных шаров" (МВ), введение FQSE (посредством внутрибрюшинной инъекции) мышам приводило к выраженному анксиолитическому эффекту. В тесте принудительного плавания по Порсольту (FST) введение пептида приводило к эффекту, подобному эффектам антидепрессантов. Авторы изобретения наблюдали эффекты различных доз FQSE после интраназального введения на поведение крыс Sprague-Dawley в ОП, ПКЛ и в FST. Поведенческие изменения после введения FQSE частично повторяют те, которые наблюдались у крыс, получавших диазепам в тестах ОП и ПКЛ, и у крыс, получавших кетамин, в FST. Наиболее выраженные анксиолитические и антидепрессантные эффекты пептида наблюдались в дозах 0,5 и 0,01 мг/кг, в зависимости от поведенческой парадигмы. Полученные результаты предполагают дозозависимую активность FQSE с максимальной эффективностью при интраназальной дозе 0,5 мг/кг.

FQSE в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг показал эффект, подобный антидепрессанту, в различных поведенческих тестах на модели хронического умеренного непредсказуемого стресса (CMS). В то же время FQSE в дозе 0,05 мг/кг показал анксиолитический эффект в тесте с пищевого поведения в новых условиях (NSFT) и легкий анксиолитический эффект в ПКЛ без признаков седативного эффекта.

Результаты исследований авторов показали, что доза FQSE в 0,5 мг/кг значительно ослабляет вызванное запахом хищника избегание места в большей степени, чем доксазозин (DOX).

Исследование эффектов в парадигме обученной беспомощности (ВБ) показало, что FQSE имеет дозозависимый анксиолитический эффект в тестах ОП и ПКЛ, и эффекты, подобные антидепрессантам, в тестах FST и тесте с введением дексаметазона (ДМТ). Введение FQSE предотвращало гиперактивацию гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы (ГТА) и нарушение ее регуляции, которое проявлялось у животных в ответ на стресс.

Было обнаружено, что введение FQSE оказывает положительный нейротропный эффект после хронического введения в модели хронического предсказуемого стресса (ХПС). Авторы изобретения сравнивают полученные результаты молекулярных механизмов действия FQSE с описанной активностью модуляторов ГАМК-А.

Немеченый FQSE специфически вытесняет [³H]-FQSE в низких концентрациях: сайты специфического связывания [³H]-FQSE в мембранах коры головного мозга крыс были обнаружены с $IC_{50} = 2 \times 10^{-6}$ М. Также было обнаружено, что диазепам и прегненолон (оба являются лигандами для ГАМК-А) имеют некоторую степень родства ($IC_{50} \sim 10^{-4}$ М) к сайтам связывания [³H]-FQSE в мембранах коры головного мозга крыс. ERK $1/2$.

Было показано, что FQSE подавляет липополисахарид (ЛПС)-индуцированную экспрессию провоспалительных цитокинов TNF-альфа, IL-1b и IL-6 в первичных глиальных клетках мыши, что может указывать на его роль в регуляции нейровоспаления. Полученные данные хорошо коррелируют с ранее показанными результатами вестерн-блоттинга (WB), где было выявлено, что FQSE способен нормализовать стресс-вызванное увеличение уровня фосфорилирования ERK $1/2$ (участника пути MAPK). Подавление экспрессии провоспалительных цитокинов, наблюдаемое в настоящем исследовании, также можно рассматривать как результат ГАМК-А-индуцированной репрессии MAPK. См. Lee (2013). Neurotransmitters and microglial-mediated neuroinflammation. *Curr. Prot. Pept. Sci.*, 14(1), 21-32).

Открытия авторов изобретения показали, что FQSE может проникать через гематоэнцефалический барьер. Наибольшее сродство к пептиду FQSE было обнаружено в обонятельных луковицах, где его содержание было значительно выше, чем в других областях мозга. Также было обнаружено, что более высокий уровень пептида FQSE представлен в префронтальной коре, гиппокампе и гипоталамусе по сравнению с другими областями мозга.

В некоторых вариантах реализации R₁ выбран из W, F и D, R₂ выбран из D, Q и K, R₃ выбран из Q, S и T, а R₄ выбран из V и E. В таких вариантах синтетический нейромодулирующий пептид может включать любую из аминокислот, указанных выше. Таким образом, в некоторых вариантах реализации R₁ представляет собой W, R₂ представляет собой D, R₃ представляет собой Q и R₄ представляет собой V. В таких вариантах осуществления композиция может быть способна связываться с сайтом связывания бензодиазепина и нейростероидов рецептора ГАМК-А. Кроме того, композиция может связываться с сайтом связывания α - β рецептора ГАМК-А.

В некоторых вариантах реализации R₁ представляет собой F, R₂ представляет собой Q, R₃ представляет собой S и R₄ представляет собой E. В таких вариантах реализации композиция может связываться с сайтами связывания бензодиазепина и нейростероидов рецептора ГАМК-А. Также в таких вариантах осуществления композиция способна связываться с сайтом связывания α - β рецептора ГАМК-А.

В некоторых вариантах реализации R₁ представляет собой D, R₂ представляет собой K, R₃ представляет собой T и R₄ представляет собой E. В таких вариантах реализации композиция может быть способна связываться с сайтом связывания бензодиазепина и нейростероидов рецептора ГАМК-А. Также в таких вариантах осуществления композиция может связываться с сайтом связывания α - β рецептора ГАМК-А.

Значение изоэлектрической точки (pI) нейромодулирующего пептида в соответствии с любым из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, составляет менее 6. В некоторых вариантах реализации значение изоэлектрической точки нейромодулирующего пептида находится в примерном диапазоне от 3,5 до 4,5. В дополнительных вариантах реализации значение изоэлектрической точки нейромодулирующего пептида составляет от примерно 3,3 до 4,2.

Нейромодулирующий пептид в соответствии с настоящим открытием может быть в форме фармацевтической композиции. Композицию можно вводить субъекту, нуждающемуся в лечении, например субъекту, у которого диагностировано расстройство, проявляющееся в депрессии и/или тревоге.

В некоторых вариантах реализации пептид или более чем один пептид в соответствии с настоящим изобретением может быть включен в качестве активного ингредиента в пищевой продукт. В этих вариантах осуществления пептид может быть включен в композицию, которая представляет собой пищевой продукт. Пищевая композиция может включать любые неактивные ингредиенты. Кроме того, пищевая композиция может включать, помимо пептида(ов) в соответствии с настоящим описанием, другие активные ингредиенты, которые не влияют на эффективность пептида.

В некоторых вариантах реализации пептид в соответствии с настоящим изобретением является активным ингредиентом композиции. В других вариантах реализации активный ингредиент композиции представляет собой аналог пептида, который может быть аналогом с модифицированным N-концом или аналогом с модифицированным C-концом. Пептид в соответствии с настоящим изобретением необяза-

тельно химически модифицирован. В некоторых вариантах осуществления химическая модификация выбрана из амидирования, метилирования и ацетилирования одного или нескольких R из R₁, R₂, R₃ и R₄, как описано в данном документе для формулы I. В других вариантах реализации могут быть выполнены другие различные типы модификаций пептидного остова и/или боковой цепи. В некоторых вариантах реализации химические модификации могут включать добавление формила, пироглутамила (pGlu), одной или нескольких жирных кислот, мочевины, карбамата, сульфонида, алкиламина или любой их комбинации.

Например, в некоторых вариантах реализации пептид может быть "псевдопептидом", где обычная пептидная связь (CO-NH) заменена одним из изостерических или изоэлектронных аналогов. Например, восстановленный амид (CH₂-NH) может быть изостерически введен в пептид. В некоторых вариантах реализации пептид может быть получен в форме азапептида, где α-углерод пептидного остова заменен на азот (без изменения аминокислотных остатков). В качестве дополнительного примера химической модификации синтетический нейромодулирующий пептид в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой ретро-инверсный пептид, в котором D-аминокислота используется в обратной последовательности. В качестве еще одного примера, в некоторых вариантах осуществления синтетический нейромодулирующий пептид в соответствии с настоящим открытием может быть пептидомиметиком, боковые цепи которого присоединены к атому азота основной цепи пептида, а не к α-атомам углерода. Таким образом, синтетический нейромодулирующий пептид в некоторых вариантах реализации может быть пептоидом или поли-N-замещенным глицином.

В некоторых вариантах реализации синтетический нейромодулирующий пептид может быть опционально модифицирован путем включения неприродных аминокислот в определенные положения в пептиде. Неисчерпывающий список примеров неприродных аминокислот включает D-аминокислоты, N-метилированные (или N-алкилированные) аминокислоты, альфа-замещенные альфа-аминокислоты, бета-замещенные альфа-аминокислоты, бета-аминокислоты, и гамма-аминокислоты.

В некоторых вариантах реализации синтетический нейромодулирующий пептид может быть модифицирован циклизацией пептида. В некоторых вариантах осуществления синтетический нейромодулирующий пептид может быть модифицирован так, что пептид структурно представляет собой миметик бета-поворота. В некоторых вариантах реализации фенилаланин (F) в пептиде, если он присутствует, может быть заменен нитро-, амино-, фторфенилаланином или другими ингибиторами протеаз.

В некоторых вариантах реализации композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах реализации композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит средство доставки. Носитель для доставки может быть выбран из липосом, наночастиц и полисахаридов. В некоторых вариантах реализации полисахарид может быть выбран из циклодекстрина, хитозана, целлюлозы и альгината.

Композиция в соответствии с настоящим изобретением может быть составлена для различных путей введения. Неисчерпывающий список способов введения включает ингаляционный, интраназальный, пероральный, внутривенный, внутримышечный и подкожный методы введения.

В некоторых вариантах реализации композиция составлена для интраназального введения. Композиция, составленная для интраназального введения, может включать по меньшей мере один ингибитор протеаз слизистой оболочки носа. Неисчерпывающий список примеров ингибиторов включает одно или несколько соединений, выбранных из бестатина, комостатамилазы, лейпептина, апротинина, бацитрацина, амастатина, боролейцина, пуромидина, соли желчных кислот и фузидовой кислоты (например, этилендиаминтетраацетат динатрия). Интраназальная доставка представляет собой неинвазивный способ введения терапевтических пептидов и обеспечивает альтернативу внутривенным или подкожным инъекциям.

В некоторых вариантах реализации композиция составлена для введения путем ингаляции. В некоторых вариантах реализации композиция, составленная для введения путем ингаляции, может вводиться с использованием устройства для интраназального введения сухого порошка.

В некоторых вариантах реализации композиция составлена для внутривенного введения.

В некоторых вариантах реализации композиция модулирует рецептор гамма-аминомасляной кислоты A (ГАМК-A).

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция представлена в соответствии с любым из вариантов реализации или любой комбинацией вариантов реализации, описанных в данном документе, фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество композиции и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, растворитель или наполнитель. Для растворения композиции среди других возможных растворителей можно использовать физиологический раствор, карбонатный или бикарбонатный буферы.

В некоторых вариантах реализации предложен способ модуляции рецептора гамма-аминомасляной кислоты A (ГАМК-A) в клетке. Способ включает приведение клетки в контакт с композицией в соответствии с любым из вариантов осуществления или любой комбинацией вариантов осуществления, описан-

ных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации предлагается способ лечения аффективных расстройств пациента, который в этом нуждается. Способ включает введение терапевтически эффективного количества композиции в соответствии с любым из воплощений или любой комбинацией воплощений, описанных в данном документе, пациенту, нуждающемуся в этом. Аффективное расстройство может быть депрессией. В некоторых вариантах реализации депрессия может представлять собой детскую депрессию или подростковую депрессию. В некоторых вариантах реализации депрессия может быть выбрана из большого депрессивного расстройства, дистимии, прорывной депрессии (депрессии с возвращением симптоматики при приеме антидепрессантов), рефрактерной к лечению депрессии, депрессии, связанной с болезнью Паркинсона, депрессии, связанной с посттравматическим стрессовым расстройством, послеродовой депрессии, биполярной депрессии. В некоторых вариантах аффективное расстройство может быть расстройством, связанным со стрессом.

В некоторых вариантах реализации аффективное расстройство представляет собой тревожное расстройство. В некоторых вариантах реализации тревожное расстройство представляет собой тревогу у детей или подростковую тревогу. Тревожное расстройство может быть тревожным расстройством, вызванным разлукой, избирательным мутизмом, специфической фобией (СФ), социальным тревожным расстройством (СТР), паническим расстройством, агорафобией, тревожным расстройством, вызванным употреблением веществ/лекарств, и тревожными расстройствами, вызванными другим состояниями, генерализованным тревожным расстройством (ГТР), посттравматическим стрессовым расстройством (ПТСР), большим депрессивным расстройством (БДР), рефрактерной депрессии (ТРД), послеродовой депрессии (ПРД), биполярным расстройством или биполярной депрессией, обсессивно-компульсивным расстройством (ОКР), синдромом дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), социальной фобией, возбудимостью и агрессией при болезни Альцгеймера и обсессивно-компульсивном расстройстве. В некоторых вариантах реализации аффективное расстройство представляет собой посттравматическое стрессовое расстройство. В некоторых вариантах реализации аффективное расстройство представляет собой тревожное расстройство.

В некоторых вариантах реализации предоставлен способ лечения аффективных расстройств в соответствии с любым из вариантов осуществления или любой комбинацией вариантов осуществления, описанных в данном документе, способ дополнительно включает введение антидепрессанта. Антидепрессант необязательно выбран из группы, состоящей из ингибиторов обратного захвата серотонина, селективных ингибиторов обратного захвата норэпинефрина, СИОЗС/СИОЗСН комбинированного действия, антагонистов/ингибиторов обратного захвата серотонина-2, антидепрессантов с антагонизмом альфа-2+ антагонизмом серотонина-2 и серотонина-3, антидепрессантов с ингибированием обратного захвата серотонина/норэпинефрина/дофамина, антидепрессантов с ингибированием обратного захвата норэпинефрина и дофамина, антагониста 5-HT₁ альфа, антагониста 5-HT₁ бета, агонистов рецептора 5-HT_{1A}, агонистов и антагонистов рецептора 5-HT_{1A}, антагонистов рецептора 5-HT₂, виллоксазина гидрохлорида, дегидроэпиандостерона, антагонистов рецептора NMDA, потенциаторов рецептора АМРА, антагонистов субстанции P/антагонистов рецептора нейрокинина-1, неспецифических антагонистов субстанции P, антагонистов нейрокинина 2, антагонистов нейрокинина 3, антагонистов рецепторов кортикотропин-релизинг-фактора, антиглюкокортикоидных препаратов, антагонистов глюкокортикоидных рецепторов, агентов, блокирующих кортизол, ингибиторов синтеза оксида азота, ингибиторов фосфодиэстеразы, ингибиторов энкефалиназы, агонистов рецептора ГАМК-A, агентов, улавливающих свободные радикалы, атипичных MAOI, селективных MAOI ингибиторов, гормонов, фолиновой кислоты, лейковорина, трамадола и триптофана в комбинации с антипсихотическим лекарственным средством, при этом указанное антипсихотическое лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из атипичного антипсихотического препарата и стабилизатора дофаминовой системы.

В некоторых вариантах реализации представлен способ лечения аффективного расстройства в соответствии с любым из вариантов реализации или любой комбинацией вариантов реализации, описанных в данном документе, способ дополнительно включает введение дополнительного препарата от депрессии, необязательно выбранного из одного или нескольких дополнительных агентов.

В некоторых вариантах осуществления описанное изобретение определяет настоящие композиции и способы, которые дополнительно включают дополнительный агент и способы введения дополнительного агента субъекту. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к совместному введению и/или совместному составлению. Любая из описанных здесь композиций может быть составлена совместно и/или совместно введена.

В вариантах реализации изобретения дополнительный агент представляет собой один или несколько препаратов из: CУMBALTA пероральный, LEXAPRO пероральный, EFFEXOR XR пероральный, ZOLOFT пероральный, CELEXA пероральный, TRAZODONE пероральный, PROZAC пероральный, WELLBUTRIN XL пероральный, CITALOPRAM пероральный, PRISTIQ пероральный, AMITRIPTYLINE пероральный, SAVELLA пероральный, VIIBRYD пероральный, PAXIL CR пероральный, WELLBUTRIN пероральный, PAXIL пероральный, SERTRALINE пероральный, REMERON пероральный, NORTRIPTYLINE пероральный, VENLAFAXINE пероральный, FLUOXETINE пероральный, BU-

PROPRION HCL пероральный, MIRTAZAPINE пероральный, RITALIN пероральный, PAROXETINE пероральный, WELLBUTRIN SR пероральный, DOXEPIN пероральный, METHYLPIPIRIDATE пероральный, SYMBYAX пероральный, ESCITALOPRAM OXALATE пероральный, PAMELOR пероральный, IMIPRAMINE пероральный, BRINTELLIX пероральный, DULOXETINE пероральный, NARDIL пероральный, FETZIMA пероральный, EMSAM TRANSDERMAL, PARNATE пероральный, PEHEVA пероральный, BRISDELLE пероральный, CLOMIPRAMINE пероральный, ANAFRANIL пероральный, TOFRANIL пероральный, FLUVOXAMINE пероральный, ZYBAN пероральный, DESIPRAMINE пероральный, SARAFEM пероральный, PROZAC WEEKLY пероральный, APLENZIN пероральный, METHYLIN пероральный, NEFAZODONE пероральный, QUILLIVANT XR пероральный, TOFRANIL-PM пероральный, NORPRAMIN пероральный, REMERON SOLTAB пероральный, BUPROPION HBR пероральный, OLEPTRO ER пероральный, DESVENLAFAXINE SUCCINATE пероральный, BUPROBAN пероральный, IMIPRAMINE PAMOATE пероральный, VILAZODONE пероральный, MILNACIPRAN пероральный, PAROXETINE MESYLATE пероральный, SURMONTIL пероральный, MAPROTILINE пероральный, PROTRIPTYLINE пероральный, PHENELZINE пероральный, MARPLAN пероральный, OLANZAPINE-FLUOXETINE пероральный, TRANYLCPROMINE пероральный, SELEGILINE трансдермальный, AMOXAPINE пероральный, FORFIVO XL пероральный, ISOCARBOXAZID пероральный, DESVENLAFAXINE пероральный, KHEDEZLA пероральный, LEVOMILNACIPRAN пероральный, VORTIOXETINE пероральный, and DESVENLAFAXINE FUMARATE пероральный.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения представлен способ лечения аффективного расстройства в соответствии с любым из вариантов реализации или любой комбинацией вариантов реализации, описанных в данном документе, способ дополнительно включает введение дополнительного препарата лечения тревожности, необязательно выбранного из одного или нескольких следующих агентов: из группы бензодиазепинов алпразолам (XANAX), клоназепам (KLONOPIN), диазепам (VALIUM), лоразепам (ATIVAN), оксазепам (SERAX), хлордiazепоксид (librium); из группы бета-блокаторов пропранолол (INDERAL) и атенолол (TENORMIN); из группы трициклических антидепрессантов имипрамин (TOFRANIL), дезипрамин (NORPRAMIN, PERTOFRANE), нортриптилин (AVENTYL или PAMELOR), амитриптилин (ELAVIL), доксепин (SINEQUAN или ADAPIN), кломипрамин (ANAFRANIL); из группы ингибиторов моноаминоксидазы (MAOIs) - фенелзин (NARDIL), транилципромин (PARNATE); из группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (SSRIs) - флуоксетин (PROZAC), флувоксамин (LUVOX), сертралин (ZOLOFT), пароксетин (PAXIL), эсциталопрам оксалат (LEXAPRO), циталопрам (CELEXA); из группы ингибиторов обратного захвата серотонина-нораэpineфрина (SNRIs) - венлафаксин (EFFEXOR), венлафаксин XR (EFFEXOR XR) и дулоксетин (CYMBALTA); из группы мягких транквилизаторов, такие как буспирон (BUSPAR); и противосудорожных препаратов, выбранные из вальпроата (DEPAKOTE), прегабалина (LYRICA) и габапентина (NEURONTIN).

В вариантах реализации изобретения дополнительный агент может быть объединен с пептидами в соответствии с настоящим изобретением.

В вариантах реализации настоящего изобретения композиции могут быть слиты с другими фрагментами, например, с дополнительным агентом или фрагментом для продления периода полувыведения *in vivo*. Помимо повышения стабильности, такие фрагменты могут также увеличивать растворимость молекулы, с которой они слиты. Фрагмент, который увеличивает растворимость (например, предотвращает агрегацию), может облегчить обращение с композициями и, в частности, улучшить стабильность и срок хранения. Хорошо известным примером такого фрагмента является ПЭГ (полиэтиленгликоль). Этот фрагмент особенно предусмотрен, поскольку он может использоваться как линкер, а также как солибилизирующий фрагмент. Другие примеры включают пептиды и белки или белковые домены или даже целые белки (например, GFP). В этом отношении следует отметить, что, как и ПЭГ, один фрагмент может иметь разные функции или эффекты. Например, тэг (DYKDDDDK) представляет собой пептидный фрагмент, который можно использовать в качестве метки, но из-за плотности заряда он также будет улучшать солибилизацию. Уже было продемонстрировано, что ПЭГилирование увеличивает растворимость биофармацевтических препаратов (например, Veronese and Mero (2008), The impact of PEGylation on biological therapies, *BioDrugs*; 22 (5) 315-29). Добавление пептида, полипептида, белка или тега белкового домена к представляющей интерес молекуле широко описано в данной области. Примеры включают, но не ограничиваются ими, пептиды, полученные из синуклеина (e.g., Park et al., *Protein Eng. Des. Sel.* 2004; 17:251-260), SET (метка, повышающая растворимость, Zhang et al., *Protein Expr Purif* 2004; 36:207-216), тиоредоксин (TRX), Глутатион-S-трансфераза (GST), белок, связывающий мальтозу (MBP), N-утилизирующее вещество (NusA), небольшой убиквитиноподобный модификатор (SUMO), убиквитин (Ub), дисульфидная связь C (DsbC), 17-килодальтоновый протеин (Skp), Фрагмент протеинкиназы фага T7 (T7PK), B1 домена белка G, Повторяющийся домен ZZ IgG белка A, и связывающий домен бактериального иммуноглобулина (Hurt et al., *J Biol Chem*; 287(7):4462-9, 2012). Природа метки будет зависеть от применения, которое будет определять специалист. Например, для трансгенной экспрессии описанных здесь молекул можно предусмотреть слияние молекул с более крупным доменом для предотвращения преждевременной деградации клеточными механизмами. Другие применения могут предусматривать

слияние с меньшей солубилизирующей меткой (например, менее 30 аминокислот, или менее 20 аминокислот, или даже менее 10 аминокислот), чтобы не слишком сильно изменять свойства молекул. Дополнительные химические модификации могут включать добавление формила, пироглутамила (pGlu), одной или нескольких жирных кислот, мочевины, карбамата, сульфонида, алкиламина или любой их комбинации.

Помимо увеличения периода полувыведения, настоящие композиции могут быть слиты с фрагментами, которые изменяют другие или дополнительные фармакокинетические и фармакодинамические свойства. Например, известно, что слияние с альбумином (например, сывороточным альбумином человека), альбумин-связывающим доменом или синтетическим альбумин-связывающим пептидом улучшает фармакокинетику и фармакодинамику различных терапевтических белков. (Langenheim & Chen (2009). Improving the pharmacokinetics/pharmacodynamics of prolactin, GH, and their antagonists by fusion to a synthetic albumin-binding peptide. *J. Endocrinol.*, 203(3): 375). Другой часто используемый фрагмент представляет собой фрагмент кристаллизующейся области (Fc) антитела. Природу этих слияний может определить специалист в данной области в зависимости от области применения.

В некоторых вариантах реализации пептиды данного открытия можно вводить как самостоятельный фармацевтический агент или в комбинации с одним или несколькими другими фармацевтическими агентами, где комбинация не вызывает неприемлемых побочных эффектов.

Количество активного компонента, вводимого при лечении одного или нескольких состояний, может варьироваться в зависимости от таких условий, как конкретный пептид и применяемая единица дозировки, способ введения, период лечения, возраст, вес, пол пациента, который проходит лечение, а также характер и степень заболевания. Композиция в соответствии с настоящим изобретением может вводиться субъекту в соответствующей дозе определенным путем.

В некоторых вариантах реализации доза пептида, которую необходимо вводить, обычно будет находиться в диапазоне от примерно 0,001 мг/кг до примерно 200 мг/кг веса тела, от примерно 0,01 мг/кг до примерно 100 мг/кг веса тела, от примерно 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг веса тела, от примерно 0,01 мг/кг до примерно 40 мг/кг веса тела, от примерно 0,01 мг/кг до примерно 30 мг/кг веса тела, от примерно 0,01 мг/кг до примерно 20 мг/кг веса тела, от примерно 0,01 мг/кг до примерно 10 мг/кг веса тела, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 0,1 мг/кг до примерно 20 мг/кг массы тела, от около 0,1 мг/кг до около 30 мг/кг массы тела, от около 0,1 мг/кг до около 40 мг/кг массы тела, от около 0,1 мг/кг до примерно 50 мг/кг веса тела. Клинически подходящие схемы дозирования варьируются от одного до трех раз в день. Фармацевтическая композиция с нейромодулирующими пептидами, описанными в данном документе, также может вводиться в виде однократной дозы. Из-за безопасности и эффективности композиции разовая доза композиции может быть эффективной для облегчения симптомов, связанных с депрессией или тревогой. График лечения также может быть разработан для более длительного курса лечения. Например, в некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция в соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения может вводиться в течение более одного дня, например, от 2 дней до 60 дней, или от 2 дней до 50 дней, или от 2 дней до 40 дней или от 2 дней до 30 дней, а суточная доза может находиться в любом из вышеуказанных диапазонов. Введение более одного дня можно использовать для лечения хронических симптомов или расстройств, которые могут быть любыми из различных психических, поведенческих, аффективных, невротических и аффективных расстройств, включая депрессию, тревогу и расстройства, связанные со стрессом.

"Субъект" - это млекопитающее, например человек (например, женщина или мужчина), мышь, крыса, морская свинка, собака, кошка, лошадь, корова, свинья или примат, такой как обезьяна, шимпанзе, бабуин или резус, а термины "субъект" и "пациент" используются здесь взаимозаменяемо.

Описанные здесь пептиды можно вводить в форме спреев, например интраназальных спреев.

Изобретение также обеспечивает наборы, которые могут упростить введение любого агента, описанного в данном документе. Иллюстративный набор по изобретению включает любую композицию, описанную в данном документе, в стандартной лекарственной форме. В одном варианте осуществления стандартная лекарственная форма представляет собой контейнер, такой как предварительно заполненный шприц, который может быть стерильным, содержащий любой агент, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, наполнитель или наполнитель. Набор может дополнительно содержать этикетку или напечатанные инструкции, инструктирующие использование любого агента, описанного в данном документе. В набор также может входить расширитель век, анестетик для местного применения и очищающее средство для места введения. Набор также может дополнительно включать один или несколько дополнительных агентов, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления набор включает контейнер, содержащий эффективное количество композиции по настоящему изобретению и эффективное количество другой композиции, такой как описанная здесь.

Изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами.

Примеры

Пример 1. Вычислительный дизайн пептидов.

Набор пептидов из гидролизата коровьего молока был разделен на 5 категорий и преобразован при

помощи компьютера в набор всех возможных тетрапептидов с помощью скользящего окна с размером шага в 1 аминокислоту. Всего был получен 341 уникальный тетрапептид. Для каждого пептида был применен алгоритм 3D стыковки (докинга), чтобы подогнать пептид к сайту связывания бензодиазепинов (БЗД) на рецепторах ГАМК-А и к сайту между альфа- и бета-субъединицами рецептора ГАМК-А, что привело определению до 20 возможных конформаций пептида. Всего было создано 5650 уникальных положений пептида. Все позиции были объединены, и была рассчитана частота, с которой атом определенного типа (ароматический углерод, донор/акцептор водородной связи и т.д.) находится в заданной области. Каждую конформацию взвешивали согласно карте пространственной плотности и нормировали на количество атомов и остатков. Сайт стыковки был выбран больше, чем сайт БЗД, и, таким образом, чтобы облегчить оценку результатов, пептидам больше, чем сайт БЗД, была присвоена оценка 0,0. Все обычные взаимодействия (такие как электростатика, водородные связи и т.д.) были учтены на этапе стыковки/подгонки. Кроме того, на основании их оценок были предварительно отобраны 100 тетрапептидов.

Пример 2. Выбор четырех пептидов для тестирования.

2.1. Цель исследования.

Выявить те тетрапептиды, которые будут иметь максимальное сродство к бензодиазепиновому сайту рецептора ГАМК-А среди данных пептидов, с помощью вычислительных методов.

2.2. Результаты.

Данный набор пептидов из гидролизата коровьего молока, разделенный на 5 категорий, был преобразован в набор тетрапептидов. Все возможные тетрапептиды были получены из каждого пептида с помощью скользящего окна с размером шага в 1 аминокислоту. Всего был получен 341 уникальный тетрапептид.

Каждый пептид был модифицирован следующим образом: ацетильная "пробка" была добавлена к N-концу, а метильная - к C-концу.

Для каждого пептида проводили стыковку с сайтом БЗД рецептора ГАМК-А, генерируя до 20 конформаций. Всего было получено 5650 уникальных положений пептидов. В дальнейшем все результаты были объединены и проанализирована частота, с которой атом этого типа (ароматический углерод, донор/акцептор водородной связи и т.д.) попадает в заданную область. Каждую конформацию взвешивали в соответствии с этой картой пространственной плотности и нормировали на количество атомов и остатков. Таким образом, был проведен своего рода статистический анализ. Поскольку стыковочная ячейка, по общему признанию, была больше, чем сайт БЗД, для облегчения оценки результата пептиды, вышедшие за пределы сайта БЗД, присваиваются с использованием оценочной отметки 0,0. Учет обычных взаимодействий (таких как электростатика, водородные связи и др.) в явном виде происходит на этапе стыковки.

Таким образом, было получено около 100 результатов со значением функции оценки $\geq 0,7$:

Краткое название/ Название позиции/ Оценка

YLQY YLQY_out_model16.pdb	1.00
YQLY YQLY_out_model9.pdb	0.99
YQLY YQLY_out_model11.pdb	0.94
YLQY YLQY_out_model5.pdb	0.93
YLEQ YLEQ_out_model10.pdb	0.92

048019

QYLY QYLY_out_model10.pdb	0.92
YLKY YLKY_out_model9.pdb	0.90
YLKY YLKY_out_model19.pdb	0.89
YLKT YLKT_out_model4.pdb	0.89
YQLY YQLY_out_model3.pdb	0.86
FLLY FLLY_out_model10.pdb	0.86
YQLY YQLY_out_model20.pdb	0.86
YQKF YQKF_out_model2.pdb	0.86
YLQY YLQY_out_model4.pdb	0.85
YLKY YLKY_out_model6.pdb	0.84
LYQE LYQE_out_model8.pdb	0.84
FQSE FQSE_out_model5.pdb	0.84
FLLY FLLY_out_model7.pdb	0.83
QYLY QYLY_out_model11.pdb	0.82
FYQK FYQK_out_model5.pdb	0.82
LYQE LYQE_out_model2.pdb	0.82
FLLY FLLY_out_model11.pdb	0.81
YLGY YLGY_out_model15.pdb	0.81
YLQY YLQY_out_model12.pdb	0.80
PFTE PFTE_out_model11.pdb	0.80
WDQV WDQV_out_model11.pdb	0.80
PEVF PEVF_out_model16.pdb	0.80
FLLY FLLY_out_model13.pdb	0.80
YLQY YLQY_out_model13.pdb	0.79
LSRY LSRY_out_model12.pdb	0.79
LLRF LLRF_out_model2.pdb	0.79
WDQV WDQV_out_model15.pdb	0.79
MPLW MPLW_out_model17.pdb	0.79
KYQF KYQF_out_model10.pdb	0.79
YLKY YLKY_out_model7.pdb	0.78
YLKT YLKT_out_model5.pdb	0.78
FYQK FYQK_out_model13.pdb	0.78
YQLY YQLY_out_model7.pdb	0.78
YQKF YQKF_out_model14.pdb	0.78
LLRF LLRF_out_model5.pdb	0.78

KYQF KYQF_out_model16.pdb	0.78
YQKF YQKF_out_model3.pdb	0.77
YLQY YLQY_out_model18.pdb	0.77
QYLY QYLY_out_model17.pdb	0.77
YQLY YQLY_out_model8.pdb	0.77
YQFL YQFL_out_model8.pdb	0.77
FFVA FFVA_out_model6.pdb	0.77
KTVY KTVY_out_model18.pdb	0.77
YQLY YQLY_out_model13.pdb	0.76
KYQF KYQF_out_model11.pdb	0.76
FSDI FSDI_out_model14.pdb	0.76
FFVA FFVA_out_model5.pdb	0.76
YLKY YLKY_out_model13.pdb	0.75
FFVA FFVA_out_model7.pdb	0.75
SFSD SFSD_out_model14.pdb	0.75
FLLY FLLY_out_model8.pdb	0.75
FFVA FFVA_out_model12.pdb	0.75
LLYQ LLYQ_out_model5.pdb	0.75
DKTE DKTE_out_model20.pdb	0.74
LLYQ LLYQ_out_model6.pdb	0.74
QYLY QYLY_out_model8.pdb	0.74
YYVP YYVP_out_model13.pdb	0.73
YQKF YQKF_out_model13.pdb	0.73
LSRY LSRY_out_model9.pdb	0.73
YQLY YQLY_out_model19.pdb	0.73
YLKT YLKT_out_model14.pdb	0.73
FTES FTES_out_model15.pdb	0.73
LSRY LSRY_out_model4.pdb	0.73
GTQY GTQY_out_model13.pdb	0.73
PEVF PEVF_out_model7.pdb	0.72
FLGA FLGA_out_model7.pdb	0.71
YTDA YTDA_out_model10.pdb	0.71
YPSY YPSY_out_model18.pdb	0.71
KTVY KTVY_out_model2.pdb	0.71
YPSY YPSY_out_model19.pdb	0.71
FTES FTES_out_model12.pdb	0.71
FPKY FPKY_out_model9.pdb	0.71
QYLY QYLY_out_model18.pdb	0.70

Можно оценить попадание отдельных тетрапептидов в список лучших результатов. Поскольку большинство пептидов линейно расположены на поверхности белков, можно определить направление по отношению к сайту БЗД. Ниже F означает "вперед" - N-конец пептида расположен в сайте БЗД или в непосредственной близости от него. R означает "обратный" - C-конец пептида расположен в сайте БЗД - в этих случаях пептидную последовательность следует рассматривать от C-конца до N-конца. Пептиды, содержащие только конформер R, не являются пептидами из предоставленного списка:

YQLY 8 F/R
YLQY 6 F/R
YLKY 5 F/R
QYLY 5 F/R
FLLY 5 F/R
YQKF 4 F
FFVA 4 F
YLKT 3 F
KYQF 3 R
LSRY 3 R
FTES 2 F
PEVF 2 R
YPSY 2 F/R
LYQE 2 F
LLRF 2 R
KTVY 2 R
FYQK 2 F
WDQV 2 F
LLYQ 2 F
DKTE 1 F
YTDA 1 F
FQSE 1 F
FSDI 1 F
PFTE 1 F
MPLW 1 R
GTQY 1 R
SFSD 1 F
YQFL 1 F
FLGA 1 F
YLEQ 1 F
YLGY 1 R
YYVP 1 F
FPKY 1 R

Лучшие находки довольно равномерно расположены на сайте БЗД.

2.3. Заключение.

При оценке наиболее подходящих вариантов, были обнаружены тетрапептиды известного пептида YLGYLEQLLR. Однако были обнаружены и другие пептиды, которые существенно отличаются от пептидов по последовательности, но незначительно отличаются по значению оценочной функции. Для дальнейшей экспериментальной проверки были выбраны следующие исходные пептиды: FQSE, WDQV, DKTE, а для отрицательного контроля - FLPY.

Кроме того, использовались вычислительные методы, чтобы проверить, может ли пептид FQSE иметь сродство к нейростероидному сайту ГАМК-А.

Тетрапептид FQSE первоначально был идентифицирован посредством высокопроизводительной комбинаторной стыковки всех возможных тетрапептидов во внеклеточный домен рецептора ГАМК-А. Было обнаружено, что предпочтительным карманом связывания для этого пептида является сайт БЗД. Затем режимы связывания FQSE были независимо проверены во время контрольной стыковки с полной моделью рецептора ГАМК-А с включением его скрытых в мембране альфа-спиральных доменов. Этот запуск продемонстрировал высокое предпочтение FQSE по сравнению с сайтом связывания нейросте-

роидов ГАМК-А со всеми лучшими совпадениями из 20 независимых реплик, расположенных в нем.

Эти эксперименты демонстрируют, что пептид FQSE связывает рецептор ГАМК-А в двух областях: основной способ связывания соответствует сайту нейростероида, а второстепенный - сайту БЗД.

Пример 3. Оценка влияния выбранных пептидов и других тестируемых веществ на поведение Данио-рерио (*Danio rerio*).

Целью исследования была разработка стандартного протокола для оценки нейротропной активности новых нейромодулирующих пептидов путем анализа эффектов психоактивных агентов на поведение Данио рерио (*Danio rerio*). В частности, оценивалось влияние однократной инъекции таких антидепрессантов и анксиолитиков, как флувоксамин и диазепам, на скототаксис, двигательную активность, исследовательские реакции и социальное поведение.

3.1. Материалы и методы.

3.1.1. Содержание животных.

Рыбы содержались в проточной системе ZebTEC при температуре 28°C, pH 6,8-7,5, осмотичностью 550-700 мосмоль/л, со световым режимом 12/12, постоянной аэрацией. Кормление осуществлялось два раза в день специальным кормом для рыб. Во время эксперимента: кормление осуществлялось вечером накануне эксперимента и вечером в день эксперимента после его проведения. Все процедуры с животными проводились в соответствии с европейскими (Директива 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях) и российскими ("Рекомендации ГОСТ 33216-2014") рекомендациями по содержанию и уходу за лабораторными животными.

3.1.2. Вещества, их дозы и способ введение.

Диазепам.

Диазепам (diaz, бензодиазепиновый анксиолитик) действует, связываясь с бензодиазепиновыми сайтами ГАМК-А рецепторов (G_A каналов), пролонгируя их открытое состояние, за счет этого, предполагается, что низкие дозы обладают анксиолитическим действием, а высокие - мощным седативным эффектом. Использовали дозы 1,25, 5, 10 мг/кг.

Флувоксамин.

Флувоксамин (fluv, антидепрессант группы селективных ингибиторов захвата серотонина - СИОЗС) использовали в дозах 5, 10 мг/кг.

Бета-казоморфин-7 (BCM-7).

BCM-7 коровьего молока (H-YFPFGPI-OH; IUPAC: L-tyrosyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-glycyl-L-prolyl-L-isoleucine) - фрагмент бета-казеина молока. Известно, что данный пептид обладает опиоидной активностью (есть данные об анальгетической и анксиолитической активности данного пептида), преимущественно действуя через мю-опиоидные рецепторы (Kaminski S., et al. (2007) Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J. Appl. Genet.* 48:189-198). Использовалась доза 5 мг/кг.

Альфа-казозепин-10 (ACZ-10).

ACZ-10 - фрагмент альфа-казеина молока. По данным Miclo с соавторами (Miclo (2001) Characterization of alpha-casozepine, a tryptic peptide from bovine alpha(s1)-casein with benzodiazepine-like activity. *FASEB J.* 15:1780-2) AKZ-10 обладает бензодиазепин-подобной активностью, так как благодаря особенностям трехмерной структуры способен связываться с бензодиазепиновым сайтом ГАМК-А рецепторов, и действовать подобно химическим лекарственным препаратам бензодиазепинового ряда. Использовалась доза 0,6 мг/кг.

Тетрапептиды согласно изобретению.

Были протестированы четыре выбранных тетрапептидных лиганда ГАМК-А при двух дозировка 1 и 10 мг/кг. Пептиды имели следующую первичную структуру: FQSE, DKTE, WDQV и FLPY. Среди этих веществ FQSE, DKTE и WDQV были иллюстративными тетрапептидами, тогда как FLPY был отрицательным контролем.

Введение.

Исследуемые вещества вводили рыбам внутривентрально (в/в), за 10 мин до начала тестирования, с помощью инсулинового шприца (0,5 мл, 30г). В качестве растворителя использовали физиологический раствор (0,9% NaCl). Анестезия и обездвиживание животных проводилось путем помещения в воду температурой 10°C. Рыбы контрольных групп получали в/в инъекции эквивалентного объема растворителя, также сопровождавшиеся предварительным охлаждением.

3.1.3. Оборудование.

Тест "Открытое поле" (ОП) проводили в трапециевидном аквариуме вместимостью 4 л, параметры указаны на фиг. 2. Основание, задняя и боковые стенки сделаны из матового черного пластика, а передняя стенка (меньшей длины) - из прозрачного плексигласа. Установка для теста "светло-темная камера" (СТК) состоит из трех основных частей: стартового отсека, светлого отсека, изготовленного из белого пластика и темного отсека, изготовленного из черного пластика, параметры установки указаны на фиг. 3. Освещение в данных тестах яркое, обеспечивается лампой на подставке (светодиодная лампа PL, 11W, световой поток ≈600 Lm, около 500 Лк непосредственно над поверхностью воды), которая прикрепляется

к верхней части аквариума.

Установка для стайного поведения представляет собой контейнер из плексигласа со съемной перегородкой (фиг. 4). В малом отсеке располагали "стаю": 5 взрослых особей *Danio rerio*, в большой отсек подсаживали тестируемую рыбу. Освещение в данной установке рассеянное, обеспечивается обычным освещением комнаты (около 200 Лк).

3.1.4. Поведенческие тесты.

3.1.4.1. Тест "Открытое поле".

Тест проведен согласно Maximino et al., 2013 (Maximino, Caio, et al. (2013) Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. *Neuropharmacol.* 71: 83-97.). За 20-30 с до помещения рыбы в установку тестового аквариума включали запись видео (съемка фона). Тестируемую рыбу помещали в аквариум открытого поля (ОП) с помощью сачка. Запись проводили в течение пяти минут. Обработку данного теста осуществляли с помощью программы Noldus Ethovision XT. Программа регистрирует длину дистанции, пройденной животным, его скорость, количество заходов в три условные зоны аквариума: "дно", "центр" и "поверхность" (соответственно, нижняя, средняя и верхняя треть аквариума), время пребывания в этих зонах, а также латентный период захода в середину и к поверхности аквариума.

3.1.4.2. Тест "Стайное поведение".

Тест проведен согласно Parker et al., 2014 (Parker et al. (2014) The utility of zebrafish to study the mechanisms by which ethanol affects social behavior and anxiety during early brain development. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 94-100). Одновременно с помещением рыбы в установку включали камеру и осуществляли запись в течение 5 мин. Видеозаписи обрабатывали с помощью программы RealTimer (компания OpenScience). В ходе обработки записей регистрировали время пребывания и количество заходов в трех условных зонах аквариума, равных по размерам - около "стай", в середине аквариума, и около противоположной стенки.

3.1.4.3. Тест "Светло-темная камера".

Тест проведен согласно по Maximino et al, 2011. Рыбу помещали в светлый отсек светло-темной камеры (СТК) с помощью сачка, одновременно с этим включали камеру и записывали поведение в течение 5 минут. Видеозаписи обрабатывали с помощью программы RealTimer (компания OpenScience). В ходе обработки записей регистрируется время пребывания и количество заходов в светлый и темный отсек тестовой установки, а также латентный период посещения обоих компартментов

3.1.5. Анализ данных.

Данные, полученные в ходе поведенческих тестов, сохраняли в формате таблиц в программе Statistica. Статистическая обработка данных, а также построение графиков осуществлялось в программе Graph Pad Prism 6.

Оценивалась нормальность распределения полученных данных. Для сравнения показателей, распределение которых не соответствовало нормальному, применялся непараметрический критерий (тест Мана-Уитни), так как к каждому веществу записывался парный контроль, применение парного теста правомерно. Для множественных сравнений использовался непараметрический тест Краскела-Уоллеса, с множественными сравнениями с помощью теста Данна. На графиках данные показатели представлены в виде среднего, разброс - в виде стандартной ошибки среднего.

3.2. Исследование эффектов препаратов сравнения на поведение *Danio rerio*.

3.2.1. Диазепам.

В экспериментальной серии, посвященной оценке эффектов диазепама на поведение *Danio rerio*, было выявлено, что диазепам в дозах 1,25, 5 и 10 мг/кг (в/б) изменяет поведение рыб по сравнению с контрольными животными. При этом в дозе 1,25 мг/кг было выявлено статистически значимое снижение времени, проведенного в отсеке рядом со "стаей" (фиг. 1А); изменения других параметров поведения тестируемых животных обнаружено не было. Введение диазепама в дозе 5 мг/кг вызывало значительно более выраженные поведенческие эффекты: у рыб опытной группы было зарегистрировано увеличение времени, проведенного в отсеке рядом со стенкой, противоположной "стае" (фиг. 1Б), а также значимо было увеличено время в светлом отсеке СТК (фиг. 1В). Влияния диазепама на поведение *Danio rerio* в ОП выявлено не было.

В дозе 10 мг/кг диазепам вызывал увеличение количества переходов между светлым и темным отсеком в СТК (фиг. 5А), и уменьшение времени первого выхода (латентного периода) в освещенную часть светло-темной камеры (фиг. 5Б). В ОП у рыб под воздействием высокой дозы диазепама наблюдалась тенденция к снижению длины дистанции, пройденной за время тестирования (фиг. 5В).

3.2.2. Флувоксамин.

В ходе исследования эффектов флувоксамина, как в дозировке 5 мг/кг, так и в дозировке 10 мг/кг, было выявлено изменение поведения рыб опытной группы только в тесте ОП, в то время как в "стае" и СТК статистически значимых различий между опытной и контрольной группой обнаружено не было. В обеих дозах флувоксамин вызывал статистически значимое увеличение времени, проведенного у поверхности аквариума открытого поля (фиг. 6 А, Б). В дозе 5 мг/кг наблюдалось увеличение длительности

пробытия на свету примерно в 6,8 раз, в дозе 10 мг/кг - примерно в 7,2 раза.

3.2.3. Альфа-казозепин-10.

У рыб, получавших внутривбрюшинное введение АКЗ-10, наблюдалось статистически значимое снижение времени, проведенного вне стайного отсека (фиг. 7А), а также увеличение длительности пребывания у поверхности воды в тесте "открытое поле" примерно в 2 раза, по сравнению с контрольной группой (фиг. 7Б).

3.2.4. Бета-казоморфин-7 (ВСМ-7).

Как показано на фиг. 8А и 8Б, рыбы, получавшие внутривбрюшинные инъекции ВСМ-7 в дозе 5 мг/кг также продемонстрировали снижение времени, проведенного рядом с представителями своего вида в тесте "стая", по сравнению с контрольной группой, а также некоторое увеличение длины пробега (тенденция к достоверному различию по U-критерию Манна-Уитни $p \approx 0,07$).

3.2.5. Сравнение эффектов тестируемых веществ на поведение *Danio rerio*.

В проведенных экспериментах только ВСМ-7, оказал достоверный эффект на среднюю длину дистанции, пройденной подопытными животными. Данный показатель отражает общую локомоторную активность и, в некоторой степени, физическое благополучие тестируемых рыб. Но диазепам, флувоксамин и АСЗ-10 не продемонстрировали каких-либо значительных эффектов на среднее расстояние, пройденное экспериментальными *Danio rerio*. Изменения не наблюдалось ни при сравнении с соответствующим контролем, ни между последовательными контрольными группами (фиг. 9).

Описанные здесь эксперименты показывают, что диазепам, который является типичным представителем бензодиазепиновых анксиолитических препаратов, в дозе 1,25 мг/кг снижает стайный рефлекс, а в дозе 5 мг/кг снижает как стайный рефлекс, так и выраженность скототаксиса в светло-темной камере. Это указывает на снижение уровня тревожности рыб, получавших диазепам в описанных экспериментальных условиях. Диазепам в дозе 10 мг/кг, помимо анксиолитического эффекта в светло-темной камере, вызывал легкий седативный эффект, который выражался в тенденции к снижению двигательной активности в тесте "Открытое поле". Эти результаты согласуются с результатами, полученными в других исследованиях, в которых описаны аналогичные эффекты бензодиазепиновых анксиолитиков (Gebauer et al. (2011). Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99: 480 - 486; Bencan (2009). Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 94 (1): 75-80; Giacomini et al., (2016) Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced behavior. *Behav. Brain Res.* 296).

В описанных экспериментах анксиолитические и положительные нейротропные эффекты пептидов АКЗ-10 и ВСМ-7 на поведение *Danio rerio* наблюдались после однократной внутривбрюшинной инъекции. Авторы изобретения обнаружили изменения в поведении *Danio rerio*, которые указывают на то, что нейропептиды способны оказывать нейротропный эффект в спектре тревожно-депрессивных расстройств. Примечательно, что профиль эффективности АКЗ-10, который более известен как анксиолитик, больше соответствовал профилю флувоксамина, чем диазепаму. В то же время ВСМ-7 показал умеренную анксиолитическую эффективность. Эти результаты показывают, что *Danio rerio* является подходящей моделью для скрининга нейротропных эффектов новых лекарств в спектре тревожно-депрессивных расстройств, где новые лекарства не ограничиваются небольшими молекулами, но могут также включать пептиды (например, олигопептиды).

3.2.6. FQSE тетрапептид.

Пептид FQSE исследовали в дозах 1 и 10 мг/кг. В описанных экспериментах наиболее заметные изменения в поведении *Danio rerio* наблюдались при дозе 10 мг/кг. Таким образом, как показано в фиг. 10А, в тесте "Открытое поле" *Danio rerio* продемонстрировали статистически значимое увеличение времени, проведенного в верхней части аквариума (т.е. у поверхности и в центральной части, а не на дне). Этот же тест показал заметное уменьшение латентного периода покидания нижней части в опытной группе, как показано на фиг. 10Б. Этот результат показывает уменьшение тревожности *Danio rerio*, после воздействия пептида FQSE в дозе 10 мг/кг. Как наблюдалось в описанных здесь экспериментах с флувоксамином, результаты проведения теста "Открытое поле" являются хорошим индикатором активности флувоксамина. Таким образом, эффекты FQSE, наблюдаемые в тесте "Открытое поле", можно интерпретировать как свидетельство антидепрессивного эффекта FQSE.

Как показано в фиг. 11А и 11Б, при сравнении эффектов других веществ (АСЗ-10 и флувоксамин), на описанные поведенческие показатели было выявлено, что FQSE в дозе 10 мг/кг продемонстрировал большую эффективность, по сравнению с АКЗ-10 (0,6 мг/кг), который не повлиял на время, проведенное в толще воды (фиг. 11А), хотя и значимо снизил латентный период (ЛП) отхода от дна тестового аквариума. Эффективность FQSE по сравнению с флувоксамином (5мг/кг) оказалась несколько ниже: при одинаковом снижении ЛП отхода от дна (фиг. 11Б), FQSE достоверно увеличивает время, проведенное в толще воды на 35%, в то время как флувоксамин - более чем на 80%. Тем не менее, в данном тесте мы наблюдаем выраженные изменения поведения под воздействием FQSE, сходные с теми, которые индуцирует введение флувоксамина.

В тесте "светло-темная камера" (СТК) у рыб, получавших высокую дозу пептида FQSE, наблюдали как статистически значимое увеличение времени, проведенного в светлом отсеке, так и уменьшение вре-

мени, проведенного в темном (фиг. 12 А, Б). Сходный эффект был выявлен нами и у бензодиазепинового анксиолитика диазепама в дозе 5 мг/кг (фиг. 13 А, Б). Относительное увеличение времени, проведенного в светлом отсеке при введении FQSE, составило примерно 140%, по сравнению с контрольной группой, при введении диазепама (5 мг/кг) - $\approx 210\%$, снижение времени в темном отсеке в обеих группах составило примерно 40% относительно контрольной группы.

Снижение скототаксиса (стремления к затемненным пространствам) было интерпретировано нами как снижение тревожности, так как данный показатель существенно снижался под действием анксиолитика диазепама, и оставался неизменным при введении флувоксамина. Это позволяет сделать вывод, что FQSE в дозе 10 мг/кг обладает заметным анксиолитическим эффектом.

Фиг. 14А и 14Б иллюстрируют влияние FQSE на поведение *Danio rerio* в тесте стайного поведения. Было показано, что под воздействием FQSE (10 мг/кг) у рыб уменьшается латентный период отхода от сектора со "стаей", а также наблюдается заметная тенденция к увеличению времени, проведенного вне стайного отсека ($p=0,054$ по критерию Манна-Уитни).

Фиг. 15А и 15Б иллюстрируют сравнение эффектов диазепама, BCM-7 и пептида FQSE на поведение *Danio rerio* в тесте стайного поведения. Снижение латентного периода отхода от "стаи", вызванного FQSE в дозе 10 мг/кг заметно слабее, чем у диазепама в дозах 1,25 и 5 мг/кг, и находится примерно на таком же уровне, как у BCM-7, который так же не продемонстрировал статистически значимого эффекта на время вне стайного отсека (фиг. 15Б). Как было отмечено ранее, у FQSE наблюдается увеличение времени вне стаи только на уровне тенденции, в то время как под воздействием диазепама в дозе 1,25 мг/кг оно статистически значимо увеличивается примерно в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой (фиг. 15А). Стайный рефлекс интерпретируется как защитный, свидетельствующий о повышенной тревожности в присутствии естественных врагов, при химических анксиогенных веществах или в новой обстановке. Диазепам оказывает уверенное анксиолитическое действие в данном тесте, снижая латентный период отхода от стаи (рыба быстро адаптируется и свободно плавает далеко от своих сородичей), а также увеличивая время, проведенное вне стайного отсека.

Фиг. 16А, 16Б, 17А и 17Б иллюстрируют сравнение эффектов пептида FQSE и флувоксамина на поведение *Danio rerio* в тесте "открытое поле". В дозе 1 мг/кг FQSE сохранил значимые поведенческие эффекты только в тесте "открытое поле", статистически значимо увеличив как время, проведенное у поверхности воды (фиг. 16А), так и латентный период выхода к поверхности (фиг. 17А). Кроме того, эффекты FQSE в малой дозе сопоставимы с таковыми для флувоксамина в дозе 10 мг/кг (фиг. 16Б и 17Б). Т.е. в дозе 1 мг/кг FQSE проявляет подобный антидепрессантному эффект.

Фиг. 18 иллюстрирует среднюю длину трека в тесте "Открытое поле" в группах *Danio rerio*, которым вводили исследуемые вещества: диазепам в дозах 1,25 мг/кг ("diazepam 1,25"), 5 мг/кг ("diazepam 5") и 10 мг/кг ("diazepam 10") и соответствующих контрольных группах ("Контроль-diaz 1,25", "Контроль-diaz 5", "Контроль-diaz 10"); флувоксамин в дозах 5 мг/кг ("fluvoxamine 5") и 10 мг/кг ("fluvoxamine 10") и соответствующих контрольных группах ("Контр-fluv 5" и "Контр-fluv 10"); ACZ-10 в дозе 0,6 мг/кг ("ACZ-10 0,6") и соответствующей контрольной группе ("Контр-AKZ-10 0,6"); 5 мг/кг BCM-7 ("BCM-7 5") и соответствующей контрольной группе ("Контр-BCM-7 5"); тетрапептид FQSE в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг ("FQSE 1" и "FQSE 10" соответственно) и соответствующих контрольных группах ("Контр-FQSE 1" и "Контр-FQSE 10"). На фиг. 18 показано, что в дозе 1 мг/кг, а также в дозе 10 мг/кг FQSE не оказал существенного влияния на двигательную активность *Danio rerio*, что проявляется в отсутствии изменений длины пройденного пути в тесте ОП.

Эти эксперименты показывают, что пептид FQSE оказывает комплексное анксиолитическое и антидепрессивное действие на поведение *Danio rerio*. Анксиолитический эффект FQSE был продемонстрирован в тесте "светло-темная камера". Увеличение времени нахождения в светлом отсеке камеры является результатом снижения тревожности, что дополнительно подтверждается снижением стайного рефлекса. Также наблюдался антидепрессантный эффект FQSE в тесте "Открытое поле". FQSE в дозе 1 мг/кг демонстрирует выраженный антидепрессантный эффект в тесте ОП, не изменяя поведения *Danio rerio* в других тестах.

3.2.7. FLPY тетрапептид.

В описанных экспериментах тетрапептид FLPY использовали в качестве отрицательного контроля. Исследование эффектов пептида FLPY на поведение *Danio rerio* проводилось в двух дозах - 1 и 10 мг/кг. Как показано на фиг. 19А, 19Б, 19В, 20А, 20Б, и 20В, статистически значимых изменений базовых поведенческих показателей тестируемых рыб не было выявлено ни в одном из проводимых тестов, как при введении большей, так и при введении меньшей дозы тетрапептида. Это продемонстрировало отсутствие нейротропного действия пептида FLPY.

3.2.8. DKTE тетрапептид.

Эффекты пептида DKTE на поведение *Danio rerio* были изучены для двух доз DKTE - 1 и 10 мг/кг. Фиг. 21А, 21Б, и 21В иллюстрируют параметры поведения *Danio rerio* в тесте стайного поведения. Внутривенное введение тетрапептида DKTE рыбам в дозе 1 мг/кг вызвало снижение стайного рефлекса, что выражается в статистически значимом увеличении времени, проведенного рыбами опытной группы у стенки, противоположной отсеку со "стаей" (фиг. 21А), а также увеличением латентного периода подхо-

да к "стае" (фиг. 21Б). Снижение времени, проведенного в отсеке со стаей в данной группе, находится на уровне тенденции (фиг. 21В).

Фиг. 22 иллюстрирует увеличение латентного периода подхода ко дну у тестируемых рыб в тесте "Открытое поле". Как показано на фиг. 22, тест "Открытое поле" продемонстрировал, что пептид DKTE в дозе 1 мг/кг приводит к увеличению на уровне тенденции латентного периода подхода ко дну у тестируемых рыб.

Фиг. 23 иллюстрирует сравнение эффектов диазепама, пептида FQSE и пептида DKTE на поведение *Danio rerio* в тесте стайного поведения. При сравнении эффектов пептида DKTE в дозе 1 мг/кг на стайное поведение, с другими веществами, поведенческая активность которых была исследована ранее, было выявлено, что эффекты DKTE в этой дозе сопоставимы с эффектом вещества сравнения, диазепама (1,25 мг/кг) (фиг. 23). При этом влияние на стайную активность DKTE 1 мг/кг оказалась выше, чем у FQSE в дозе 10 мг/кг, у которого увеличение было только на уровне тенденции к достоверности (фиг. 23).

Однако с учетом отсутствия эффектов данного пептида в тесте "Светло-темная камера" и слабым эффектом в тесте "открытое поле", можно сделать вывод, что DKTE в дозе 1 мг/кг обладает более слабым анксиолитическим действием, по сравнению с FQSE.

Фиг. 24А и 24Б иллюстрируют параметры локомоторной активности (длина трека и средняя скорость) в тесте "Открытое поле" при введении DKTE в дозе 1 мг/кг. Показано, что DKTE в дозе 1 мг/кг не влиял на эти параметры двигательной активности.

Фиг. 25А, 25Б, и 25В иллюстрирует поведенческие параметры *Danio rerio* после введения DKTE в дозе 10 мг/кг. В частности, фиг. 25А демонстрирует время, проведенное у поверхности (в тесте "Открытое поле"), фиг. 25Б демонстрирует время, проведенное в светлом отсеке светло-темной камеры, и фиг. 25В показывает время, проведенное за пределами отсека "стаи" в тесте стайного поведения. Внутрибрюшинное введение DKTE в дозе 10 мг/кг не вызвало статистически значимого изменения основных поведенческих показателей *Danio rerio* в тестах "Открытое поле", "Светло-темная камера" и "стайное поведение". Видимо, доза 10 мг/кг находится вне эффективного диапазона концентраций для данного пептида.

Как показывают данные эксперименты, пептид DKTE в дозе 1 мг/кг демонстрирует анксиолитическую активность в тесте "стайное поведение", снижая выраженность стайного рефлекса по ряду основных показателей. Снижение времени, проведенного вне стайного отсека при воздействии DKTE в данной дозировке сопоставимо со снижением этого показателя, вызванного диазепамом в дозе 1,25 мг/кг. В тесте "открытое поле" DKTE (1 мг/кг) вызвал слабый антидепрессантный эффект, выражающийся лишь в увеличении латентного периода подхода ко дну. В дозе 10 мг/кг у DKTE не было выявлено поведенческих эффектов ни в одном из тестов.

3.2.9. WDQV тетрапептид.

Изучение влияния внутрибрюшинного введения тетрапептида WDQV рыбам *Danio rerio* проводилось в дозах 1 и 10 мг/кг. Фиг. 26А, 26Б, и 26С иллюстрируют поведенческие параметры *Danio rerio* после инъекции WDQV в дозе 1 мг/кг. В дозе 1 мг/кг не было выявлено эффектов пептида WDQV на поведение рыб в трех поведенческих тестах - "Открытое поле", "Светло-темная камера" и "Стайное поведение"

Фиг. 27А, 27Б, 27В, и 27Г иллюстрируют параметры поведения *Danio rerio* после инъекции WDQV в дозе 10 мг/кг в тесте "Светло-темная камера". Как показано на фиг. 27А и 27В, в дозе 10 мг/кг пептид WDQV оказал влияние на поведение рыб только в тесте "Светло-темная камера". Рыбы из опытной группы демонстрировали увеличение времени, проведенного в светлом отсеке СТК, как суммарно за все 5 минут тестирования, так и с третьей по пятой минуте тестирования (фиг. 27 А, В). Соответственно, под воздействием WDQV в дозе 10 мг/кг происходит и снижение времени, проведенного в темном отсеке СТК, как суммарно, так и в динамике, как показано на фиг. 27Б и 27Г.

Фиг. 28А и 28Б иллюстрируют сравнение эффектов WDQV (10 мг/кг) в тесте "Светло-темная камера" с эффектами диазепама, (5 мг/кг) и FQSE (10 мг/кг). Было обнаружено, что WDQV тетрапептид имеет сходный по направленности и выраженности анксиолитический эффект, как FQSE.

Фиг. 29 иллюстрирует среднюю длину трека в тесте "Открытое поле" в группах рыб, подвергшихся воздействию диазепама в дозе 1,25 мг/кг (Diazepam 1,25), 5 мг/кг (Diazepam 5) и 10 мг/кг (Diazepam 10) и в соответствующих контрольных группах (Контр-diaz 1,25, 5 и 10), в группах рыб, подвергшихся воздействию флувоксамина в дозе 5 мг/кг (Fluvoxamine 5) и 10 мг/кг (Fluvoxamine 10), соответствующие контрольные группы - Контр-fluv 5 и 10. В группах рыб, получавших АКЗ-10 (AKZ10 0,6), соответствующий контроль - Контр-АКЗ10; ВСМ-7 - соответственно ВСМ-7 и Контр-ВСМ-7, тетрапептид WDQV в дозе 10 мг/кг (соответственно WDQV 10) и соответствующей контрольной группы. Фиг. 29 иллюстрирует, что тетрапептид WDQV в дозе 10 мг/кг не оказывает эффекта на поведенческие параметры, в частности, не было выявлено влияния тетрапептида на двигательную активность в тесте "Открытое поле".

Эти эксперименты показывают, что тетрапептид WDQV в дозе 10 мг/кг продемонстрировал анксиолитический эффект в тесте "Светло-темная камера", сопоставимый по выраженности с бензодиазепиновым анксиолитиком диазепамом в дозе 5 мг/кг и тетрапептидом FQSE в дозе 10 мг/кг. Однако в других тестах не было показано изменения поведения *Danio rerio* под воздействием WDQV в данной дозе. Также WDQV в дозе 1 мг/кг не имел выраженных эффектов на поведение рыб. Суммируя поведенческие

эффекты WDQV, можно предположить, что он обладает положительным нейротропным эффектом, однако менее выраженным, чем у диазепама и тетрапептида FQSE, который обладал более широким спектром поведенческих эффектов.

Пример 4. Определение нейротропной активности пептида FQSE в экспериментах на мышах.

Целью этого эксперимента было выявление потенциального нейротропного эффекта различных доз пептида FQSE на поведение мышей BALB/C при остром внутрибрюшинном введении. Эффекты введения пептида FQSE на поведение мышей BALB/C сравнивали с эффектами введения диазепама. Эффекты как пептида FQSE, так и диазепама на поведение мышей оценивали с помощью теста "Открытое поле" (OF), "Приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ), "Условное оборонительное закапывание стеклянных шаров" (МВ), и "Неизбегаемое плавание по Порсольту (2-дневная модификация)" (FST). Эти тесты представляют собой методы измерения поведения, связанного со стрессом и тревогой, на животных моделях для оценки эффективности потенциальных антидепрессантов и анксиолитиков.

В экспериментах, проведенных в этом исследовании, мышей BALB/C подвергали тестам ОП, ПКЛ и МВ для определения анксиолитических эффектов диазепама и пептида FQSE на мышей. Согласно результатам, полученным в тесте ОП, тесте ПКЛ и тесте МВ, введение диазепама (внутрибрюшинно) мышам приводило к выраженному анксиолитическому эффекту. Эти результаты подтверждают, что модель на мышах является допустимой моделью для тестирования эффектов веществ, включая пептиды, которые связываются с рецептором ГАМК-А. Кроме того, в этом исследовании мышей BALB/C подвергали тесту плавания Порсолта (двухдневная модификация) для определения антидепрессантно-подобных эффектов пептида FQSE на мышей. Пептид FQSE в дозах от 1 до 20 мг/кг проявлял антидепрессантный эффект.

4.1. Материалы и методы.

4.1.1. Экспериментальные животные.

Семьдесят девять мышей-самцов BALB/C использовали в данном эксперименте. Масса тела каждого животного в начале эксперимента составляла от 18 до 20 г. Все животные были свободны от видоспецифических патогенов (статус SPF согласно списку FELASA, 2014 г.). Животные содержались в условиях свободного доступа к воде и пище. Помещение кондиционировалось (скорость обмена не менее 15 р/ч) с циклом 12ч:12ч свет-темнота (свет включается в 09:00), температура воздуха 20-24°C±2°C (возможны колебания в пределах не более 2°C в сутки), влажность 30-70%. Для исследования мышей разделили на шесть групп, и тестируемые вещества вводили группам, согласно табл. 1. С учетом разделения на группы интервал между тестами составлял один день. Все процедуры с животными проводились в соответствии с европейскими (Директива 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях) и российскими ("Руководящие принципы ГОСТ 33216-2014"). Биоэтическими рекомендациями по содержанию и уходу за лабораторными животными.

Таблица 1. Экспериментальные группы

Название группы	Кол-во животных	Тестируемое вещество	Воздействие
1. Интактный контроль	13	В/б введение растворителя по схеме введения веществ опытной группы	«Условное оборонительное закапывание
2. FQSE 1 мг/кг	13	В/б введение FQSE в дозе 1 мг/кг	стеклянных шаров», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Открытое
3 Пептид FQSE 5 мг/кг	13	В/б введение FQSE в дозе 5 мг/кг	поле», «Неизбегаемое плавание по
4. Пептид FQSE 10 мг/кг	13	В/б введение FQSE в дозе 10 мг/кг	Порсольту (двухдневная
5. Пептид FQSE 20 мг/кг	14	В/б введение FQSE в дозе 20 мг/кг	модификация)»
6. Diazepam	13	В/б введение препарата сравнения diazepam в дозе 0,5 мг/кг	

После периода адаптации испытуемое вещество вводили мышам внутрибрюшинно. Параметры поведения измеряли через 30 мин после инъекции. Тесты проводились следующим образом: 1-й день - тест

"Открытое поле" (ОП), 3-й день - тест "приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ), 5-й день - тест на закапывание шаров (МВ), 12-13 дни - тест "Неизбегаемое плавание по Порсолту" (FST) (двухдневная модификация).

4.1.2. Статистический анализ.

Статистический анализ данных выполняли с использованием непараметрических критериев (Манна-Уитни) для выборки с ненормальным распределением или с использованием одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом LSD Фишера для выборки с нормальным распределением.

4.1.3. ОП.

Установка представляет собой арену диаметром 63 см., освещенную ярким светом (500 Лк) (НПО "Открытая наука"). Регистрируемые параметры: общий пробег (в см), время движения (при скорости более 5 см/с), время неподвижности (при скорости менее 0,2 см/с), средняя и максимальная скорость, количество эпизодов двигательной активности и замирания. Такой же набор параметров, а также латентный период и длительность пребывания регистрируется для центрального сектора. Дефекации, стойки (поставка животного на задние лапы) оценивали визуально (File and Wardill (1975) Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacol.*, 44: 53-59). Тест предназначен для оценки уровня моторной и исследовательской активности.

4.1.4. ПКЛ.

Тест состоит из 2 закрытых и двух открытых лучей, расположенных напротив друг друга (длина луча 30 см), высота бортиков закрытых лучей равна 15 см. Вся установка приподнята на 70 см над уровнем пола (ООО НПК "Открытая Наука", Россия). Открытые лучи имеют яркое равномерное освещение 400 люкс, закрытые - 30-40 люкс. Животное помещают в центр лабиринта, головой к открытому лучу. В течение 5 минут программой "Ethovision", Noldus автоматически регистрируются следующие поведенческие параметры: общий пробег (в см), время движения (при скорости более 5 см/с), время неподвижности (при скорости менее 0,2 см/с), средняя и максимальная скорость, количество эпизодов подвижности и замирания. Такой же набор параметров, а также латентный период и длительность пребывания регистрируется для центрального сектора, открытого и закрытого рукавов по отдельности.

4.1.5. МВ.

Установка представляет собой стандартную клетку Т3 (19 см×29 см×13 см), которая наполняется подстилом (высота слоя - 5 см). Для теста используются стандартные стеклянные шарики Marbles (диаметр 15мм, вес 5,2 г, произвольный цвет). Шарики укладываются на поверхность равномерно, в 4 ряда, по 5 штук в каждом. Далее в установку помещается животное на 30 минут. По истечении времени животное аккуратно вынимается, подсчитывается число закопанных шариков (более чем на 2/3 диаметра).

4.1.6. FST.

В рамках данной модификации проводится 2 тестирования в течение двух дней. Установка представляет собой прозрачный сосуд, высотой 30 см, диаметром 10 см, заполненный водой (t воды +21 - +23°C) до отметки на высоте 25 см. В первый день каждое животное помещали на 10 мин в установку. Поведенческие параметры не регистрировали. На второй день животные также помещали на 5 мин в установку. Регистрировали продолжительность активного (энергичные движения всеми лапами) и пассивного (слабые гребки задними лапами) плавания, а также неподвижности (иммобилизации) (Porsolt et al. (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 229(2):327-36). После каждого тестирования мышей помещали в обогреваемую клетку до высыхания.

4.2. Изучение анксиолитического действия препаратов.

Для оценки анксиолитических эффектов исследуемого пептида в различных дозах (1, 5, 10, 20 мг/кг) были использованы следующие тесты: 1-й день "Открытое поле", 3-й день "Приподнятый крестообразный лабиринт". 5-й день "Условное оборонительное закапывание стеклянных шаров". В качестве препарата сравнения был использован "Диазепам" в дозе 0,75 мг/кг. Все вещества вводились внутривенно в объеме 10 мкл раствора на 1 г веса животного за 30 мин до поведенческого тестирования.

На животных моделях состояние тревожности определяется как конфликт оборонительной и ориентировочно-исследовательской мотиваций. Соответственно, если преобладает оборонительная мотивация, то формируется эмоциональное состояние повышенной тревожности, и, наоборот, если преобладает ориентировочно-исследовательская мотивация, то делают вывод о спокойном эмоциональном состоянии. Таким образом, анксиолитический эффект препарата может проявляться как в ослаблении оборонительной мотивации или в усилении ориентировочно-исследовательского компонента, так и в совокупном разнонаправленном влиянии на эти два эмоциональных состояния. Часто действие анксиолитиков описывают в качестве сдвига конфликта между оборонительной и ориентировочно-исследовательской мотивациями в сторону последней.

4.2.1. Оценка влияния тестируемых веществ на поведение мышей с помощью теста ОП.

В качестве первичной оценки влияния препаратов на двигательную (общая пройденная дистанция) и ориентировочно-исследовательскую (число стоек, время, проведенное в центре и число выходов из центра) активность животные были протестированы в тесте "Открытое поле". По параметру общей пройденной

дистанции для группы Диазепам ($2542,2 \pm 179,77$ см) отмечалось статистически значимое увеличение данного параметра относительно группы контроля ($1925,6 \pm 129,31$ см) (фиг. 30). Схожие показатели наблюдались и для всех 4 групп, которым вводился FQSE ($2423 \pm 133,81$; $2464 \pm 124,67$; $2441 \pm 185,97$; $2478 \pm 100,41$ см соответственно для групп: "FQSE 1 мг/кг", "FQSE 5 мг/кг", "FQSE 10 мг/кг", "FQSE 20 мг/кг").).

На фиг. 31 и 32 представлены параметры ("Количество стоек" и "Частота выхода в центр"), отражающие ориентировочно-исследовательскую активность животных. Для группы животных, которым вводился Диазепам - количество стоек ($10,8 \pm 2,1$); было значимо выше аналогичных значений для контрольной группы ($4,7 \pm 0,94$), в то время как частота выхода в центр и само время в центре не отличалось. Для групп FQSE 1 мг/кг и FQSE 10 мг/кг также отмечалось увеличение количества стоек ($11,7 \pm 2,3$ и $11,7 \pm 3,6$, соответственно) относительно контрольных значений. При этом для животных, которым вводился пептид в дозе 1 и 20 мг/кг было характерно и большее количество выходов в центр ($13,1 \pm 2,26$ и $11,6 \pm 2,5$), чем у группы контроля ($5,3 \pm 1,44$).

4.2.2. Оценка влияния тестируемых веществ на поведение мышей в тесте ПКЛ.

В тесте ПКЛ было выявлено две группы поведенческих показателей, которые характеризуют анксиолитический эффект при введении препаратов. Первая группа показателей связана с двигательной активностью животных, в нее входят: длительность "замирания" (т.е. время без движения, с), и "Общая пройденная дистанция, см". Общее увеличение двигательной активности может свидетельствовать об уменьшении пассивно-оборонительного мотивационного компонента, т.е. об анксиолитической направленности действия препарата. На фиг. 33 представлен график с общей пройденной дистанцией животных, введение препарата сравнения "Диазепам" привело к выраженному статистически значимому увеличению данного параметра относительно группы контроля и составило: $1219 \pm 91,4$ см против 960 ± 56 см. Введение пептида в дозе 1 и 20 мг/кг также увеличивало значение пройденной дистанции ($1156 \pm 48,2$ и $1290 \pm 30,5$), при этом снижая общее время замирания (фиг. 34) до $36,6 \pm 3,97$ и $30,1 \pm 3,07$ с соответственно от значений контроля ($57,7 \pm 7,05$ с).

Вторая группа показателей включает в себя такие параметры, как "Время на открытых рукавах лабиринта, с" (фиг. 35), "Число выходов на открытые рукава" (фиг. 36), "Число поведений риска" (свешивания и стойки на открытых лучах), (фиг. 37), а также производный показатель "индекс тревожности" (фиг. 38), который рассчитывается по следующей формуле:

$$ИТ = 100 * (1 - (\text{время на свету} / \text{общее время тестирования} + \text{выходы на свет} / \text{общее количество выходов}) / 2)$$

Увеличение времени, проведенного на ярко освещенных лучах лабиринта, и связанное с ним уменьшение ИТ являются классическими показателями повышения ориентировочно-исследовательской активности, снижении тревожности, т.е. также свидетельствуют об анксиолитическом действии вещества.

Исходя из полученных данных, внутривенное введение препарата "Диазепам" животным приводило к ярко выраженному анксиолитическому действию относительно параметров поведения контрольных мышей, а именно: увеличивалось время, проведенное на открытых лучах лабиринта ($67,4 \pm 18,43$ и $23 \pm 8,12$ с); число выходов на открытые лучи ($6,5 \pm 0,99$ и $3,5 \pm 0,81$); число поведений риска ($15 \pm 2,8$ и $7 \pm 2,3$), что в итоге выражалось в статистически значимом снижении "индекса тревожности" ИТ до ($73 \pm 4,7\%$) относительно ($85 \pm 3,4\%$) в контрольной группе.

Схожие результаты были получены для групп, которым вводился исследуемый пептид. По параметру "Время на открытых лучах" увеличение значений относительно группы "Контроль" наблюдалось у группы FQSE 20 мг/кг ($69,1 \pm 9,98$ с); "Число выходов на открытые лучи" и "Число поведений риска" значимо было больше у групп "FQSE 1 мг/кг" ($7,7 \pm 0,79$ и $15 \pm 2,1$), "FQSE 10 мг/кг" ($6,5 \pm 1,07$ и $15 \pm 3,2$), "FQSE 20 мг/кг" ($6,9 \pm 0,79$ и $16 \pm 2,1$). Таким образом, "индекс тревожности" для животных из данных групп также был ниже контрольных значений и составлял $72 \pm 2\%$; $72 \pm 3,8\%$ и $69 \pm 3,3\%$ для животных, которым вводился исследуемый пептид в дозе 1; 10 и 20 мг/кг соответственно.

4.2.3. Оценка влияния тестируемых веществ на поведение мышей с помощью теста MB.

Наличие в исследуемой установке блестящих стеклянных шаров воспринимается животным как раздражитель и побуждает закопать их в подстил, чтобы не иметь зрительного и тактильного контакта. Снижение числа закопанных шаров (фиг. 39) под влиянием препарата за определенный промежуток времени (30 минут) указывает на снижение тревожности животных. По полученным данным животные из группы "Контроль" в среднем закапывали $5,2 \pm 1,04$ шар, когда как животные из группы "Диазепам" закапывали значительно меньше - $1,2 \pm 0,39$ шара. Также снижение числа закопанных шаров отмечалось у групп: "FQSE 5 мг/кг" ($1,9 \pm 0,99$ шар); "FQSE 10 мг/кг" ($2,6 \pm 0,877$ шаров) и "FQSE 20 мг/кг" ($1,4 \pm 0,68$ шаров).

4.3. Оценка антидепрессантного действия исследуемых веществ.

Для оценки антидепрессантных свойств препаратов был использован тест "Неизбегаемое плавание по Порсольту", двухдневная модификация. Данный эксперимент является одним из основных методов для оценки депрессивной составляющей поведения животных и влияния на нее тестируемых препаратов.

4.3.1. "Неизбегаемое плавание по Порсольту (двухдневная модификация)" (FST).

Двухдневная модификация теста позволяет животному сперва адаптироваться к особенностям проведения эксперимента (1-й день), что позволяет на 2-й день получить более четкие и наглядные различия в поведенческих реакциях (в случае, когда они есть). По данным литературы принято считать, что чем больше значение длительности состояния иммобилизации (времени замирания), тем более депрессивным является животное. Значимое снижение времени иммобилизации под влиянием препаратов характеризует их способность проявлять антидепрессантный эффект и регулировать депрессивное состояние.

На основании данных, представленных введением препарата "Диазепам" в дозе 0,75 мг/кг не приводило к изменениям ни по одному из исследуемых в данном тесте параметров (время активного, пассивного плавания и время замирания) (фиг. 40-42). Введение исследуемого пептида FQSE (фиг. 40), напротив, приводило к снижению общего времени замирания относительно контрольных значений во всех рассмотренных дозах (142±12,7; 115±15,4; 145±16,5; 144±10,2 секунд соответственно для групп: "FQSE 1 мг/кг", "FQSE 5 мг/кг", "FQSE 10 мг/кг" и "FQSE 20 мг/кг" против 189±11,1 с для группы "Контроль"). При этом для групп "FQSE 5 мг/кг", "FQSE 10 мг/кг" и "FQSE 20 мг/кг" также отмечалось увеличение времени пассивного плавания и составляло 151±12,5; 162±12,1; 143±14,6 с, когда как контрольные значения составляли 105±11,1 с. Стоит отметить, что введение пептида в дозе 20 мг/кг статистически достоверно увеличивало и время активного плавания (животное двигает одновременно 4 конечностями) до 27±8,3 с (контрольные значения 5±2 с).

4.4. Сравнение анксиолитического и антидепрессивного эффектов тестируемых веществ.

Авторы настоящего изобретения обнаружили на основании результатов, полученных в трех различных поведенческих тестах (тест "Открытое поле", тест "Приподнятый крестообразный лабиринт" и тест "Условно оборонительное закапывание стеклянных шаров"), что внутрибрюшинное введение (однократная инъекция) пептида FQSE в дозах от 1 до 20 мг/кг за 30 мин до экспериментов приводило к выраженному анксиолитическому эффекту. Точно так же однократная внутрибрюшинная инъекция диазепама в дозе 0,75 мг/кг мышам BALB/C за 30 мин до поведенческих тестов привела к выраженному анксиолитическому эффекту.

Согласно результатам, полученным в тесте ОП, ПКЛ и МВ, введение диазепама (посредством внутрибрюшинной инъекции) мышам приводило к выраженному анксиолитическому эффекту. Эти результаты согласуются с информацией из научной литературы, которая подтверждает, что модель на мышах является допустимой моделью для тестирования эффектов лекарств, включая пептиды, которые связываются с рецептором ГАМК-А. Заключение об анксиолитическом действии препарата основывалось на следующих данных: увеличение двигательной и исследовательской активности в тесте ОП; увеличение таких параметров, как "Время на открытых рукавах", количества "Выходов на открытые рукава" и "поведение риска", а также уменьшение параметра "Индекс тревожности" в тесте ПКЛ; уменьшение количества закопанных шариков в тесте МВ. Все дозы пептидов, использованные в этом исследовании, привели к увеличению двигательной активности животных в тесте ОП. Повышение исследовательской активности (по параметру "Выходы на открытые рукава") наблюдалось для групп FQSE 1 мг/кг и FQSE 20 мг/кг. Тест ПКЛ выявил снижение параметра "Индекс тревожности" в группах FQSE 1 мг/кг, FQSE 10 мг/кг и FQSE 20 мг/кг. Таким образом, на основании результатов, полученных в трех различных поведенческих тестах, можно сделать вывод, что внутрибрюшинное введение пептида в дозах от 1 до 20 мг/кг за 30 мин до эксперимента приводит к выраженному анксиолитическому эффекту.

В экспериментах, проведенных авторами настоящего открытия, мышей BALB/C подвергали тесту FST для определения антидепрессантных эффектов диазепама и пептида FQSE на мышей. Однократная внутрибрюшинная инъекция диазепама в дозе 0,75 мг/кг мышам BALB/C не вызвала антидепрессантного эффекта. Однако, согласно результатам теста FST, однократная внутрибрюшинная инъекция пептида FQSE в дозах от 1 до 20 мг/кг показала антидепрессантный эффект. Кроме того, инъекция диазепама вызвала побочный седативный эффект, в то время как внутрибрюшинные инъекции пептида FQSE при всех уровнях доз в диапазоне от 1 до 20 мг/кг не вызвали отрицательного подавляющего действия на ЦНС.

Пример 5. Эффекты интраназального введения пептида FQSE в поведенческих тестах на тревожность и депрессию у самцов крыс Sprague Dawley.

Целью исследования являлось оценить эффективность интраназального (и/н) введения пептида FQSE в поведенческих тестах на тревожность и депрессивность на крысах.

5.1. Материалы и методы.

5.1.1. Животные.

Всего для исследований использовали 110 самцов крыс Sprague Dawley (Charles River, Wilmington, MA). Изначально крыс содержали по 3-5 особей в полипропиленовых клетках, размещенных в круглых полках (Animal Care Systems, Inc, Centennial, CO), расположенных в виварии с контролируемой температурой и влажностью, в котором поддерживали режим свет/темнота 12ч:12ч (свет включался в 6 утра). В начале эксперимента крысы весили около 250-350 г и имели возраст не менее 100 дней. Пища и вода бы-

ли доступны в неограниченном количестве на протяжении всего исследования. Все процедуры были одобрены Комитетом по институциональному уходу и использованию животных Хьюстонского Университета в соответствии с рекомендациями Национального Института Здравоохранения.

5.1.2. Используемые вещества.

Диазепам (DZ 2.0, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США, 2 мг/кг, внутривенно) и кетамин (Miller Veterinary Supply, Fort Worth, TX, 10 мг/кг, внутривенно) готовили в стерильном физиологическом растворе. Пять доз FQSE (0,01, 0,1, 0,5, 1 и 3 мг/кг, CS, Menlo Park, CA) готовили свежими на каждый день тестирования в стерильном физиологическом растворе и вводили интраназально за 30 мин до тестирования. Тестировали пятнадцать крыс на группу на каждую дозу пептида, за исключением того, что в группе контроля (0) было двадцать крыс. Каждую дозу вводили крысам в рандомизированном порядке. Перед введением веществ крыс слегка анестезировали (до потери рефлекса выпрямления) изофлураном (2,5%, 0,5 л/мин кислорода), помещали в положение лежа, затем тонкую пластиковую пипетку (Fischer Scientific) вставляли в ноздри и вводили пептид в объеме 15-20 мкл.

5.1.3. Поведенческий аппарат и процедуры тестирования.

Тест "Открытое поле" (ОП).

Установка "Открытое поле" сделана из серого оргстекла (17 дюймов длина × 17 дюймов ширина × 12 дюймов высота (43,2 см × 43,2 см × 30,5 см; Нолдус, Лисбург, Вирджиния) с цифровыми камерами, расположенными над аренами. Для определения различных показателей активности с помощью специализированного программного обеспечения (Ethovision, XT12) крысам сначала разрешили адаптироваться в тестовой комнате в течение 30 мин, пока они находились в их домашней клетке. Тестирование начинали, помещая животное в центр камеры открытого поля и поведение записывалось в течение 30 мин. Наблюдатель не находился в комнате во время тестирования.

"Приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ).

Крысам сначала давали возможность адаптироваться в экспериментальной комнате в течение 30 мин, пока они находились в их домашней клетке. Во время тестирования крысу помещали на 5 мин в лабиринт, который состоит из двух открытых рукавов (длина 45 см × ширина 10 см), двух закрытых рукавов (длина 45 см × ширина 10 см × высота 30 см) и среднего отсека (длина 4 см × ширина 4 см), образующий форму плюса, расположенный на высоте 50 см от пола. Сеанс тестирования был записан в цифровом виде для последующего анализа (Ethovision, XT12). Все тестирования проводились при красном освещении. Исследователь наблюдал за крысой во время тестирования через специальное смотровое окно, встроенное в дверь экспериментальной комнаты. Аппарат очищали дезинфицирующим средством LpH после каждой посадки животного.

"Неизбегаемое плавание по Порсольту (двухдневная модификация)" (FST).

Крысам сначала давали возможность адаптироваться в экспериментальной комнате в течение 30 мин, пока они находились в их домашней клетке. Неизбегаемое плавание по Порсольту проводили с использованием цилиндров из оргстекла (10 в ширину, 18 в высоту), заполненных водой с температурой около 25°C. В первый день эксперимента крыс сначала адаптировали (15 мин) к устройству для принудительного плавания, помещая их в воду лицом к стенке цилиндра. На следующий день были проведены тесты принудительного плавания (5 мин). Активность регистрировалась цифровыми камерами и анализировалась с помощью специализированного программного обеспечения (Ethovision XT12).

5.1.4. Статистический анализ.

Время, проведенное в центральной зоне, входы в центральную зону в тесте ОП, % времени, проведенного на открытом рукаве в тесте ПКЛ и время неподвижности и подвижности в FST были проанализированы с помощью одностороннего дисперсионного анализа 1X7 One-Way ANOVA с дозой вещества (0,01; 0,1; 0,5; 1; 3 FQSE, диазепам 2 или кетамин 10 мг/кг) в качестве основного фактора. Процедуры попарных множественных сравнений проводились с использованием метода Стьюдента-Ньюмана-Кеулса или апостериорного критерия наименьшей значимой разницы (LSD) Фишера. Статистическая значимость была установлена на уровне $P < 0,05$

5.2. Результаты.

ОП.

Время, проведенное в центральной зоне установки, после введения различных доз препарата представлено на фиг. 43А. Анализ выявил значительный основной эффект ($P < 0,05$) для дозы препарата. Апостериорные множественные сравнения времени, проведенного в центральной зоне для разных доз вещества показали значительную разницу между контролем ($90,9 \pm 11,6$ с) и двумя дозами FQSE: 0,5 мг/кг ($204,1 \pm 46,6$ с; $P = 0,0017$) и 3 мг/кг ($166,2 \pm 18,4$ с; $P = 0,038$) пептида. Входы в центральную зону после введения различных доз препаратов представлены в фиг. 43Б. Анализ выявил значительный основной эффект ($P < 0,05$) для дозы препарата. Апостериорные множественные сравнения входов в центральную зону по дозам лекарственного средства показали значительные различия между носителем ($33,6 \pm 3,9$) и четырьмя тестовыми группами: 0,01 мг/кг ($49,1 \pm 6,5$; $P = 0,048$), 0,5 мг/кг ($54,2 \pm 8,3$; $P = 0,009$), 3 мг/кг ($54,1 \pm 4,6$; $P = 0,011$), диазепам ($54,3 \pm 6,2$; $P = 0,0089$). Общее расстояние (см) после введения различных доз препарата представлено на фиг. 43В. Анализ выявил значительный основной эффект ($P < 0,05$)

для дозы препарата. Апостериорный тест LSD Фишера выявил значительные различия между контролем (4441 ± 292 см) и двумя тестовыми группами: 0,5 мг/кг ($5338 \pm 316,2$ см; $P = 0,014$) и диазепамом (5289 ± 263 см; $P = 0,02$).

ПКЛ.

Процент времени, проведенного на открытом рукаве в тесте ПКЛ представлен на фиг. 44. Анализ выявил значительный основной эффект ($P < 0,05$) для дозы препарата. Апостериорный тест LSD Фишера выявил значительные различия между контролем ($6,1 \pm 1,4\%$) в двух тестовых группах: 0,01 мг/кг ($10,6 \pm 1,6\%$; $P = 0,032$), 0,5 мг/кг ($11,3 \pm 2,05\%$; $P = 0,015$) и диазепам ($10,8 \pm 1,11\%$; $P = 0,028$).

FST.

Результаты тестов принудительного плавания на неподвижность представлены в фиг. 45А. Анализ показателей неподвижности выявил значимый основной эффект для дозы препарата ($P < 0,001$). Апостериорный тест ЛСД Фишера показал значительные различия между контролем ($231,1 \pm 7,99$ с) и двумя дозами лекарственного пептида: 0,5 мг/кг ($157,1 \pm 7,98$ с; $P < 0,0001$) и кетаминем 10 мг/кг ($196,4 \pm 8,9$ с; $P < 0,008$). Кетамин также был связан со значительным снижением неподвижности по сравнению с пептидом 0,1 мг/кг ($238,1 \pm 9,19$ с; $P = 0,003$). Никаких существенных различий между любыми другими тестируемыми дозами отмечено не было. Показатели мобильности представлены в фиг. 46Б. Анализ показателей мобильности выявил значимый основной эффект для дозы препарата ($P < 0,001$). Апостериорный тест LSD Фишера показал значительные различия между 0,5 мг/кг ($142,9 \pm 7,98$ с; $P < 0,0001$) и носителем ($68,6 \pm 7,99$ с). Подвижность после введения кетамина ($103,6 \pm 8,9$ с) также была выше по сравнению с носителем ($P = 0,008$) и дозой пептида 0,1 мг/кг ($P = 0,0032$). Никаких существенных различий между любыми другими тестируемыми дозами отмечено не было.

5.3. Обсуждение результатов.

Это исследование рассматривает поведенческие эффекты различных доз тетрапептида FQSE по сравнению с введением диазепама или кетамина.

В тесте ОП было обнаружено, что введение FQSE приводило к увеличению пройденного расстояния (при дозе 0,5 мг/кг), а также к увеличению времени, проведенного в центре (при дозе 0,5 мг/кг) и числом выходов в центр (в дозе 0,01, 0,5, 3 мг/кг). Поведение животных в тесте ОП отражает баланс между исследовательской мотивацией и страхом новизны. Снижение тигмотаксиса вместе с усилением локомоции предполагает снижение тревожности у крыс, получавших FQSE. Наиболее выраженный эффект пептида наблюдался при дозе 0,5 мг/кг и был сопоставим с эффектами диазепама. Пептид во всех дозах не оказывал седативного действия.

В ПКЛ наблюдали сокращение времени, проведенного на открытых рукавах после обработки FQSE в дозах 0,01 и 0,5 мг/кг. Тест ПКЛ имеет сильную прогностическую ценность для скрининга анксиолитических препаратов. Поведенческие результаты лечения FQSE в этом тесте предполагают анксиолитическую активность пептида в дозах 0,01 и 0,5 мг/кг.

Тест FST является действенным инструментом для оценки лекарств с потенциальной антидепрессанто-подобной активностью. В данном исследовании после введения FQSE в дозе 0,5 мг/кг наблюдалось значимое сокращение времени нахождения в неподвижном состоянии и увеличение времени активного плавания. Эти изменения аналогичны изменениям, наблюдаемым после введения кетамина, и предполагают антидепрессантный эффект пептида. Крысы, получавшие другие дозы пептида, не отличались от животных, получавших физиологический раствор.

5.4. Заключение.

В данном исследовании влияние различных доз FQSE на поведение крыс Sprague-Dawley оценивали с использованием тестов ОП, ПКЛ и FST. Поведенческие изменения после введения FQSE частично повторяют те, которые наблюдались у крыс, получавших диазепам в тестах ОП и ПКЛ и у крыс, получавших кетамин, в FST. Наиболее выраженные анксиолитические и антидепрессантные эффекты пептида наблюдались при дозах 0,5 и 0,01 мг/кг, в зависимости от поведенческой парадигмы. Результаты предполагают дозозависимую активность FQSE с максимальной эффективностью при интраназальной дозе 0,5 мг/кг.

Пример 6. Исследование анксиолитических и антидепрессантных эффектов пептида FQSE на модели хронического непредсказуемого легкого стресса (CMS).

Целью этого исследования было изучить анксиолитический и антидепрессантный потенциал различных доз пептида FQSE после хронического интраназального введения на модели CMS.

6.1. Материалы и методы.

6.1.1. Животные.

Работа проведена на 110 самцах крыс линии Wistar (питомник лабораторных животных "Столбовая"). Животные содержались в стандартных условиях лицензированной экспериментально-биологической клиники ФГБУ "НМИЦ ПН им. В.П. Сербского" (ветеринарное удостоверение № 277-0001701 от 16.06.2010 г.), соответствующей действующим требованиям для экспериментально-биологических клиник ("Лабораторные животные" Положение и руководство, М., 2003). В качестве подстилки использовали мелкую стружку из экологически чистой древесины лиственных пород (ТУ 5313-

001-1897639-92). Крысы имели свободный доступ к пище и воде. Световой день составлял 12 ч (с 7:00 до 19:00). Освещенность в светлый период цикла составляла 70-90 лкс. Температура в помещении постоянного содержания была 24°C. Все манипуляции с животными проводились с соблюдением правил гуманного обращения с лабораторными животными. При осуществлении данной работы выполнены общие требования Приказа 267 МЗ РФ от 19.06.2003 - "Правила лабораторной практики РФ", "Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ", 2005 (Издание второе) и "Руководства по содержанию и разведению лабораторных животных в питомниках и экспериментально-биологических клиниках (вивариях) и их использованию в научных, учебных и производственных целях", М., 2003.

После доставки в виварий и до начала эксперимента животные выдерживались 2 недели в карантине для адаптации.

6.1.2. Протокол исследования.

Протокол эксперимента представлен на фиг. 46. В начале эксперимента животных помещали в отдельные клетки для проведения теста предпочтения сахарозы и определения уровня ангедонии для элиминации животных с индексом предпочтения сахарозы ниже 65% (SP1).

Животные, которые соответствовали выбранным критериям, были разделены на группу нативного контроля (n = 10) и группу, подвергшуюся хроническому непредсказуемому умеренному стрессу (CMS) (n = 52).

6.1.3. Протокол стрессирования.

Во время стрессирования экспериментальные животные ежедневно помещались в индивидуальные клетки. Общая длительность воздействия стресса составляла 26 дней.

День 1. 10 утра - 6 вечера. Помещение крыс в холодное помещение на 1 ч. 6 вечера - 10 утра. Смена освещения (включение/выключение света каждые 2 ч).

День 2. 10 утра - 6 вечера. Наклон клетки под углом 45°. 6 вечера - 10 утра. Лишение воды.

День 3. 10 утра - 6 вечера. Включение стробоскопа в темном помещении. 6 вечера - 10 утра. Включение света ночью.

День 4. 10 утра - 6 вечера. Мокрая клетка (добавление 250 мл воды в каждую клетку). 6 вечера - 10 утра. Помещение животных в тесную мышиную клетку.

День 5. 10 утра - 6 вечера. Изъятие подстилки. 6 вечера - 10 утра.

Смена освещения (включение/выключение света каждые 2 ч).

День 6. 10 утра - 6 вечера. Помещение нового партнера в клетку (партнер возрастом 6 месяцев). 6 вечера - 10 утра. Включение света ночью.

День 7. 10 утра - 6 вечера. Включение белого шума. 6 вечера - 10 утра. Включение стробоскопического освещения ночью.

День 8-26. Повторение используемых ранее стрессоров в указанной последовательности.

После проведения процедуры стрессирования экспериментальным животным повторно проводился тест на предпочтение сахарозы для оценки эффективности стрессирования и выявления крыс, демонстрирующих признаки ангедонии. По итогу оценки 1 крыса была исключена из группы нативного контроля в связи с низкими значениями предпочтения сахарозы (<65%). В экспериментальные группы было отобрано 40 животных.

6.1.4. Экспериментальные группы.

Все отобранные животные были разделены на следующие группы:

(1) группа "CMS+r-ль" 10 самцов - получали физраствор и/н. 3; (2) группа "CMS+0,05" 10 самцов - получали экспериментальный препарат FQSE, растворенный в физрастворе, в дозе 0,05 мг/кг и/н; (3) группа "CMS+0,5" 10 самцов - получали экспериментальный препарат FQSE, растворенный в физрастворе, в дозе 0,5 мг/кг и/н; (4) группа "CMS+Диаз" 10 самцов - получали Диазепам в дозе 0,5 мг/кг в/б; (5) группа "контроль" 9 самцов - получали физраствор в/б и и/н. Экспериментальные вещества вводили ежедневно начиная с 58-59 дня эксперимента, за 30 мин до начала поведенческого тестирования. В дни, когда тестирований не проводилось, вещества вводили в утренние часы.

Таблица 2. Количество введений исследуемых веществ к началу поведенческих тестирований

Тест	Кол-во введений пептида
Приподнятый крестообразный лабиринт (58-59 день)	1
Социальное взаимодействие (61-62 день)	4
Предпочтение мочи самки (65-66 день)	8
Тест подавления пищевого поведения в новой обстановке (68-69 день)	11
Предпочтение сахарозы (73-75 день)	16
Принудительное плавание (75-76 день)	18
Сбор образцов мозга (конец эксперимента – 79-80 день)	22

6.1.5. Поведенческие методики.

Тест на предпочтение раствора сахарозы (выявление ангедонии) (SPT).

Для оценки состояния ангедонии ("отказа от приятного"), являющегося ключевым симптомом депрессии, был использован тест, направленный на определение предпочтения раствора сахарозы. Животным в условиях свободного выбора предъявлялось 2 поилки на 24 ч: одну с водой, другую - с 1% раствором сахарозы. За день до проведения теста крысам предъявлялись поилки с 2% раствором сахарозы на 2 часа в вечернее время суток для ознакомления. Во время тестирования поилки меняли местами во избежание выработки предпочтения места. Поилки предварительно взвешивали и по разнице масс вычисляли объемы выпитой жидкости. Замеряли объемы выпитой обычной воды, сладкой воды и общий объем потребленной жидкости. Индекс предпочтения вычисляли по формуле:

$$(\text{Объем выпитой сладкой воды} * 100\%) / \text{Общий объем выпитой жидкости} [1].$$

Тест "Приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ).

Для оценки уровня тревожности, двигательной и ориентировочно-исследовательской активности лабораторных животных был использован тест ПКЛ. Лабиринт состоял из двух закрытых и двух открытых рукавов, расположенных напротив друг друга (длина рукава 45 см), высота бортиков закрытых рукавов 10 см. Всю установку поднимали на ножку до высоты 70 см над уровнем пола. Крысу помещали в центр лабиринта, головой к открытому рукаву. В течение 5 мин регистрировали следующие параметры: число выходов на открытые рукава и время пребывания в них, число переходов между рукавами, время замирания, длительность и число актов груминга, количество выглядываний в открытые рукава лабиринта, количество стоек и свешиваний.

Тест "Социальное взаимодействие" (SI).

Для оценки социальной активности и депрессивно-подобного состояния экспериментальных животных использовался тест, оценивающий социальное взаимодействие грызунов. В тесте к крысе в домашнюю клетку помещался ювенильный самец возрастом 1 месяц. В течение 10 мин фиксировались длительность и число социальных контактов с ювенильным самцом, длительность и число угрожающих и агрессивных контактов. Социальными контактами считались реакция следования, обнюхивания ювенильного самца и др. (Vishnivetskaya et al. (2007). Effect of MAO A deficiency on different kinds of aggression and social investigation in mice. *Aggress. Behav.* 33(1), 1-6). В норме ювенильный самец не представляет никакой опасности для взрослой крысы, поэтому крыса в спокойном состоянии демонстрирует достаточно высокие значения показателей социального взаимодействия и не проявляет агрессивного поведения по отношению к ювенильному самцу. Признаки агрессии являются следствием отклонений в поведении, а снижение социальных контактов может свидетельствовать о наличии депрессивно-подобного поведения.

Тест подавления пищевого поведения в новой обстановке (NSFT).

Для оценки тревожности и пищевой мотивации был использован тест подавления пищевого поведения в новой среде. В данном тесте лабораторное животное, предварительно подвергавшееся пищевой депривации на 24 ч, помещалось в экспериментальную установку, представляющую собой квадратную арену 50*50*40 см, на 5 мин (Jiao et al. (2019). Influence of Xiaoyaosan on depressive-like behaviors in chronic stress-depressed rats through regulating tryptophan metabolism in hippocampus. *Neuropsych. dis. treat.* 15, 21). В центральную ярко освещенную часть арены помещался кусочек лакомства (кусочек черного хлеба). Фиксировался латентный период подхода к пище, время ее исследования, латентный период (ЛП) начала и длительность потребления лакомства. В связи со страхом открытых освещенных пространств грызунами, данный тест используется для оценки уровня тревожности. Животные, демонстрирующие высокий уровень тревоги, в норме не подходят к лакомству, в то время как анксиолитические препараты значительно снижают латентный период подхода к пище. Хроническое введение антидепрессантов также приводит к снижению ЛП подхода к еде в данном тесте.

Тест на ангедонию, Female Urine Sniffing Test (FUST).

Для оценки ангедонии, половой мотивации и поискового поведения, ассоциированного с депрессивно-подобным состоянием у лабораторных грызунов, был использован тест на предпочтение мочи самки FUST (Gould et al. (2009). Mood and anxiety related phenotypes in mice. Humana Press). Тест проводился при затемненном освещении (3 люкс) в клетке с подстилом. На первом этапе эксперимента животному предъявлялась ватная палочка, смоченная дистиллированной водой, на 3 минуты. Фиксировался латентный период подхода к палочке, время и число обнюхиваний. Через 45-минутный перерыв крысе предъявлялась ватная палочка, смоченная мочой самки той же линии, находящейся в периоде эструса. Также фиксировался латентный период подхода к палочке, время и число обнюхиваний. Для определения предпочтения был рассчитан индекс по формуле:

(Время обнюхивания мочи самки*100%)/Общее время обнюхивания.

В норме половозрелые самцы демонстрируют высокий уровень интереса к моче самки, находящейся в периоде эструса, показывая высокую половую мотивацию, что выражается в снижении латентного периода подхода к смоченной ватной палочке и увеличении длительности взаимодействия. В то же время низкие показатели взаимодействия с объектом могут свидетельствовать о нарушении поискового поведения и развитии ангедонии - основного симптома клинической депрессии.

"Неизбегаемое плавание" по Порсольту.

Во время теста каждое животное помещалось в цилиндр, наполненный водой (температура 24°C) на глубину 30 см, на 8 мин. Диаметр сосуда 31 см, высота 40 см. В течение последних 6 мин регистрировали продолжительность активного (энергичное движение всеми конечностями) и пассивного (слабые движения задними конечностями) плавания и неподвижности. Параметр "иммобилизация" отражает состояние отчаяния животного и его отказ от попытки сбежать из экспериментальной установки. Это может отражать состояние апатии и двигательной отсталости, возникающее при клинической депрессии.

6.1.6. Статистическая обработка.

Критерий Шапиро-Вилка использовали для оценки нормальности полученных данных.

Параметрический анализ (в случае нормального распределения: число стоек, время социального взаимодействия, индекс предпочтения мочи самки и предпочтения сахарозы) проводился при помощи дисперсионного анализа ANOVA и далее при помощи критерия множественного сравнения Тьюки для post hoc анализа. Непараметрический анализ (в случае ненормального распределения) проводился при помощи критерия Краскелла-Уоллеса и далее критерия множественного сравнения Данна для post hoc анализа. Достоверными считались различия при $p < 0.05$.

6.2. Результаты.

6.2.1. ПКЛ.

Тест проводили для определения уровня тревоги у крыс, который может быть повышен у животных с депрессивно-подобным фенотипом.

Проверка на нормальность с помощью критерия Шапиро-Вилка не подтвердила нормальное распределение данных в группах, поэтому результаты будут оценены с помощью непараметрических критериев. Результаты применения критерия Краскелла-Уоллеса выявили значимый эффект фактора Группа ($H(4, N = 49) = 21,5; p = 0,0002$) на время, проведенное на открытых лучах ПКЛ. Было выявлено достоверное снижение этого показателя у животных из группы "CMS + р-ль" ($p = 0,04$) по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о развитии тревожного фенотипа (фиг. 47А). Разницы между контрольными животными и животными, получавшими пептид, не было, что свидетельствует о нормализации уровня стресса. FQSE в дозе 0,05 мг/кг также показал тенденцию к увеличению этого параметра по сравнению с контролем ($p = 0,07$), что может указывать на умеренный анксиолитический эффект пептида. У животных, получавших диазепам на фоне хронического стресса, было выявлено увеличение времени, проведенного на открытых рукавах, по сравнению с животными, подвергшимися стрессу, но получавшими растворитель ($p = 0,0001$) и обе дозы пептида ($p = 0,05$ по сравнению с FQSE 0,05 и $p = 0,009$ vs. FQSE 0,5) (фиг. 47А), что отражает его сильный анксиолитический эффект.

Кроме того, было отмечено влияние фактора Группа ($H(4, N = 49) = 12,6; p = 0,013$) на время замирания в тесте ПКЛ. Применение post hoc анализа показало значимое увеличение замирания только в группе животных, получавших диазепам ($p = 0,006$) по сравнению с контрольной группой (фиг. 47Б). Данный эффект может быть связан с побочным седативным действием диазепама.

6.2.2. SI.

Тест на социальное взаимодействие указывает на интерес к социальным контактам у крыс, который может быть снижен при депрессивно-подобном состоянии.

Проверка на нормальность с помощью критерия Шапиро-Вилка подтвердила нормальное распределение данных в группах, поэтому результаты будут оценены с помощью параметрических критериев. Применение однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) показало значимое влияние фактора Группа на время социальных контактов ($F(4, 44) = 7,5; p = 0,0001$). Множественное попарное сравнение групп с использованием критерия Тьюки выявило значимое снижение длительности социального взаимодействия в группах животных, перенесших стресс и получавших растворитель ($p = 0,0002$), диазепам ($p = 0,01$) и в дозе 0.5 мг/кг ($p = 0,007$) по сравнению с контрольными нестрессированными крысами. Тогда

как животные, получавшие пептид в дозе 0.05 мг/кг не отличались по данному параметру от контрольных, а длительность социальных контактов по сравнению с группой CMS+р-ль была значимо выше ($p=0.01$) (фиг. 48).

6.2.3. FUST.

Проверка на нормальность с помощью критерия Шапиро-Вилка подтвердила нормальное распределение данных с распределением данных в группах, поэтому результаты будут оценены с помощью параметрических критериев. Применение однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) показало значимое влияние фактора Группа на индекс предпочтения мочи самки ($F(4, 44) = 5,8073$; $p=0,0007$). Применение post hoc анализа выявило снижение данного показателя в группе стрессированных животных, получавших растворитель по сравнению с контрольной группой ($p=0.03$). Введение пептида в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг привело к увеличению предпочтения мочи самки у крыс в сравнении с животными, перенесшими стресс и получавшими растворитель ($p=0.003$ и $p=0.001$) (фиг. 49). Диазепам не оказал влияния на поведение животных в данном тесте.

6.2.4. NSFT.

Тест NSFT проводится для определения уровня тревожности у крыс.

Латентный период (ЛП) начала еды исследовали с помощью множительных оценок Каплана-Мейера, которые учитывают цензурируемые переменные (невыполнение реакции - отсутствие ЛП начала еды). Полученные кривые представлены на фиг. 50.

Применение критерия Хи-квадрат выявило значимые различия между группами по исследуемому параметру ($\chi^2 = 12,1$; $df = 4$; $p = 0,01$). Сравнение групп проводили с использованием теста Мантеля-Кокса. Было показано, что хронический стресс не привел к увеличению ЛП подхода к еде по сравнению с контрольной группой ($F(6, 8) = 1,3$ $p = 0,35$). Нужно отметить, что в контрольной группе более 60% животных не подходили к еде, что связано с высокой стрессорной нагрузкой данного теста. Введение диазепама привело к значимому снижению ЛП по сравнению с группами "Контроль" и "CRS+р-ль" ($F(6, 14) = 3,5$; $p=0,02$ и $F(8, 14) = 3,2$; $p=0,02$ соответственно). Сходный эффект наблюдался в группе крыс, получавших пептид в дозе 0,05 мг/кг: значимое увеличение ЛП было отмечено в сравнении с группами "Контроль" и "CUMS+р-ль" ($F(6, 16) = 4,2$; $p = 0,009$ и $F(8, 16) = 3,71$ $p = 0,01$). Животные, получавшие FQSE в дозе 0,5 мг/мг, не отличались от контрольной группы и стрессированных животных, получавших физраствор.

6.2.5. SPT.

Данный тест характеризует степень ангедонии животных, перенесших хронический стресс.

Проверка на нормальность с помощью критерия Шапиро-Вилка не подтвердила нормальное распределение данных в группах, поэтому результаты будут оценены с помощью непараметрических критериев. Результаты применения критерия Краскела-Уоллеса выявили значимый эффект фактора Группа на индекс предпочтения сахарозы ($H(4, N=49) = 11,8$; $p = 0,018$). Животные, перенесшие стресс и получавшие растворитель, имели значимо более низкий индекс, чем контрольные животные ($p=0,017$). Стрессированные животные, получавшие диазепам и пептид в обеих дозах, не отличались по данному параметру от группы "контроль" и "CUMS+физраствор" (фиг. 51).

6.2.6. FST.

Широко используемым тестом для оценки антидепрессантно-подобной активности веществ является тест принудительного плавания.

Проверка на нормальность с помощью критерия Шапиро-Вилка не подтвердила нормальное распределение данных в группах, поэтому результаты будут оценены с помощью непараметрических критериев. Результаты применения критерия Краскела-Уоллеса выявили значимый эффект фактора Группа на время иммобилизации в данном тесте ($H(4, N=49) = 12,2$; $p = 0,01$). Применение post hoc анализа выявило значимое увеличение иммобилизации в группе животных, перенесших стресс и получивших растворитель, по сравнению с контрольными значениями ($p=0,04$). FQSE в дозе 0.5 мг/кг значимо снизил время иммобилизации в данном тесте по сравнению с группой CMS+р-ль ($p=0.03$) (фиг. 52). Диазепам и пептид в дозе 0.05 мг/кг значимо не отличались по данному показателю ни от контрольной группы, ни от стрессированной группы получавшей физраствор.

6.3. Обсуждение результатов.

Используемая модель хронического стресса привела к развитию стойкого депрессивно-подобного состояния, наблюдаемого во всех используемых поведенческих тестах. Введение диазепама в дозе 0,5 мг/кг оказало только анксиолитический эффект в тестах ПКЛ и NSFT, и не оказало влияния на поведение животных в тестах на депрессивно-подобное состояние (табл. 3).

Исследуемые экспериментальные препараты оказали антидепрессантно-подобный эффект в тесте Порсолта, тесте на социальное взаимодействие и на уровень ангедонии в тесте на предпочтение мочи самки. Пептид в обеих дозах оказал антидепрессантный эффект, но не во всех поведенческих парадигмах. Наиболее выраженный эффект пептида в обеих дозах наблюдался в тесте FUST. Антидепрессантный эффект FQSE наблюдался уже после 4-го введения.

В дозе 0.05 мг/кг LCGA-17 оказал анксиолитический эффект в NSFT.

Нужно отметить, что в данном тесте противотревожный эффект наблюдается и после хронического

введения клинически используемых антидепрессантов - селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (SSRIs).

6.4. Заключение.

Эта модель непредсказуемого хронического стресса приводит к развитию стойкого депрессивного состояния у крыс.

Введение диазепама оказывает выраженное анксиолитическое и седативное действие.

FQSE в дозе 0,05 и 0,5 мг/кг оказывает антидепрессантное действие в различных поведенческих парадигмах.

FQSE в дозе 0,05 мг/кг показал анксиолитический эффект в NSFT и мягкий противотревожный эффект в ПКЛ, без признаков седации.

Таблица 3. Результаты, полученные в модели хронического стресса, после введения исследуемых веществ

Тест	CMS			
	физраствор	Диазепам	FQSE 0,05 мг/кг	FQSE 0,5 мг/кг
ПКЛ (1 введение)	-	анксиолитический и седативный эффект	анксиолитический эффект (тенденция)	-
SI (4 введения)	депрессивно-подобное поведение	-	антидепрессантный эффект	-
FUST (8 введений)	ангедония, депрессивно-подобное поведение	-	антидепрессантный эффект	антидепрессантный эффект
NSFT (11 введений)	-	анксиолитический эффект	анксиолитический эффект	-
SP (16 введений)	ангедония, депрессивно-подобное поведение	-	-	-
FST (18 введений)	депрессивно-подобное поведение	-	-	антидепрессантный эффект

Пример 7. Эффекты FQSE на животной модели посттравматического стрессового расстройства (ПТСР).

На сегодняшний день не существует эффективного лечения ПТСР, первая линия лечения ПТСР включает СИОЗС, хотя в отчете Института медицины сделан вывод о том, что имеющихся данных недостаточно для подтверждения эффективности СИОЗС или другой фармакотерапии при ПТСР. (Treatment of posttraumatic stress disorder: An assessment of the evidence. Washington, DC: National Academies Press. Institute of Medicine; 2008). Очевидно, что открытие новых фармакотерапевтических методов лечения тревожности представляет собой большую актуальную медицинскую потребность.

Целью исследования было оценить эффекты пептида FQSE на модели посттравматического стрессового расстройства.

7.1. Материалы и методы.

7.1.1. Содержание экспериментальных животных.

Всего для исследований использовали 120 самцов крыс Sprague Dawley (Charles River, Wilmington, MA). Изначально крыс содержали по 3-5 особей в полипропиленовых клетках (Animal Care Systems, Inc, Centennial, CO), расположенных в виварии с контролируемой температурой и влажностью, в котором поддерживали цикл свет/темнота 12:12 (старт в 6 утра). В начале эксперимента крысы весили около 250-350 г и имели возраст не менее 100 дней. Пища и вода были доступны в неограниченном количестве на протяжении всего исследования. Все процедуры были одобрены Комитетом по институциональному уходу и использованию животных Хьюстонского университета в соответствии с рекомендациями На-

циональных институтов здравоохранения.

7.1.2. Используемые вещества.

Доксазозин (DOX, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США, 1 мг/кг, внутривенно) получали в стерильном физиологическом растворе. Ранее было показано, что DOX эффективен при лечении некоторых симптомов посттравматического стресса у ветеранов. (Rodgman et al. (2016). Doxazosin XL reduces symptoms of posttraumatic stress disorder in veterans with PTSD: a pilot clinical trial. *J. Clin. Psychiat.*, 77(5), e561-565).

Две дозы FQSE (0,05 и 0,5 мг/кг, CS, Menlo Park, CA) готовили свежими на каждый день тестирования в стерильном физиологическом растворе и вводили интраназально за 30 мин до тестирования. Каждую дозу вводили в рандомизированном порядке по группам. Перед дозированием крыс слегка анестезировали (до потери рефлекса выпрямления) изофлураном (2,5%, 0,5 л/мин кислорода), помещали в положение лежа, затем тонкую пластиковую пипетку (Fischer Scientific) вставляли в ноздри и вводили пептид в объеме 15-20 мкл на ноздри. Та же процедура с изофлураном использовалась для введения доксазозина, однако препарат вводили внутривенно.

7.1.3. Поведенческий аппарат и процедуры тестирования.

Протоколы стресс-воздействия запаха хищника в и отращения к месту были основаны на ранее опубликованных исследованиях ((Edwards et al. (2013). Traumatic stress reactivity promotes excessive alcohol drinking and alters the balance of prefrontal cortex-amygdala activity. *Transl. psychiatry*, 3(8), e296; Roltsch et al. (2014). Predator odor stress alters corticotropin-releasing factor-1 receptor (CRF1R)-dependent behaviors in rats. *Neuropharmacology*, 79, 83-89; Whitaker et al. (2015). Blunted hypothalamo-pituitary adrenal axis response to predator odor predicts high stress reactivity. *Physiol. behav.*, 147, 16-22). Крысы подвергались воздействию раствора без запаха (стерильный физиологический раствор) или раствору с запахом хищника (моча рыси, PMart, Sandy Point, ME) с использованием установки для предпочтения места (MED Associates, Fairfax, VT), состоящего из двух отсеков (8×8×11 дюймов), которые различались как визуальными (цвет стены), так и тактильными (текстура пола) сигналами, соединенными меньшим средним отсеком (5×8×11 дюймов). Отсеки были разделены автоматическими дверцами гильотины. Использовали метод без предпочтения крысами одной камере другой. Между 8-10 ч утра крыс помещали в средний отсек, поднимали гильотинные двери и позволяли исследовать установку в течение 15 мин (адаптация). Время в каждом отсеке и активность регистрировались с помощью инфракрасных датчиков и заносились в таблицу с помощью имеющегося в продаже программного обеспечения (MED Test, версия 4.2.0.0, MED Associates, Fairfax, VT). Между 14 и 16 ч дня крысам снова позволяли исследовать установку, и регистрировали время и активность (исходный уровень до предпочтения). Спустя 24 ч крыс случайным образом распределяли по камере и подвергали воздействию физиологического раствора (в течение 15 мин в установке предпочтения места. Вечером того же дня крыс содержали в противоположном отсеке и подвергали воздействию запаха хищника (или отсутствия запаха) в течение 15 мин. Квадратный кусок фильтровальной бумаги 2×2 дюйма, пропитывали 5 мл физиологического раствора или мочи рыси и помещали под решетчатый пол камеры. На следующий день после стрессирования запахом хищника крыс помещали в центральное отделение и позволяли исследовать все устройство в течение 15 мин. У крыс не было прямого доступа к моче рыси. Весь аппарат очищался дезинфицирующим средством после каждого сеанса эксперимента.

7.1.4. Статистический анализ.

Статистический анализ проводился для времени в отсеках, вычтенном из исходных показателей для 117 крыс. Анализ времени в обозначенных камерах между группами без запаха и подверженными запахи, которым вводили физиологический раствор, проводили с использованием независимого t-критерия. Потенциальные различия между группами, не подвергавшимися воздействию запаха, и группами, подвергавшимися воздействию запаха, анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа с дозой лекарственного средства в качестве основного фактора. За значительными основными эффектами следовали процедуры попарного множественного сравнения (метод Стьюдента Ньюмана-Кеулса). Значимость была установлена на уровне $p < 0,05$.

7.2. Результаты.

Фиг. 53А иллюстрирует группы, подвергшиеся и не подвергшиеся воздействию запаха при введении физиологического раствора. Анализ подтверждает, что воздействие запаха хищника вызывает значимое ($t(27) = 2,690, p = 0,012$) обусловленное отращением к месту через 24 ч после воздействия. Как представлено в фиг. 53Б, ANOVA не выявил значимых различий в группах введения при отсутствии запаха хищника ($p = 0,746$). Анализ времени для групп, подвергшихся воздействию запаха хищника, выявил значимый основной эффект для дозы препарата ($F(3,57) = 2,780, p = 0,050$). Апостериорные множественные сравнения выявили значительную разницу между максимальной дозой пептида (FQSE 0,5) и физиологическим раствором ($P = 0,036$) (фиг. 53В) и тенденцию к достоверному различию между низкой дозой пептида (FQSE 0,05) и высокой дозой пептида. ($P = 0,159$).

7.3. Заключение.

В этом отчете описываются эффекты пептидного тестируемого препарата, вводимого интраназаль-

но, на тесты на модели посттравматического стрессового расстройства животных. Первичные результаты включают: 1) подтверждение обусловленного запахом хищника отвращения к месту, как было продемонстрировано ранее, 2) отсутствие явных побочных эффектов лекарственного средства или пептида и 3) значимое ослабление вызываемого запахом хищника отвращения к месту у крыс, которым вводили самую высокую дозу пептида.

Эксперименты по предпочтению места на модели посттравматического стрессового расстройства на животных, продемонстрировали предыдущие исследования результаты (Edwards et al. (2013). Traumatic stress reactivity promotes excessive alcohol drinking and alters the balance of prefrontal cortex-amygdala activity. *Transl. psychiatry*, 3(8), e296). Анализ групп, получавших DOX и пептид и не подвергавшихся воздействию запаха хищника, продемонстрировал нормальное поведение, поскольку в течение времени в случайно спаренных камерах не было обнаружено значительных эффектов. Общая активность (не показана) также не различалась между группами. Как показано на фиг. 53B, самая высокая доза пептида (FQSE0,5) полностью ослабляла вызванное запахом хищника отвращение к месту. DOX, препарат, который показал эффективность у людей с посттравматическим стрессовым расстройством (Rodgman et al. (2016). Doxazosin XL reduces symptoms of posttraumatic stress disorder in veterans with PTSD: a pilot clinical trial. *J. Clin. Psychiat.*, 77(5), e561-565)), также ослаблял отвращение к месту, вызванное запахом хищников, однако не было значительных отличий от группы физиологического раствора при использовании данной статистической модели. Суммарно, данные подтверждают дальнейшую разработку исследуемого пептидного препарата в качестве потенциального средства лечения посттравматического стрессового расстройства.

Пример 8. Исследование эффектов интраназального введения FQSE на поведенческие и эндокринные параметры крыс в модели депрессии "выученная беспомощность".

Целью исследования является изучение потенциального антидепрессивного и анксиолитического эффекта интраназального введения пептидного модулятора ГАМК-А рецептора FQSE на поведенческие и эндокринные параметры крыс в модели депрессии "выученной беспомощности" (ВБ).

8.1. Материалы и методы.

8.1.1. Животные.

Исследование выполнено на 45 взрослых самцах крыс Wistar массой 220-250 г, (средний вес 230 г) из "Коллекции лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности" ИФ РАН, поддерживаемой программой биоресурсных коллекций ФАНО России, содержащихся в стандартных условиях. При проведении экспериментов соблюдались требования Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях.

8.1.2. Исследуемые вещества.

Пептидный модулятор ГАМК-А FQSE вводили интраназально (и/н) ежедневно в течение 10 дней в дозе 0,5 или 2,5 мг/кг. Для приготовления растворов пептида FQSE был приготовлен 0,3% бикарбонатный буфер (3 г бикарбоната натрия NaHCO_3 на 1 л ddH_2O , pH 8; для приготовления раствора буфер собирали через фильтр с помощью шприца Millex 0,45 мкм (Millipore). Раствор для интраназального введения 2, мг/кг в объеме 20 мкл (однократное введение) содержал 0,575 мг FQSE, а раствор для интраназального введения 0,5 мг/кг в объеме 10 мкл (однократное введение) содержал 0,115 мг FQSE. Вес измеряли на аналитических весах с точностью 0,0001 г, раствор готовили с запасом 0,5 мл. Для эксперимента использовали свежеприготовленный раствор FQSE; вторые сутки раствор хранили в холодильнике при +4°C.

8.1.3. Вещество сравнения.

Тетрациклический антидепрессант Мапротилин (Map.), ингибитор обратного захвата моноаминов, использовали в качестве положительного контроля. Животные получали ежедневную внутривенную инъекцию (в/б) мапротилина в течение десяти дней (M9651, Merck, 4,5 мг/кг, растворенный в физиологическом растворе: 200 мкл на введение).

8.1.4. Модель выученной беспомощности.

Классическая парадигма "выученной беспомощности" (ВБ) была использована в качестве экспериментальной модели депрессии (Seligman et al. (1975). Learned helplessness in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 88(2), 534). Состояние "выученной беспомощности" по современным представлениям адекватно отражает тревожно-депрессивный синдром, воспроизводя основные признаки эндогенной депрессии человека, включая выраженность последствий беспомощности, безысходности и характерных эндокринных нарушений. Для развития ВБ крысы подвергались неконтролируемому неизбежному авersive стрессу (электрокожное раздражение). Животных стимулировали электрическим током (1 мА, 1 Гц, 15 сек) в замкнутом пространстве клетки размером 13×16×26 см с проводящим полом с использованием интервалов различных промежутки времени между подачей тока на дно камеры так, чтобы каждая крыса получала 60 стимуляций в течение часа, что приводило к развитию стойкого депрессивно-подобного состояния. Стимуляция выполнялась автоматически с использованием программного рандомизатора.

8.1.5. "Открытое поле".

Тест ОП - классический метод оценки уровня локомоторной активности и ориентировочно-исследовательского поведения грызунов в новых (стрессогенных) условиях - проводили в камере

90×90×45 см без крыши, пол в которой был расчерчен на квадраты 15×15 см и освещен сверху лампой мощностью 60 Вт. На 5 день после стрессирования в модели ВБ крысу помещали в центр ОП и в течение 5 мин регистрировали латентный период до начала движения, количество пересечённых крайних, промежуточных и центральных квадратов, продолжительность стоек и иммобилизации.

8.1.6. Приподнятый крестообразный лабиринт.

ПКЛ позволяет охарактеризовать поведение грызунов в условиях переменной стрессогенности, что даёт возможность оценить уровень тревожности животных и анксиолитического действия препаратов соответственно. На 6-е сутки после экспериментального воздействия крыс по одной тестировали в течение 5 мин в установке, расположенной на высоте 75 см над полом, и состоящей из 2 открытых освещённых и 2 закрытых рукавов с выходами. Оценивали время, проведённое животным внутри и вне закрытых рукавов (в открытых рукавах и в центре), число переходов между рукавами, выраженность и динамику поведения "выглядывания". Обычно тревожное поведение животного характеризуется предпочтением закрытых рукавов открытым и центру лабиринта (Pellow et al. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 14(3), 149-167; Walf et al. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.*, 2(2), 322-328).

8.1.7. Принудительное плавание по Порсолту.

FST относится к стандартным тестам для выявления антидепрессантных и анксиолитических свойств веществ и воздействий путём оценки двигательной активности крыс, помещённых в стеклянный цилиндр диаметром 30 см и высотой 90 см, на 2/3 заполненный водой с температурой 26±1°C. В однодневной модификации теста Порсолта (Porsolt et al. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 229(2), 327-336; Slattery et al. (2012). Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat. Protoc.*, 7(6), 1009) вынужденное плавание животных, по одному помещённых в цилиндр, исследовалось в течение 5 мин, были зарегистрированы время активного и пассивного плавания, длительность иммобилизации животных разных групп.

8.1.8. Дексаметазоновый тест (ДМТ).

Оценку стрессорного выброса глюкокортикоидных гормонов (кортикостерона - аналога кортизола у человека) и его подавление введением синтетического глюкокортикостероида проводили на 9-10 сутки после выработки ВБ в двухдневном дексаметазоновом тесте по схеме, учитывающей особенности циркадной ритмики функции НРА у крыс (Zhukov (1993). The dexamethasone suppression test in genetically different rats exposed to inescapable and escapable electric shocks. *Psychoneuroendocrinology*, 18(7), 467-474).

В первый день теста (ДМТ1) в 10:00 животным внутрибрюшинно вводили физиологический раствор, затем в 16:00 того же дня отбирали образцы периферической крови для определения базального уровня гормона, чем вызывали стресс, и через 30 мин после взятия крысы из клетки и получения начального образца, повторно брали кровь (стрессорный уровень).

Для изучения чувствительности гипоталамо-гипофизарно-адреналовой (ГГА) системы к сигналам обратной связи, на следующий день в 10 ч утра крысам вводили дексаметазон (10 мкг/кг в/б) (ДМТ2), и вышеописанная процедура взятия крови из хвостовой вены через 6 и 6,5 ч повторялась. Содержание кортикостерона определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с наборами реагентов "Кортикостерон-ИФА" ("Хема", РФ) в двух параллельных пробах.

Экспериментальные данные обрабатывали, вычисляя среднюю арифметическую величину и стандартную ошибку среднего в исследуемых подгруппах животных, n=9 для каждой точки.

8.1.9. Схема эксперимента.

Лабораторных крыс разделили на 5 экспериментальных групп по 9 животных в каждой: "Контроль" - у группы инъекционного контроля проводилось 10-дневное ежедневное интраназальное введение растворителя (0,3% бикарбонатный буфер). "ВБ" - группа животных, подвергнутых стрессированию, у которых формируется депрессивноподобное состояние "выученной беспомощности". В группе ВБ фармако-терапия не проводилась, исследовали развитие экспериментальной депрессии. "ВБ+FQSE 0,5" - группа модели депрессии (ВБ) с фармакологической коррекцией, получавшая 10-дневное ежедневное интраназальное введение LCGA-17 в дозировке 0,5 мг/кг. "ВБ+FQSE 2,5" - группа ВБ с фармакологической коррекцией, получавшая 10-дневное ежедневное интраназальное введение FQSE в дозировке 2,5 мг/кг. "ВБ+Мап." - группе препарата сравнения после стрессирования для выработки экспериментальной депрессии внутрибрюшинно десятидневно ежедневно вводили Марротилин в дозировке 4,5 мг/кг.

Таблица 4. Общая схема проведения эксперимента, введения препаратов и тестирования (пояснения в тексте)

День введения		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Конт		буфе р ин	буфе р ин	буфе р ин	буфе р ин	ОП+ salin е	ПКЛ + буфе р	Буфе р ин	FS+ буфе р	ДМТ1 + буфер	ДМТ2 + буфер
ВБ	стрес с					ОП	ПКЛ		FS	ДМТ1	ДМТ2
ВБ+FQ SE 0.5	стрес с	FQS Е ин	FQS Е ин	FQS Е ин	FQS Е ин	ОП+ FQS Е	ПКЛ + FQS Е	FQS Е ин	FS+ FQS Е	ДМТ1 + FQSE	ДМТ2 + FQSE
ВБ+FQ SE 2.5	стрес с	FQS Е ин	FQS Е ин	FQS Е ин	FQS Е ин	ОП+ FQS Е	ПКЛ + FQS Е	FQS Е ин	FS+ FQS Е	ДМТ1 + FQSE	ДМТ2 + FQSE
ВБ +Мап	стрес с	Мап вб	Мап вб	Мап вб	Мап вб	ОП+ Мап	ПКЛ + Мап	Мап вб	FS+ Мап	ДМТ1 + Мап	ДМТ2 + Мап

8.1.10. Статистический анализ результатов.

Для использования адекватных статистических критериев для анализа полученных результатов проводили оценку характера распределения данных. При нормальном распределении - использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с применением post hoc критерия Тьюки. Для ненормально распределенных данных использовали критерий Краскела-Уоллеса с последующим множественным сравнением с применением теста Данна. Порог значимости был равен 0.05. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего или как медиана и интерквартильный размах с минимальным и максимальным значениями.

8.2. Результаты.

8.2.1. ОП.

Группа ВБ характеризовалась значительно повышенным временем иммобилизации (что соответствует двигательному торможению у пациентов, страдающих депрессией) по сравнению с контрольной группой. Особенно ярко это было выражено в начальный период в центре лабиринта ($p = 0,01$, фиг. 54). Кроме того, значительно сократилось время вертикальной исследовательской активности ($p = 0,03$; фиг. 55А), что свидетельствует о тревожности животных и снижении их исследовательской активности. Хроническое введение FQSE 2,5 мг/кг (и/н) и Мапротилина 4,5 мг/кг (в/б) привело к значительному сокращению времени иммобилизации, когда животных помещали в центр установки, по сравнению с группой ВБ ($p = 0,04$ и $p = 0,044$ соответственно, фиг. 54). Ежедневное введение Мапротилина приводило к 2,3-кратному снижению количества животных, проявляющих иммобилизацию после ВБ; в группах, получавших FQSE, этот показатель также снизился: в 1,75 раза в группе 2,5 мг/кг и в 1,4 раза в группе 0,5 мг/кг, однако среднее время иммобилизации у всех животных этих групп не было значительно отличается от группы ВБ.

Значимое снижение вертикальной активности было также отмечено в группе животных, перенесших ВБ и получивших пептид в дозе 0,5 мг/кг ($p = 0,01$, фиг. 55А). Группы "ВБ + Мап" и "ВБ + FQSE 0,5" не отличались ни от контрольной группы, ни от группы ВБ, что может указывать на частичную коррекцию негативного воздействия неизбежного стресса этими веществами. Двигательная активность животных не изменялась во всех опытных группах (фиг. 55Б).

8.2.2. ПКЛ.

В тесте ПКЛ было отмечено практически полное отсутствие выходов на открытые рукава в контрольной и "ВБ" группе. Этот результат может указывать на высокую степень новизны и стресса в этом тесте. В то же время животные, получавшие Мап или FQSE, выходили на рукава чаще, но эти различия не достигли статистической значимости (фиг. 56А). Количество выглядываний из закрытых рукавов также не различалось между группами (фиг. 56Б).

8.2.2. FST.

Введение антидепрессанта Мапротилина животным, прошедшим стрессорное воздействие в модели депрессии, приводило к достоверному уменьшению времени иммобилизации в тесте принудительного плавания относительно группы контроль и "ВБ" ($p = 0.02$ и $p = 0.03$, соответственно, фиг. 57А), и увеличению времени активного плавания ($p = 0.01$ и $p = 0.02$, соответственно, фиг. 57Б). Введение FQSE в дозе 0.5 мг/кг, но не 2,5 мг/кг привело к снижению иммобилизации и, соответственно увеличению активного плавания на уровне тенденции относительно группы контроль ($p=0.09$ и $p=0.08$ соответственно).

8.2.3. ДМТ.

Изучение базального уровня кортикостерона (КС) в плазме крыс, показало увеличение на уровне тенденции содержания гормона у животных, перенесших стресс и получавших инъекции физраствора по сравнению с животными контрольной группы ($p=0.07$). Данный результат свидетельствует о гиперактивации ГГА оси. При этом крысы получавшие Мап и FQSE в обеих дозах не отличались по данному параметру от нестрессированных животных и имели значимо более низкий уровень КС по сравнению с группой "ВБ" ($p<0,02$), что свидетельствует о снижении стресс-реактивности животных (фиг. 58). Интересно отметить, что проведенное ранее исследование по предупреждению экспериментальной депрессии в данной модели антидепрессантом мапротилином в высоких дозах (Rybnikova et al. (2008). The possible use ОП hypoxic preconditioning for the prophylaxis ОП post-stress depressive episodes. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 38(7), 721-726) приводило к снижению содержания кортикостерона в крови ниже контрольного уровня.

Дексаметазоновый тест - маркер первичной депрессии. Согласно клиническим данным, у здоровых испытуемых, на фоне введения дексаметазона, содержание кортизола снижается вследствие торможения секреции кортиколиберина и АКТГ по механизму отрицательной обратной связи. У больных эндогенной депрессией снижение содержания кортизола при введении дексаметазона в крови менее выражено, так как при этом заболевании нарушается механизм отрицательной обратной связи. Слабый эффект дексаметазона на уровень кортизола в крови, который называется положительным результатом теста, свидетельствует о наличии эндогенной депрессии.

ДМТ тест выявил у крыс группы "ВБ" нарушение регуляции гипофизарно-адреналовой системы по глюкокортикоидной отрицательной обратной связи.

Инъекция таким животным дексаметазона практически не снижала ни базальный, ни стрессорный уровни сывороточного КС по сравнению с более чем 50% подавлением у контрольных крыс (фиг. 59, табл. 5). Было обнаружено, что введение Мап и FQSE в дозе 0.5 мг/кг, но не 2.5 мг/кг привело к значимому подавлению стресс-индуцированного увеличения содержания КС в крови животных после введения ДМТ (фиг. 59, табл. 5), что может свидетельствовать о нормализации торможения ГГА системы у крыс данных групп.

Введение FQSE в дозировке 2.5 мг/кг оказывало менее выраженное влияние на величину подавления стрессорного уровня гормона экзогенным глюкокортикоидом: А в группе "ВБ+FQSE 2,5" оказалась вдвое ниже, чем в контрольной, но, вместе с тем, превышала таковую в группе "ВБ" (табл. 5, Δ (ФР-ДМТ)).

Таблица 5. Величина подавления стрессорного выброса кортикостерона введением экзогенного стероида

Величина подавления - Δ между ФР и ДМТ в стрессорном уровне кортикостерона, нмоль/л				
Контроль	ВБ	ВБ+ FQSE 0,5	ВБ+FQSE 2,5	ВБ+Мап
303,6	88,9	298,8	146,2	248,5

8.3. Заключение.

Результаты проведенного экспериментального исследования свидетельствуют о том, что десятидневное интраназальное введение пептидного ГАМК-А модулятора FQSE обладает дозозависимым, анксиолитическим (влияние на время в открытых рукавах в ПКЛ, длительность фризинга в ОП), и антидепрессантным (ДМТ, снижение времени иммобилизации в тесте FST) эффектом, и, по-видимому, предотвращает гиперактивацию гипоталамо-гипофизарно-адреналокортикальной гормональной системы и нарушение её регуляции по механизму обратной связи, которые проявлялись у животных в ответ на неизбежный стресс.

Тем самым пептидный ГАМК-А модулятор FQSE проявляет стресс-протективные свойства и демонстрирует эффективность в отношении коррекции постстрессорной тревожности. Эти данные, в сочетании с отсутствием видимых побочных поведенческих эффектов для исследуемых дозировок препарата, позволяют предположить перспективность дальнейшего изучения FQSE и возможность его использования при тревожно-депрессивных расстройствах.

Пример 9. Исследование нейротропных эффектов интраназального введения FQSE в модели хронического иммобилизационного стресса.

Целью работы стояло изучение поведенческих эффектов FQSE, а также оценка относительных уровней содержания белков BDNF, p-p70S6k, p-ERK (1 и 2), p-GSK3 β и p-PKC в структурах мозга крыс после введения FQSE в модели хронического предсказуемого стресса (ХПС).

9.1. Материалы и методы.

9.1.1. Животные.

Работа была выполнена на самцах крыс Sprague-Dawley в возрасте трех-четырех месяцев (N=50). Животные содержались в условиях вивария Научного Центра Неврологии, со свободным доступом к пище и воде и естественном чередовании суточной освещенности. Содержание животных и проведение экспериментов осуществляли в соответствии с международными Европейскими (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council ОП 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes) и Российскими (ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными) биоэтическими правилами.

9.1.2. Модель хронического предсказуемого стресса (ХПС).

Для моделирования депрессивно-подобного состояния экспериментальные животные подвергались стрессующему воздействию - помещению в индивидуальные пеналы-ограничители движения ("Открытая наука", Россия) на 6 часов ежедневно в течение 14 дней (далее ХПС). С целью изучения нейротропного действия пептидного препарата FQSE животные были разделены на 5 групп, по 10 особей в каждой: 1) - интактные животные без "стресса", получавшие интраназально 10 мкл (по 5 мкл в каждую ноздрю) физиологического раствора (контроль); 2) - "стрессированные" животные, получавшие интраназально 10 мкл физиологического раствора (ХПС+физ р-р); 3) - "стрессированные" животные, получавшие внутривентрикулярно флуоксетин в дозе 5 мг/кг (ХПС+ФО, положительный контроль) 4) - "стрессированные" животные, получавшие FQSE интраназально в дозе 0,3 мг/кг в 10 мкл физиологического раствора (ХПС+0,3); 5) - "стрессированные" животные, получавшие FQSE интраназально в дозе 3 мг/кг в 10 мкл физиологического раствора (ХПС+3). Введение препаратов осуществляли ежедневно, за 30 минут до помещения крыс в пеналы-ограничители. Дозы препарата FQSE были выбраны на основании результатов предварительных исследований.

9.1.3. Поведенческое тестирование.

Изменения двигательной активности и эмоционального состояния животных оценивали в тестах "Открытое поле" (ОП) и "Принудительное плавание" (тест Порсолта) через 14 дней после начала эксперимента. Во всех случаях животным вводили препараты за 30 мин до начала теста. Установка ОП представляет собой квадратный короб, со стороной 90 см, высотой 35 см. Пол установки разделена на 25 квадратов. При проведении теста в течение 3 мин оценивали горизонтальную и вертикальную активность животных. Подсчитывали пройденную дистанцию (см), количество пересеченных квадратов и число стоек. Тест Порсолта проводили в цилиндрических стеклянных сосудах высотой 40 см, диаметром 19 см, наполненных водой температурой +24°C. В тесте в течение 8 мин оценивали время активного плавания, во время которого крыса активно работает всеми четырьмя лапами, делает попытки выпрыгнуть из воды, подныривает, а также пассивного плавания, во время которого работают только любые 2 лапы животного и иммобилизации или дрейфа, когда животное неподвижно висит в воде.

Запись и анализ поведенческих экспериментов проводили с помощью системы видео наблюдения за поведением животных "Any maze".

9.1.4. Пробоподготовка образцов мозга.

По окончании поведенческих тестов крыс декапитировали и извлекали мозг для последующей пробоподготовки и исследования белков методом вестерн-блот.

Всего от заказчика была получена 51 проба гомогенизированной ткани головного мозга крыс Sprague Dawley (возрастом 3-4 месяца). 25 проб представляли собой гомогенаты коры больших полушарий головного мозга, 26 проб - гомогенаты гиппокампа, выделенного из головного мозга крыс. Количество гомогенизированной ткани в каждом образце было менее 50 мг. Гомогенизацию проводили в буфере (50 mM Трис-НСl, pH 7,5, 0,15M NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS) в соотношении 1 мл буфера на 100 мг образца. Инкубировали во льду 30 мин. Затем пробы центрифугировали при 12000g, 15 мин, +4°C.

9.1.5. Дизайн эксперимента.

Анализ уровней тотального белка в исследуемых образцах проведен с использованием трихлорэтанол по стандартной методике (Ness et al. (2015). Western blot optimized exercise: an efficient и more environmentally friendly approach in the lab classroom. Biochem. Mol. Biol. Educ, 43 (5), 358-365).

Были проведены все стадии, необходимые для анализа уровней белков BDNF, p-p70S6k (Thr421/Ser424), p-ERK (1 и 2) (Thr202/Tyr204), p-GSK3 β (Ser9), p-PKC (PKCG gamma Thr514) и референсного белка GAPDH в исследуемых образцах методом Western blotting:

Электрофоретическое разделение белков производили по Лэммли в 12% денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ: 0,375 M Трис-НСl, pH 8,8; 0,1% SDS; 12% акриламид) при 10 В/см. В качестве маркеров использовали фирменный набор производителя Thermo Scientific.

Перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану (PVDF 0.45um) производили в буфере для переноса (25 mM Трис; 190 mM глицин; 10% EtOH, pH 8,3) в течение ночи при комнатной температуре.

Качество переноса (при необходимости) оценивали по окрашиванию всех полос на мембране неспецифическим красителем AmidoBlack.

Мембрану отмывали от краски раствором PBS-T (8 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2 mM KH₂PO₄, 3 mM KCl, 0.05% Tween® 20, pH 7.4) и блокировали раствором обезжиренного сухого молока или BSA, в зависимости от антител, в течение 60 мин при комнатной температуре.

Затем мембрану инкубировали в ночь при +4°C с первичными антителами к целевому белку в разведении, рекомендованном производителем. После этого мембрану вновь отмывали и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в течение 1 ч при комнатной температуре. Окраску мембраны осуществляли хемилюминесцентным субстратом Thermo Scientific SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate. Анализ окрашенных мембран проводили на системе детекции и визуализации ChemiDoc (Bio Rad, США).

В качестве количественной оценки были посчитаны интегральные площади полученных пятен при помощи программы Image Lab 5.2.1 и далее отнормированы на количество белка в пробе. На графиках значения представлены в виде % от контрольных значений.

9.1.6. Статистическая обработка данных.

Данные обрабатывали в программе Statistica 10, с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с последующим апостериорным тестом Фишера для сравнения между группами. В случае отклонения от нормального распределения, применяли критерий Краскела-Уоллеса с апостериорным тестом Данна. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего.

9.2. Результаты.

9.2.1. Поведенческие эффекты FQSE в модели ХПС.

9.2.1.1. ОП.

Анализ пройденного пути в ОП не показал достоверных изменений ни после стресса, ни после введения исследуемых веществ (фиг. 60).

9.2.1.2. Тест Порсольты.

Не было выявлено эффектов стресса и введения ФО на длительность активного плавания у животных. Стрессированные крысы получавших FQSE в дозе 3 мг/кг проводили больше времени активно плавая, чем животные в группе "ХПС+физ р-р" (фиг. 61А).

Длительность малоактивного поведения была выше в подгруппе животных, перенесших стресс и получавших инъекции растворителя. Введение пептида FQSE в дозе 3 мг/кг значительно уменьшало время малоактивного проведения в данном тесте по сравнению с группой "ХПС+физ р-р" (фиг. 61Б). Введение ФО не оказывало влияние на активность плавания животных в тесте Порсольты.

9.2.2. Обсуждение результатов поведенческих эффектов FQSE в модели ХПС.

Хронический предсказуемый стресс является одним из основных инструментов для моделирования тревожно-депрессивного фенотипа у грызунов. Однако, часто отмечается, что хронический иммобилизационный стресс является слабым стрессирующим воздействием, и степень воспроизводимости этой модели варьирует от лаборатории к лаборатории. В настоящем исследовании планировалось провести оценку поведения крыс после хронического введения пептида FQSE на фоне иммобилизационного стресса.

В тесте ОП не было отмечено изменения горизонтальной двигательной активности у животных, перенесших стресс и получавших физраствор. Пептид также не оказывал влияния на двигательную активность.

В тесте принудительного плавания используемое стрессогенное воздействие не приводило к изменению времени активного плавания, однако оказало значимое влияние на длительность малоактивного поведения, т.е. суммарного времени иммобилизации и пассивного плавания. Данный эффект стресса нивелировался введением пептида в дозе 3 мг/кг - у животных было отмечено сдвиг соотношения активного/пассивного плавания в сторону активного избегания.

9.2.3. Выводы.

По литературным данным, ХПС приводит к снижению ориентировочно-исследовательской активности в ОП, а также увеличению иммобилизации в тесте принудительного плавания (Bowman et al. (2002). Effect of Chronic Restraining Stress and Estradiol on Open Field Activity, Spatial Memory and Monoaminergic Neurotransmitters in Ovariectomized Rats. *Neurology*, 113 (2), 401-410; Guedri et al. (2017). Chronic Stress Deterrence Induced Neurobiologic Changes and Histological Changes in Rats. *Toxicol. Environ. Sci.*, 9(2), 123-129). Полученные в данной серии экспериментов результаты свидетельствуют о слабом эффекте используемого стрессогенного воздействия на поведение животных. Введение пептида в дозе 0,3 и 3 мг/кг не оказало влияния на двигательную активность животных в тесте ОП, однако в дозе 3 мг/кг - оказывало антидепрессант-подобный эффект, по сравнению с группой "ХПС+физ р-р", что может свидетельствовать о положительном нейротропном эффекте хронического введения FQSE.

9.2.4. Результаты и обсуждения изменений белков после ХПН и введения FQSE.

Результаты полученных блотов представлены на фиг. 62. По результатам, полученным для рефе-

ренного гена GAPDH (фиг. 63А, 63Б), статистически значимых отличий не отмечалось ни у одной исследуемой группы, что свидетельствует о равномерном распределении белков в образцах.

Стрессирующее воздействие приводило к достоверным изменениям уровней белков p-ERK-1 (рост на 60%), p-ERK-2 (рост на 100%), p-GSK3 β (снижение на 40%) и p-РКС (снижение на 53%) в гиппокампе, однако в коре больших полушарий данное воздействие само по себе не повлияло на уровни исследуемых белков. Полученные результаты могут свидетельствовать о мягком режиме стресса в используемой модели. Уровни белка BDNF как в коре больших полушарий (фиг. 64А), так и в гиппокампе (фиг. 64В) не продемонстрировали зависимости ни от стресса, ни от введения ФО. При этом FQSE в обеих дозах (0,3 и 3 мг/кг) приводило к снижению уровней BDNF как в коре (на 20-40%), так и в гиппокампе (на 40%).

Подобное изменение соответствует профилю действия положительных аллостерических модуляторов ГАМК-А рецептора: показано, что предоставление бензодиазепинов приводит к снижению уровней экспрессии BDNF в гиппокампе, гиппоталамусе и коре больших полушарий у взрослых самцов крыс (Kellogg et al. (2000). Sex-specific effects of intrauterine GABA receptor manipulation on pre- и postnatal BDNF expression in rats. *Dev. Brain. Res.*, 121(2), 157-167; Chan et al. (2017). Sex Differences in Brain Neurotrophic Factor Signals and Functions. *J. Neurosci. Res.*, 95 (1-2), 328-335), в коре больших полушарий у мышей (Huoraniemi et al. (2004). Adaptive plasticity induced by diazepam is revealed by profiling the specific expression of the $\alpha 1$ GABA_A receptor. *J. Neurochem.*, 88(5), 1059-1067), а также к снижению уровней белка BDNF в сыворотке крови (Ventrella et al. (2013). Serum levels of brain neurotrophic factors in various neurological diseases. *Biomed Res. Int.*, 2013). При этом в настоящий момент нет единого понимания характера взаимодействия систем ГАМК-А и BDNF (Kim et al. (2017). Brain neurotrophic factor и GABAergic transmission in neurodegeneration и neuroregeneration. *Neural Regen. Res.*, 12 (10), 1733). В некоторых работах отмечается активация BDNF в ответ на ГАМК-А стимуляцию, что в основном связано с эмбриональными или развивающимися нейронами (Porcher et al. (2011). Regulation of positive feedback between the signaling of the γ -aminobutyric acid receptor type A (GABA_A) and the release of brain neurotrophic factor (BDNF) in developing neurons. *J. Biol. Chem.*, 286(24), 21667-21677; Porscher et al. (2018). Mechanism OF BDNF modulation in GABAergic synaptic transmission in healthy и diseased brains. *Front. Cell. Neurosci.*, 12, 273). По всей видимости, характер изменений в уровнях BDNF в ответ на ГАМК-А активацию может зависеть от типа исследуемых нейронов и отделов мозга, режима и длительности предоставления ГАМК-А модуляторов, типа используемой экспериментальной модели (Kim et al. (2017). Brain neurotrophic factor и GABAergic transmission in neurodegeneration и neuroregeneration. *Neural Regen. Res.*, 12 (10), 1733). При этом, полученные нами данные позволяют предположить, что изменение уровня BDNF при введении FQSE свидетельствует об активации ГАМК-системы.

Уровень фосфорилированной формы белка p-p70S6k (Thr421/Ser424) не зависел ни от стресса, ни от введения ФО как в коре больших полушарий (фиг. 65А), так и в гиппокампе (фиг. 65Б). При этом в группах животных, получавших FQSE в обеих дозах, наблюдалась индукция уровней данного белка как в коре (на 80%), так и в гиппокампе (на 170-200%). S6 киназа является одним из основных эффекторов mTORC1 сигнального каскада, а ее активация ассоциирована с повышением активности биосинтеза белков (Mao et al. (2018). The role of mTOR in glucose и lipid metabolism. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(7), 2043). Известно, что активация ГАМК-А рецептора приводит к активации mTORC1-каскада в целом и повышению уровня p-p70S6k (Thr421/Ser424) в частности (Thanapreedawat et al. (2013). Influence of GABA on brain protein synthesis mediated by the mammalian target of rapamycin pathway. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 120808; Weston et al. (2012). Multiple roles for mammalian target of rapamycin signaling in glutamatergic и GABAergic synaptic transmission. *J. Neurosci. Res.*, 32(33), 11441-11452). Активация S61 и mTORC1 в целом обладает антидепрессантным эффектом и наблюдается при введении кетамина. При этом антидепрессантный эффект кетамина нейтрализуется при использовании рапамицина, что свидетельствует о значительной роли mTORC1 в опосредовании данного эффекта (Dwyer et al. (2015). Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling in prefrontal cortex controls depressive behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 112(19), 6188-6193). Из полученных нами результатов можно сделать вывод, что высокий уровень фосфорилирования S6k в ответ на введение FQSE свидетельствует об активации mTORC1 - каскада, что гипотетически может быть инициировано активацией ГАМК-А.

В гиппокампе уровни фосфорилированных белков p-ERK 1 (фиг. 66Б) и p-ERK 2 (фиг. 67Б) в ответ на стресс выросли на 60% и 100% соответственно. FQSE в обеих дозах привело к нормализации уровней p-ERK 1 и p-ERK 2 до уровня интактного контроля. Некоторые литературные данные указывают на то, что в отдельных моделях стресса наблюдается повышенное фосфорилирование p-ERK $^{1/2}$ в мозге (Kim et al. (2018). Social support rescues acute stress-induced cognitive impairments by modulating ERK1/2 phosphorylation in adolescent mice. *Sci. Rep.*, 8(1), 1-13; Hebert et al. (2005). Single и repeated immobilization stress differentially trigger induction и phosphorylation of several transcription factors и mitogen-activated protein kinases in the rat locus coeruleus. *J. Neurochem.*, 95(2), 484-498), что хорошо согласуется с нашими результатами. Также известно, что аллостерические модуляторы ГАМК-А (в частности, препараты группы бензодиазепинов) способны ингибировать фосфорилирование ERK системы (Kim et al. (2012). Hippocampal

extracellular signaling-regulated kinase signaling has a role in passive avoidance memory retrieval induced by GABA receptor modulation in mice. *Neuropsychopharmacology*, 37 (5), 1234).

Характер действия пептида FQSE в данном случае соответствует профилю действия положительных аллостерических модуляторов ГАМК-А. При этом все же необходимо констатировать, что на других моделях, описанных в литературе, депрессивно-подобное состояние и сильный хронический стресс ассоциированы с ингибированием фосфорилирования p-ERK $^{1/2}$ и MAPK киназного каскада в целом, а антидепрессантный эффект, в частности обеспечиваемый кетамином, связан с активацией данной системы (Reus et al. (2014). MAPK signaling correlates with the antidepressant effects of ketamine. *J. Psychiatr. Res.*, 55, 15-21). В общем виде, полученные данные однозначно свидетельствуют о влиянии пептида FQSE на MAPK сигнальный каскад, а определенная направленность изменений может быть связана с мягкой моделью стресса.

Уровень белка p-ERK 1 (Thr 202) в коре больших полушарий не изменялся ни в условиях стресса, ни при введении веществ (фиг. 66А). Уровень белка p-ERK 2 (Tyr204) в коре не продемонстрировал изменений в ответ на стресс, но снизился в ответ на введение ФО и пептида FQSE в дозе 0,3 мг/кг на фоне стресса (фиг. 67А). Данный эффект, как обсуждалось выше, может быть ассоциирован с модулированием ГАМК-А рецептора. В силу того, что стресс не повлиял на уровни фосфорилирования ERK $^{1/2}$ в коре, полученные данные требуют верификации на другой модели стресса.

В коре больших полушарий уровень фосфорилированной формы белка p-PKC (Thr514) не продемонстрировал зависимости ни от стресса, ни от ФО, ни от FQSE в дозе 0,3 мг/кг (фиг. 68А). При этом FQSE в дозе 3 мг/кг приводил к снижению p-PKC на 51%. Данный эффект гипотетически можно объяснить сниженным уровнем BDNF в данной группе, учитывая тот факт, что p-PKC является участником каскада, запускаемого TrkB (Duman et al. (2012). Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci.*, 35(1), 47-56). В дозе FQSE 3 мг/кг снижение BDNF было более выражено, чем при 0,3 мг/кг (фиг. 64А), что может объяснять отсутствие влияния более низкой дозы на уровень p-PKC. Помимо этого, сниженный уровень p-PKC может косвенно указывать на ингибирование mTORC2-зависимого каскада (что является антагонистичным процессом по отношению к активации mTORC1), для которого p-PKC является эффектором (Mao et al. (2018). The role of mTOR in glucose and lipid metabolism. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(7), 2043). Однако вышеописанные результаты и выдвинутые предположения не позволяют сделать каких-либо определенных выводов о характере влияния FQSE на активность p-PKC.

В гиппокампе стресс вызвал значимое снижение уровня p-PKC (фиг. 68Б), что в целом по литературным данным соответствует депрессивно-подобному состоянию (Thiels et al. (2000). Protein phosphatase-mediated regulation of protein kinase C during long-term depression in the adult hippocampus in vivo. *J. Neurosci.*, 20(19), 7199-7207; Shelton et al. (2009). Protein kinases A and C in post-mortem prefrontal cortex from persons with major depression and normal controls. *Int. J. Neuropsychoph.*, 12(9), 1223-1232). При этом ни ФО, ни пептид FQSE не способствовали нормализации его уровня - значения в данных группах статистически не отличаются от группы стрессированного контроля. Необходимо отметить, что отсутствие активации p-PKC пептидом FQSE в гиппокампе можно воспринимать в качестве позитивного эффекта: известно, что высокая активность PKC ассоциирована с ее способностью фосфорилировать бензодиазепин-специфичный сайт в ГАМК-А рецепторе (в частности, в его $\gamma 2$ субъединице), тем самым снижая аффинность модуляторов данной группы к рецептору и ингибируя их эффект (Gao et al. (2005). Activation of protein kinase C reduces benzodiazepine potency at GABA_A receptors in NT2-N neurons. *Neuropharmacology*, 48(3), 333-342; Qi et al. (2007). Protein kinase C ϵ regulates γ -aminobutyrate type A receptor sensitivity to ethanol and benzodiazepines through phosphorylation of $\gamma 2$ subunits. *J. Biol. Chem.*, 282(45), 33052-33063). Отмечается, что описанный выше механизм может лежать в основе развития толерантности к препаратам класса бензодиазепинов: активация PKC при их хроническом приеме приводит к фосфорилированию рецептора ГАМК-А и снижению его чувствительности к данным препаратам (Vinkers et al. (2012). Mechanisms underlying tolerance after long-term benzodiazepine use: a future for subtype-selective GABA_A receptor modulators? *Adv. Pharmacol. Sci.*, 2012). Отсутствие активации PKC в данном эксперименте вероятнее всего может свидетельствовать о том, что предоставление пептида FQSE не активирует механизм возникновения толерантности.

Уровень белка p-GSK3 β не продемонстрировал зависимости ни от одного из воздействий в коре (фиг. 69А), а в гиппокампе (фиг. 69Б) был снижен в ответ на стресс (на 40%), при этом не демонстрируя ответа на введение флуоксетина или FQSE.

Резюмируя, можно сделать вывод, что характер действия FQSE на уровне ряда протестированных белков соответствует профилю действия положительных аллостерических модуляторов ГАМК-А рецептора: снижение уровня BDNF и уровней фосфорилированных форм ERK $^{1/2}$ характерно для действия препаратов класса бензодиазепинов. Высокий уровень фосфорилирования p70S6k как в коре, так и в гиппокампе, в ответ на введение FQSE свидетельствует об активации mTORC1-каскада и соответствует выраженному антидепрессантному эффекту. Повышенное фосфорилирование p70S6k может обуславливать поведенческие эффекты предоставления FQSE: значимое увеличение времени активного плавания и вре-

мени дрейфа, а также уменьшение времени пассивного плавания по сравнению с крысами группы стрессового контроля в тесте Порсолта может быть результатом активации mTORC1-каскада (Chen et al. (2015). AMPA receptor-mTOR activation is required for the antidepressant-like effects of sarcosine during the forced swim test in rats: Insertion of AMPA receptor may play a role. *Front. Behav. Neurosci.*, 9, 162). Данный эффект также может свидетельствовать об активации ГАМК-А рецептора, в ходе которой должны осуществляться индукция mTORC1-каскада в целом и повышение уровня p-p70S6k (Thr421/Ser424) в частности.

При этом, однако, нельзя не упомянуть о том, что проанализированные в ходе данной работы маркеры по сути являются участниками универсальных каскадов, регулируемых большим количеством воздействий, что не позволяет однозначно заявлять о ГАМК-А-опосредованном действии FQSE.

9.2.5. Выводы.

Стрессирующее воздействие ХПС приводило к достоверным изменениям уровней белков p-ERK-1, p-ERK-2, p-GSK3 β и p-PKC в гиппокампе, однако в коре больших полушарий данное воздействие само по себе не повлияло на уровни исследуемых белков. Полученные результаты могут свидетельствовать о мягком режиме стресса (low-grade stress) в используемой модели.

Интраназальное введение FQSE в обеих дозах (0,3 и 3 мг/кг) приводило к снижению уровней BDNF как в коре (на 20-40%), так и в гиппокампе (на 40%), что, в целом, соответствует профилю действия положительных аллостерических модуляторов ГАМК-А рецептора. Использование BDNF в качестве маркера активации ГАМК-А рецептора возможно в дальнейших экспериментах.

Пример 10. Экспериментальный радиорецепторный поиск специфического связывания соединения [^3H] FQSE in vitro.

10.1. Цель исследования.

Этап 1. Оценить величину IC₅₀ немеченого пептида FQSE по отношению к связыванию [^3H] SR95531 (антагонист ГАМКА-рецепторов) при добавлении в инкубационную среду 50 мкл исследуемого соединения в конечных концентрациях в диапазоне 10⁻¹⁰-10⁻⁴ М.

Этап 2. Определение собственных мест связывания исследуемого пептида FQSE в структурах мозга (с использованием меченого по тритию пептида):

при выделении плазматических мембран с ГАМК-А рецепторами коры мозга (по модифицированным методикам Ito и Hawkinson (Ito et al. (1992). Effects of bicuculline on [^3H] SR 95531 binding in discrete regions of rat brains. *Neurochem. res.*, 17(4), 307-313; Hawkinson et al. (1996). Steroid inhibition of [^3H] SR 95531 binding to the GABAA recognition site. *Eur. J. Pharmacol.*, 304(1-3), 141-146));

при выделении плазматических мембран целого мозга с сайтом α + β - ГАМК-А рецепторов (по модифицированным методикам Maldifassi и Ramerstorfer (Maldifassi et al. (2016). Molecular mode of action of CGS 9895 at α 1 β 2 γ 2 GABAA receptors. *J. Neurochem.*, 138(5), 722-730; Ramerstorfer et al. (2011). The GABAA receptor α + β -interface: a novel target for subtype selective drugs. *J. Neurosci.*, 31(3), 870-877));

при выделении плазматических мембран мозга по иным методикам.

Этап 3. Радиолигандный анализ с использованием [^3H] FQSE, вытеснение его различными "классическими" лигандами ГАМК-А рецептора, проводим тремя способами:

по процедуре, установленной на предыдущем этапе исследования (длительность инкубации - 25 мин при T_{комн.}) с полным списком лигандов;

с увеличением времени инкубации до 40-50 минут по полному или уточненному списку лигандов;

с предварительной инкубацией "холодных" известных лигандов и последующим добавлением метки и пептида (согласно ожиданиям, в подобном протоколе у "горячего" пептида снизится связывание относительно интактных мембран, т.к. "холодный" лиганд займет его сайт - опосредованное определение конкуренции).

Этап 4. Оценить величину IC₅₀ немеченого пептида по отношению к связыванию [^3H] флуниотриазепама или [^3H] диазепама при добавлении в инкубационную среду 50 мкл исследуемого соединения в конечных концентрациях в диапазоне 10⁻¹⁰-10⁻⁴ М.

Этап 5. Радиолигандный анализ in vitro влияния соединений, воздействующих на различные сайты ГАМК-рецепторов на специфическое связывание [^3H]-FQSE мембранами мозга крыс: по процедуре с 25 мин инкубацией; по процедуре с 50 мин инкубацией; по процедуре с преинкубацией.

Этап 6. Получение данных с отрицательным контролем для мест связывания [^3H]-FQSE: выделение мембран по специфической методике (NMDA, с добавлением лиганда МК-801), отличающейся от полученной в предыдущих экспериментах, и проверка отсутствия в данном случае мест связывания для пептида.

10.2. Материалы и методы.

Исследования проводили на самцах белых крыс весом 250-300 г.

Животных декапитировали, головной мозг извлекали на льду и выделяли структуры мозга по общепринятой схеме (Glowinski et al. (1966). Regional studies OF catecholamines in the rat brain-I: the disposition OF [^3H] norepinephrine, [^3H] dopamine и [^3H] dopa in various regions OF the brain. *J. Neurochem.*, 13(8), 655-669) для проведения радиорецепторного анализа. Проведение экспериментов осуществляли в соот-

ветствии с международными Европейскими (Directive 2010/63/EU OF the European Parliament and OF the Council OF 22 September 2010 on the protection OF animals used for scientific purposes) и Российскими (ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными) биоэтическими правилами.

10.2.1. Этап 1. Выделение плазматических мембран с ГАМК-А рецепторами коры мозга.

Приготовление мембранных препаратов, содержащих ГАМК-рецепторы коры мозга крыс проводили по модифицированным методам (Ito et al. (1992). Effects of bicuculline on [³H] SR 95531 binding in discrete regions OF rat brains. *Neurochem. res.*, 17(4), 307-313; Hawkinson et al. (1996). Steroid inhibition of [³H] SR 95531 binding to the GABAA recognition site. *Eur. J. Pharmacol.*, 304(1-3), 141-146). После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C. В день эксперимента фронтальную кору измельчали в гомогенизаторе Поттера "тефлон-стекло" в 20 объемах ледяного буфера (0.32 М Сахароза; pH 7.1). Гомогенат центрифугировали в ультрацентрифуге "Optima L-70K" (Beckman Coulter) в течение 10 мин при 1000 g. Супернатант повторно центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в 20 мл холодной дистиллированной воды и центрифугировали 8000 g 20 мин. Супернатант и желтый надосадочный слой повторно центрифугировали при 48000 g 20 мин. Осадок суспендировали в 0.05 М Трис-цитратном буфере (pH 7.1) и центрифугировали 48000 g 20 мин. Полученную мембранную фракцию замораживали и хранили при -80°C. В день эксперимента мембраны суспендировали в 40 объемах 0.05 М.

Трис-цитратного буфера (pH 7.1) и центрифугировали при 48000 g 20 мин. Полученный осадок суспендировали в 40 объемах 0.05 М Трис-цитратного буфера (pH 7.1) и инкубировали при 24°C в течение 30 мин и снова центрифугировали при 48000 g 20 мин. Конечный осадок ресуспендировали в свежем буфере.

10.2.2. Радиолигандный анализ ГАМК-рецепторов.

Инкубационная смесь (конечный объем 0,5 мл) содержала 50 мкл [³H] SR 95531, 250 мкл буфера и 200 мкл белковой суспензии мембран, для неспецифического связывания добавляли 50 мкл немеченого лиганда SR 95531 (габазина) или немеченый пептид FQSE. Реакционную смесь инкубировали при 40°C в течение 1 ч.

10.2.3. Этап 2. Определение собственных мест связывания исследуемого пептида FQSE в структурах мозга (с использованием меченого по тритию пептида).

Выделение плазматических мембран осуществляли по различным модифицированным методикам (Ito et al. (1992). Effects of bicuculline on [³H] SR 95531 binding in discrete regions of rat brains. *Neurochem. res.*, 17(4), 307-313; Hawkinson et al. (1996). Steroid inhibition of [³H] SR 95531 binding to the GABAA recognition site. *Eur. J. Pharmacol.*, 304(1-3), 141-146; Asano et al. (1979). Identification of inosine и hypoxanthine as endogenous ligus for the brain benzodiazepine-binding sites. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76(2), 977-981; Maldifassi et al. (2016). Molecular mode of action of CGS 9895 at $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABAA receptors. *J. Neurochem.*, 138(5), 722-730; Ramerstorfer et al. (2011). The GABAA receptor $\alpha + \beta$ - interface: a novel target for subtype selective drugs. *J. Neurosci.*, 31(3), 870-877.). Затем, на выделенных мембранах проводился радиолигандный анализ *in vitro* с использованием [³H] FQSE и его немеченой формы. В результате радиолигандного анализа с использованием плазматических мембран, выделенных по вышеупомянутым модифицированным методикам, мы получили процент специфического связывания FQSE от общего связывания в диапазоне от 0 до 47%. Для дальнейшей работы была выбрана методика с наивысшим процентом специфического связывания. Далее описывается её протокол.

10.2.4. Выделение плазматических мембран и радиолигандный анализ.

После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературном холодильнике при -80°C. В день эксперимента ткань мозга (кору, около 300 мг) размельчали в гомогенизаторе Поттера "тефлон-стекло" в 25 объемах буфера (50 мМ Трис-НСl, pH 7.4). Гомогенат центрифугировали при 40000 g 20 мин. Полученный осадок гомогенизировали в буфере (50 мМ Трис-НСl, pH=7.4) и опять центрифугировали при 40000 g 20 мин. Подобную процедуру проводили ещё раз. Осадок ресуспендировали в 15 мл того же буфера и использовали в радиолигандном анализе. Инкубационная смесь (конечный объем 0,5 мл) содержала 50 мкл [³H] FQSE, 200 или 250 мкл буфера (50 мМ Трис-НСl, pH=7,4) и 200 мкл белковой суспензии мембран, для неспецифического связывания добавляли 50 мкл немеченого FQSE.

После этого опытным путём, через изменения времени и температуры, подбирали оптимальный режим инкубации для связывания FQSE с собственными местами связывания в коре мозга крыс: реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 25 мин (табл. 6).

Таблица 6. Различные режимы инкубации в радиолигандном анализе

Режимы инкубации	Время инкубации, мин	Температура инкубации, °С	% специфического связывания от общего связывания
1	10	4	47
2	20	4	48
3	10	37	72
4	20	37	79
5	30	37	77
6	20	24	75
7*	25	24	86
8	30	24	78

* - выбранный режим инкубации.

При выбранном режиме инкубации проводили изменения состава буфера посредством введения в него различных солей -NaCl, KCl, KН₂PO₄, CaCl₂, MgCl₂. При этом % специфического связывания от общего снижался до 63%.

Далее, используя данную модификацию выделения плазматических мембран, изучали влияние лигандов известных сайтов различных рецепторов (табл. 7) на связывание [³H] FQSE с собственными специфическими местами связывания для того, чтобы определить природу последних.

Таблица 7. Влияние лигандов различных рецепторов на связывание [³H]-FSQE с FSQE-связывающими сайтами коры *in vitro*

Исследуемое вещество	Производитель	Рецептор-мишень
Spiperone	Sigma Aldrich	Антагонист D ₂ /D ₄ дофаминовых рецепторов; 1B-адреноблокатор; антагонист серотониновых 5-HT _{2A} /5-HT ₁ рецепторов
Sulpiride	Sigma Aldrich	Селективный антагонист D ₂ , D ₃ и 5-HT _{1A} -рецепторов
Ifenprodil	Santa Cruz	Ингибитор рецептора NMDA рецептора, в частности, Gly-сайта субъединицы 1 (GluN1) и Glu-связывающего сайта субъединицы 2 (GluN2B)
Кетансерин	Sigma Aldrich	Неселективный антагонист 5-HT _{2a} -рецепторов
7-OH-DPAT	Sigma Aldrich	Селективный агонист D ₃ -рецепторов
Галоперидол	Gedeon Richter	Антагонист D ₂ , D ₃ , и D ₄ дофаминовых рецепторов. Лиганд σ ₁ -рецепторов.
GBR-12909	Tocris Bioscience	Конкурентный ингибитор обратного захвата дофамина
CGS-9895	Sigma Aldrich	Усиливает ГАМК-индуцированные токи в рецепторах, содержащих субъединицу α ₆ , а также является лигандом сайта α ₆ /β- ГАМК-А рецептора
Диазепам	Sigma Aldrich	Лиганд бензодиазепинового сайта ГАМК-А рецептора
SR-95531 (gabazine)	Santa Cruz	Селективный антагонист ГАМК-А рецептора
Ro-256981	Santa Cruz	Селективный антагонист GluN2B субъединицы NMDA рецептора

Глутамат	Sigma Aldrich	Агонист глутаматных рецепторов
Мусцимол	Fluka	Агонист ГАМК-А рецептора
Бикукуллин	Fluka	Конкурентный антагонист ГАМК-А рецептора
Никотин	Tocris Bioscience	Агонист ацетилхолиновых nACh рецепторов
LY-354740	Santa Cruz	Селективный агонист глутаматных mGluII рецепторов
МК-801	Sigma Aldrich	Неконкурентный антагонист NMDA рецепторов
Глицин	Sigma Aldrich	Агонист глицинового сайта NMDA рецептора

10.2.5. Жидкостно-сцинтилляционная спектрометрия.

По окончании инкубации пробы фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/C (Whatman), предварительно смоченные в 0.3% полиэтиленимине в течение 2 ч при комнатной температуре. Каждую пробирку промывали два раза холодным буфером, затем фильтры промывали два раза тем же объемом буфера. Фильтры просушивали на воздухе и переносили в сцинтилляционные флаконы. Фильтры заливали 5 мл сцинтилляционной жидкости на основе толуола (4 г PPO, 0.2 г POPOP на 1 л толуола). Радиоактивность проб определяли на счетчике Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer) с эффективностью счета 42-46%. Концентрацию белка измеряли по стандартной методике Лоури (1951).

10.2.6. Этап 3. Радиолигандный анализ с использованием [³H] FQSE, вытеснение его различными "классическими" лигандами ГАМК-А рецептора (табл. 8).

Приготовление образцов и процедуру радиолигандного анализа см. в разделе 10.2.3.

Таблица 8. Список "классических" лигандов ГАМК-А рецепторов

Вещество	Мишень
ГАМК	Лиганд ГАМК сайта ГАМК рецептора
Диазепам	Лиганд бензодиазепинового (БЗД) сайта ГАМК-А рецепторов (содержащих α_{1-3} , и в меньшей степени α_5 субъединицы)
Золпидем	Агонист БЗД сайта ГАМК-А рецепторов (содержащих преимущественно α_1 субъединицы)
Прегненолон	Негативный аллостерическим модулятор (НАМ) нейростероидного сайта (НС) ГАМК-А рецепторов
Флумазенил	Антагонист БЗД сайта ГАМК-А рецепторов содержащих α_5

10.2.7. Этап 4. Радиолигандный анализ ГАМКА-рецепторов (бензодиазепиновый сайт).

Инкубационная смесь (конечный объем 0,5 мл) содержала 50 мкл [³H] Флунизтазепам, 250 мкл буфера и 200 мкл белковой суспензии мембран, для неспецифического связывания добавляли 50 мкл немеченного лиганда диазепам или немеченый пептид FQSE.

Процедура жидкостно-сцинтилляционной спектрометрии и обработка результатов проходили так же, как описано в разделе 10.2.5.

Первая модификация радиолигандного анализа бензодиазепиновых рецепторов *in vitro* была следующей: инкубацию проводили 30 мин при 40°C и при 24°C, для неспецифического связывания использовали следующие комбинации немеченых веществ: 1) Диазепам 10⁻⁶М + FQSE 10⁻⁴М; 2) Диазепам 10⁻⁶М + FQSE 10⁻⁵М; 3) Диазепам 10⁻⁶М (контроль).

Вторая модификация была схожа с описанной выше с той только разницей, что проводилась процедура преинкубации, которая длилась 25 мин, и немеченый FQSE добавляли во время преинкубации, а диазепам позже только во время инкубации вместе с [³H] флунизтазепамом.

10.2.8. Этап 5. Радиолигандный анализ *in vitro* влияния различных лигандов ГАМК-А (табл. 9) на специфическое связывание [³H]-FQSE мембранами мозга крыс.

Методику получения препаратов мембран и проведение радиолигандного анализа смотри 10.2.3.-10.2.5.

Таблица 9. Список лигандов ГАМК-А рецепторов

Вещество	Мишень
Isoguvacine	Агонист ГАМК-А рецепторов
SCS	Антагонист ГАМК-А рецепторов
Bretanezil	Селективный ГАМК $\alpha 1$ агонист
SL 651498	Селективный ГАМК $\alpha 2$ агонист
MK0343	Селективный ГАМК $\alpha 3$ агонист
THDOC	Селективный ГАМК $\alpha 4,6$ агонист
TB21007	Селективный ГАМК $\alpha 5$ обратный агонист
Gaboxadol (THIP)	Частичный ГАМК $\alpha 4\beta 3\delta$ агонист
FGIN-1-27	Специфичный лиганд митохондриального диазепам-связывающего рецептора (DBI)
Allopregnanolone	Позитивный аллостерический модулятор (ПАМ) ГАМК-А рецептора

10.2.9. Этап 6. Радиолигандный анализ NMDA-рецепторов (отрицательный контроль мест связывания [^3H]-FQSE).

10.2.9.1. Выделение плазматических мембран с NMDA-рецепторами гиппокампа.

Выделение плазматических мембран гиппокампа проводили по модифицированным методам (Zhou et al. (1997). (2S, 4R)-4-methylglutamic acid (SYM 2081): a selective, high-affinity ligand for kainate receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 280(1), 422-427., LePage et al. (2005). Differential binding properties OF [^3H] dextrophan and [^3H] MK-801 in heterologously expressed NMDA receptors. *Neuropharmacol.*, 49(1), 1-16). После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературном холодильнике при -80°C . В день эксперимента гиппокампы размельчали в гомогенизаторе Поттера "тефлон-стекло" в 10 объемах буфера №1 (5 мМ HEPES, 4.5 мМ Трис, 0.32 М сахароза, pH 7.6). Гомогенат разбавляли 50 объемами буфера №2 (5 мМ HEPES, 4.5 мМ Трис, pH 7.6) и центрифугировали при 1000g 10 минут на ультрацентрифуге "Optima L-70K" (Beckman Coulter). Супернатант сливали и вновь центрифугировали при 25000g 20 мин. Для увеличения выхода белка эту операцию проводили дважды. Полученный осадок ресуспензировали в 50 объемах буфера №2 и центрифугировали при 8000g 20 мин. Супернатант и верхний коричневый осадочный слой сливали и центрифугировали при 25000g 20 мин. Осадок ресуспензировали в 50 объемах буфера №3 (5 мМ HEPES, 4.5 мМ Трис, 1 мМ Na4EDTA, pH 7.6) и троекратно центрифугировали при 25000g 20 мин. Полученный осадок ресуспензировали в 50 объемах буфера № 2 и однократно центрифугировали при 25000g 20 мин. Конечный осадок сохраняли в 5 объемах буфера № 2 и замораживали в криобирках в жидком азоте. В день анализа ткань размораживали, разбавляли в 10 объемах буфера №2, центрифугировали при 25000g 20 мин. Осадок ресуспензировали в необходимом количестве буфера №2.

10.2.11. Радиолигандный анализ NMDA-рецепторов.

Инкубационная смесь (конечный объем 0,5 мл) содержала 50 мкл [^3H](+)МК-801, 250 мкл буфера и 200 мкл белковой суспензии мембран, для неспецифического связывания добавляли 50 мкл немеченного лиганда ((+)МК-801, 1 мМ). Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч.

10.2.12. Обработка и представление результатов.

В экспериментах *in vitro* величину IC_{50} по отношению к связыванию меченых лигандов определяли при добавлении в инкубационную среду 50 мкл исследуемых соединений в конечных концентрациях в диапазоне 10^{-10} - 10^{-4} М. Объем инкубационной смеси составлял 500 мкл. Для построения кривых вытеснения радиоактивных лигандов каждая концентрация исследуемого вещества была взята в 3 повторностях.

10.2.13. Статистический анализ.

Для обработки результатов радиолигандного связывания использовали программу GraphPad Prism 4 и Statistica 6.0. Результаты представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего.

10.3. Результаты.

10.3.1. Этап 1.

FQSE не влиял на специфическое связывание [^3H] SR 95531 с ГАМК-А рецепторами во всех используемых концентрациях (IC_{50} были выше 100 мкмоль/л), что свидетельствует об отсутствии у исследуемого вещества прямого взаимодействия с ГАМК сайтом ГАМК-А рецептора (фиг. 70).

10.3.2. Этап 2.

Были найдены специфические места связывания FQSE с $IC_{50}=2\pm 0.1$ мкМ (фиг. 71).

FSQE не влиял на специфическое связывание меченых лигандов выбранных рецепторов во всём интервале используемых концентраций ($IC_{50}>100$ мкмоль/л), что указывает на отсутствие прямого взаимодействия изучаемого соединения с дофаминовыми, серотониновыми, ацетилхолиновыми, глутаматными рецепторами (фиг. 71).

10.3.3. Этап 3.

10.3.3.1. 25 мин инкубации при $T_{комн}$. FSQE не влиял на специфическое связывание меченых лигандов во всём интервале используемых концентраций, что указывает на отсутствие прямого взаимодействия изучаемого соединения с выбранными сайтами ГАМК-А рецепторов, величины IC_{50} составили >100 мкмоль/л (фиг. 72).

10.3.3.2. Увеличение времени инкубации.

На втором этапе инкубация также проходила при комнатной температуре, но ее время увеличивалось и составляло 50 мин, 1 ч, 1 час 30 мин. Из всех изучаемых лигандов (величины IC_{50} составили >100 мкмоль/л) в трёх временных вариантах инкубации только диазепам и прегненолон влияли на специфическое связывание меченого пептида (фиг. 73, табл. 10).

Таблица 10. Потенциал конкурентного взаимодействия диазепама и прегненолона с FQSE-связывающими сайтами коры (IC_{50} , мкмоль/л). Среднее \pm стандартная ошибка среднего

Вещество	IC_{50} при разном времени инкубации		
	50 мин	1 час	1 час 30 мин
Диазепам	$52\pm 0,3$	$89\pm 0,3$	$95\pm 0,2$
Прегненолон	$36\pm 0,2$	$77\pm 0,2$	$75\pm 0,3$

10.3.3.3. Протокол с пре-инкубацией.

На третьем этапе инкубация проходила при комнатной температуре, но порядок помещения в инкубационную смесь её составляющих был другим: вначале в буфер добавляли белковую суспензию мембран и немеченый лиганд ГАМК-А рецептора (пре-инкубация), а через определенное количество времени - $[^3H]$ -FQSE (инкубация). При связывании немеченого вещества с собственными сайтами FQSE, количество связавшегося $[^3H]$ -FQSE должно уменьшаться, что может указывать на родство сайтов связывания изучаемых лигандов с местами связывания FQSE.

В данной модификации опыта было два временных варианта: 1) преинкубация -20 мин, инкубация - 25 мин; 2) преинкубация - 1 ч, инкубация - 30 мин. И в том и в другом случае количество связавшегося $[^3H]$ -FQSE уменьшалось только при проведении пре-инкубации с диазепамом и прегненолоном ($p<0,05$; Т-тест Стьюдента) (табл. 11).

Таблица 11. Влияние преинкубации с диазепамом и прегненолоном на количество мест связывания меченого $[^3H]$ FQSE. За контроль (100%) принимались пробы, преинкубированные без какого-либо лиганда

Пре-инкубация с веществом	Влияние пре-инкубации на количество мест связывания $[^3H]$ -FQSE	
	Пре-инкубация 20 мин + инкубация 25 мин	Пре-инкубация 1 час + инкубация 30 мин
Диазепам	90	86
Прегненолон	87	81

10.3.4. Этап 4.

Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Результаты, полученные на данном этапе, представлены в табл. 12.

Таблица 12. Влияние FQSE на связывание бензодиазепинов с соответствующим сайтом ГАМК-А рецептора. За контроль (100%) принимаются значения специфического связывания, для которых в неспецифическом связывании используется только диазепам в соответствующей модификации радиолигандного анализа

Модификация	Специфическое связывание [³ H]-флунизепамом относительно контроля, %			
	Инкубация 30 минут		Инкубация 30 минут	
	4 ⁰ С	24 ⁰ С	4 ⁰ С	24 ⁰ С
Диазепам 10 ⁻⁶ М	100	100	100	100
Диазепам 10 ⁻⁶ М + FQSE 10 ⁻⁴ М	100,3	100,9	101,1	100,6
Диазепам 10 ⁻⁶ М + FQSE 10 ⁻⁵ М	100,0	100,7	101,1	99,8

Во всех используемых модификациях радиолигандного анализа бензодиазепиновых рецепторов *in vitro* FQSE не оказывал влияния на связывание бензодиазепинов с соответствующим сайтом ГАМК-А-рецептора.

10.3.5. Этап 5.

На первом этапе инкубация проводилась 25 и 50 мин (указанные временные интервалы были выбраны на основании данных, полученных в результате предыдущих исследований) при комнатной температуре. Ни одно из изучаемых веществ не влияло на специфическое связывание меченого пептида во всём интервале используемых концентраций ($p < 0,05$; Т-тест Стьюдента), величины IC_{50} составили >100 мкмоль/л (фиг. 74).

На втором этапе инкубация проходила при комнатной температуре, но порядок помещения в инкубационную смесь её составляющих был другим: вначале в буфер добавляли белковую суспензию мембран и немеченый лиганд ГАМК-А рецептора в двух концентрациях 10^{-4} и 10^{-5} (пре-инкубация), а через 1 ч - [³H]-FQSE (инкубация). Инкубация длилась 25 мин. Указанные временные интервалы были выбраны на основании данных, полученных в результате предыдущих исследований. При связывании немеченого вещества с собственными сайтами FQSE, количество связавшегося [³H]-FQSE должно уменьшаться, что может указывать на родство сайтов связывания изучаемых лигандов с местами связывания FQSE.

В данной модификации опыта ни одно из исследуемых веществ в условиях выбранной преинкубации не изменяло количество связавшегося [³H]-FQSE ($p < 0,05$; Т-тест Стьюдента) (табл. 13).

Таблица 13. Влияние преинкубации с исследуемыми веществами на количество мест связывания [³H]-FQSE. За контроль (100%) принимаются пробы, в которых белковая суспензия мембран преинкубировалась без добавления немеченых лигандов

Вещество, используемое в преинкубации		Количество связавшегося [³ H]-FQSE после преинкубации относительно контроля, %
Isoguvacine	10 ⁻⁴ M	102.56
	10 ⁻⁵ M	104.33
SCS	10 ⁻⁴ M	93.93
	10 ⁻⁵ M	104.58
Bretanezil	10 ⁻⁴ M	94.79
	10 ⁻⁵ M	104.51
SL 651498	10 ⁻⁴ M	101.36
	10 ⁻⁵ M	106.98
MK0343	10 ⁻⁴ M	98.58
	10 ⁻⁵ M	104.65
THDOC	10 ⁻⁴ M	100.59
	10 ⁻⁵ M	103.38
TB21007	10 ⁻⁴ M	103.14
	10 ⁻⁵ M	105.28
Gaboxadol	10 ⁻⁴ M	99.31
	10 ⁻⁵ M	100.25
FGIN-1-27	10 ⁻⁴ M	102.65
	10 ⁻⁵ M	102.33
Allopregnanol one	10 ⁻⁴ M	100.90
	10 ⁻⁵ M	103.18

10.3.6. Этап 6.

Были получены данные с отрицательным контролем для мест связывания [³H]-FQSE. Для этого были выделены мембраны по специфической методике, мембраны с NMDA-рецепторами, на которых было проверено специфическое связывание соответствующего лиганда МК-801.

В результате радиолигандного анализа *in vitro* NMDA-рецепторов была получена кривая вытеснения с IC₅₀ = 0,007+0,0004 мкмоль/л. На этих же мембранах был проведен радиолигандный анализ с использованием [³H]-FQSE и немеченым FQSE, который показал отсутствие в данном случае мест связывания для изучаемого пептида (разница между общим и неспецифическим связыванием составила 11%).

10.4. Выводы.

Были найдены места специфического связывания [³H]-FQSE на мембранах коры мозга крыс с величиной IC₅₀=2*10⁻⁶ M.

Пептид FQSE не конкурировал за места специфического связывания лиганда ГАМК-А рецептора [³H]-SR 95531.

Места специфического связывания [³H]-FQSE отличаются от сайтов связывания известных лиган-

дов дофаминовых, серотониновых, ацетилхолиновых, глутаматных рецепторов.

Частичное сродство ($IC_{50} \sim 10^{-4}$ М) к местам связывания [3H]-FQSE показали диазепам и прегненолон.

FQSE не оказывал влияния на связывание бензодиазепинов с соответствующим сайтом ГАМК-А рецептора.

Места специфического связывания [3H]-FQSE отличаются от сайтов связывания известных лигандов ГАМК-А рецепторов: Isoguvacine, SCS, Bretanezil, SL 651498, MK0343, THDOC, TB21007, Габоксадол, FGIN-1-27, Allopregnanolone.

Получены данные с отрицательным контролем для мест связывания [3H]-FQSE, что подтверждает наличие мест специфического связывания пептида.

Пример 11. Исследование эффектов пептида FQSE на бикукуллиновой модели.

Целью исследования было изучить потенциальный нейротропный эффект пептида FQSE на фоне введения бикукулина.

Для оценки механизма действия пептида в данной работе использовалась бикукуллиновая модель. Бикукулин (bicuculline) - природное соединение, являющееся алкалоидом, впервые выделенным из экстракта листьев растения *Dicentra cucullaria*, семейства *Fumariaceae*. По своей природе является конкурентным антагонистом ГАМК-А рецепторов. При внутривенном введении в дозе 0,1-0,4 мг/кг вызывает судороги у мышей, продолжающиеся до нескольких часов, за счет нарушения работы Ca^{2+} -зависимых K^+ каналов (Khawaled (1999). Bicuculline block OF small-conductance calcium-activated potassium channels. *Pflüers Archiv*, 438(3):314-321). При внутрибрюшинном введении препарата в дозе 5 мг/кг судороги не отмечаются, но при этом в поведенческих тестах активность препаратов, относящихся к группе ГАМК-А модуляторов, оказывается сильно сниженной относительно значений для данных соединений без бикукулина, что подтверждает функциональное действие исследуемых веществ через ГАМК-А рецепторы (Mizushige (2013). Aromatic amino acid-leucine dipeptides exhibit anxiolytic-like activity in young mice. *Neurosci. lett.*, 543:126-129). Именно к группе ГАМК-А модуляторов теоретически относится используемый в текущем исследовании пептид FQSE.

Задача исследования оценить влияние внутрибрюшинного (в/б) введения пептида FQSE на фоне введения бикукулина на поведение мышей линии BALB/c в тестах "Приподнятый крестообразный лабиринт", "Неизбегаемое плавание по Порсольту (двухдневная модификация)".

11.1. Материалы и методы.

11.1.1. Животные.

Работа выполнена на 48 самцах мышей линии BALB/c. Масса тела к началу эксперимента была 25-28 г. Все животные были свободны от видоспецифичных патогенов (SPF статус по списку FELASA, 2014). Животные содержались в условиях вивария при постоянном воздухообмене не менее 15 л/ч, со свободным доступом к пище и воде и естественном чередовании суточной освещенности 12 ч:12 ч (свет включался в 09:00). Содержание животных и проведение экспериментов осуществляли в соответствии с международными Европейскими (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes) и Российскими (ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными) биоэтическими правилами. В исследовании животные были разделены на 4 экспериментальные группы и получали инъекции веществ как указано в табл. 14.

Таблица 14. Экспериментальные группы

Название группы	Кол-во животных	Тестируемое вещество	Воздействие
1. Контроль	12	В/б введение растворителя по схеме введения веществ из опытной группы	Приподнятый крестообразный лабиринт, Неизбегаемое плавание по Порсольту (2-дневная модификация)
2. FQSE	12	В/б введение FQSE в дозе 20 мг/кг за 30 мин. до тестирования поведения.	
3. Бикукуллин	12	В/б введение бикукулина в дозе 5 мг/кг за 30 мин. до тестирования поведения.	
4. FQSE+ Бикукуллин	12	В/б введение FQSE в дозе 20 мг/кг и бикукулина в дозе 5 мг/кг за 30 мин. до тестирования поведения.	

Все вещества вводили внутривенно (в/б) в объеме 10 мкл раствора на 1 г веса животного за 30 мин до поведенческого тестирования, пептид FQSE в дозе 20 мг/кг, бикукуллин - 5 мг/кг. В день было проведено не более одного теста. Список и порядок проведенных тестов: день 1 - приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ), день 8-9 неизбегаемое плавание по Порсольту (двухдневная модификация).

11.1.2. Статистический анализ.

Статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни для выборок с распределением, отличным от нормального, или при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным анализом с использованием критерия Фишера для выборок с нормальным распределением.

11.1.3. ПКЛ.

Тестовая установка (Производство ООО НПК "Открытая Наука", Россия) состоит из двух закрытых и двух открытых лучей, расположенных напротив друг друга. Длина луча 30 см, высота бортов закрытых лучей равна 15 см. Вся установка приподнята на 70 см над уровнем пола. Открытые лучи имеют яркое равномерное освещение 400 люкс, закрытые - 30-40 люкс. Животное помещали в центр лабиринта, головой к открытому лучу. В течение 5 мин программой Ethovision (Noldus) автоматически регистрировали следующие поведенческие параметры: общий пробег (в см), время движения (при скорости более 5 см/с), время неподвижности (при скорости менее 0,2 см/с), средняя и максимальная скорость, количество эпизодов подвижности и замирания. Такой же набор параметров, а также латентный период и длительность пребывания регистрировали для центрального сектора, открытого и закрытого рукавов по отдельности. В тесте ПКЛ к основным поведенческим показателям, которые характеризуют анксиолитический эффект исследуемых препаратов, относятся "время на открытых лучах, с", "число выходов на открытые лучи", а также производный показатель "индекс тревожности" (ИТ), который рассчитывается по следующей формуле:

$$\text{ИТ} = 100 * (1 - (\text{время на открытых лучах} / \text{общее время тестирования} + \text{число выходов на открытые лучи} / \text{общее количество выходов}) / 2).$$

Увеличение времени, проведенного на ярко освещенных лучах лабиринта, в совокупности с увеличением числа выходов на открытые лучи, а также связанное с данными параметрами уменьшение ИТ являются классическими показателями повышения ориентировочно-исследовательской мотивации, снижения тревожности, а также свидетельствуют об анксиолитическом действии вещества.

11.1.4. Принудительное плавание по Порсольту (двухдневная модификация).

В рамках данной модификации проводится два тестирования в течение двух дней. Установка представляет собой прозрачный сосуд, высотой 30 см, диаметром 10 см, заполненный водой (температура воды +21 -+23°C) до отметки на высоте 25 см. В первый день каждое животное помещали на 10 мин в установку. Поведенческие параметры не регистрировали. На второй день животных снова помещали на

10 мин в установку. Регистрировали продолжительность активного (энергичные движения всеми лапами) и пассивного (слабые гребки задними лапами) плавания, а также неподвижности (иммобилизации) (Porsolt et al. (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. Arch Int Pharmacodyn Ther. 229(2):327-36, с изменениями). После каждого тестирования мышей помещали в обогреваемую клетку до высыхания. Показатели поведения в данном тесте обрабатывали при помощи программы "Real timer", разработанной ООО НПК "Открытая Наука", позволяющей фиксировать последовательность событий, их продолжительность, а также проводить базовую статистическую обработку данных. Принудительное плавание по Порсольту используют для оценки антидепрессантно-подобной активности исследуемых веществ.

Исследование проводили в соответствии с ГОСТ 33215-2014 Правила оборудования помещений и организации процедур при работе с лабораторными животными, ГОСТ 33216-2014 Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами, Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Перевод Rus-LASA, 2012.

11.2. Результаты.

11.2.1. Оценка эффектов исследуемых веществ на поведение мышей в тесте ПКЛ.

Пептид FQSE значимо увеличил время, проведенное на открытых рукавах (60.9 ± 13.31 с против 32.4 ± 6.77 с в группе контроль) (фиг. 75А), а также количество заходов в открытые рукава (4 ± 0.65 против 2.2 ± 0.48 в группе контроль) (фиг. 75Б). Изменения данных параметров привели к падению ИТ в группе мышей, получавших FQSE, по сравнению с контрольными значениями (73 ± 3.8 и $85 \pm 2.7\%$ соответственно) (фиг. 75В). Полученные результаты свидетельствуют о выраженном анксиолитическом эффекте пептида в дозе 20 мг/кг.

Мы не наблюдали изменений параметров поведения в ПКЛ у животных, получавших бикуккуллин в дозе 5 мг/кг. Совместное введение бикуккуллина и пептида FQSE также не приводила к снижению тревожности мышей.

Таким образом, анксиолитический эффект пептида FQSE отсутствовал при совместном введении с бикуккуллином - конкурентным антагонистом ГАМК-А рецепторов, что позволяет предположить, что функциональные эффекты FQSE зависят от взаимодействия с ГАМК-А рецепторами.

11.2.2. Оценка эффектов исследуемых веществ на поведение мышей в тесте принудительное плавание по Порсольту.

Пептид FQSE приводил к значительному увеличению времени активного плавания по сравнению с контрольной группой (103.7 ± 16 с и 57.1 ± 17.62 с) (фиг. 76), что может рассматриваться как антидепрессантное действие пептида. Введение бикуккуллина не оказало влияние на параметры активности мышей в данном тесте. Данный результат согласуется с предыдущими исследованиями (Mizushige et al. (2013). Characterization of Tyr-Leu-Gly, a novel anxiolytic-like peptide released from bovine α S-casein. FASEB J., 27(7), 2911-2917). Мыши, получавшие совместно бикуккуллин и FQSE также не отличались от контрольных животных по поведению в тесте. Данные результаты указывают на то, что пептид FQSE в дозе 20 мг/кг при внутрибрюшинном введении оказывает выраженное антидепрессантное действие, механизм которого, вероятно, связан с взаимодействием с ГАМК-А рецепторами.

11.3. Выводы.

Внутрибрюшинное введение пептида FQSE мышам Balb/c в дозе 20 мг/кг за 30 мин до поведенческого тестирования приводило к выраженному анксиолитическому и антидепрессантному действию.

Введение бикуккуллина мышам Balb/c в дозе 5 мг/кг за 30 мин до поведенческого тестирования само по себе не влияло на параметры тревожности и депрессивное состояние животных.

Введение бикуккуллина значительно снижало проявление анксиолитических и антидепрессантных свойств препарата FQSE, что позволяет предположить механизм функционального действия данного пептида через взаимодействие с ГАМК-А рецепторами.

Пример 12. Эффекты нового пептида FQSE на in vitro модели нейровоспаления.

Целью исследования было оценить in vitro эффекты пептида FQSE на модели липополисахарид (ЛПС)- индуцированного воспаления на первичной культуре глиальных клеток мыши.

12.1. Методы.

Клеточные культуры были разделены на 10 экспериментальных групп и подвергались следующим воздействиям:

- 1) контрольные интактные клетки
- 2) + инкубация в среде содержащей ЛПС (250 нг/мл, 24 ч);
- 3) + ЛПС + FQSE 0,04 мкМ;
- 4) + ЛПС + FQSE 4 мкМ;
- 5) + ЛПС + FQSE 40 мкМ;
- 6) + ЛПС + FQSE 400 мкМ;
- 7) + FQSE 0,04 мкМ;
- 8) + FQSE 4 мкМ;
- 9) + FQSE 40 мкМ;

10) + FQSE 400 мкМ.

12.1.1. Исследуемые параметры.

Уровни экспрессии (мРНК, ПЦР-ВР) про-воспалительных биомаркеров: IL-6, IL-1b, TNF α , IKK β .

12.1.2. Экспериментальные процедуры.

Целый мозг одно-двухдневных неонатальных мышей линии C57/B16 без миндалин помещали в сбалансированный солевой раствор Хэнка (HBSS) без кальция и магния (Gibco 14190144) и обрабатывали в соответствии с инструкциями производителя Miltenyi Biotec. Все процедуры были одобрены биоэтической комиссией Wayne State University в соответствии с рекомендациями Национального Института Здоровья (НИИ). Супернатант сливали и осадок ресуспендировали в 1-2 мл модифицированной среды Игла Дульбекко (DMEM)/питательная среда F-12, без фенолового красного (DMEM/F-12), (Gibco 21041025) с добавлением 10% инактивированной бычьей сыворотки (FBS) (ThermoFischer 10082147) и 1% антибиотика-антимикотика (ThermoFischer 15240062). После гомогенизации, клетки выращивали во флаконах Nunc™ Cell Culture Treated Flasks with Filter Caps (ThermoFischer, 178905) в 10 мл среды [DMEM/F-12; 10% FBS; 1% антибиотик-антимикотик] в инкубаторе (Galaxy 170R, Eppendorf) в условиях 5% CO₂ и температуре 37°C. Культуры росли в течение 8-10 дней, с частичной заменой среды для инкубации (70%) каждые 48-72 ч. При достижении 80% конfluence, клетки инкубировали на шейкере при 200 об/мин на 2 ч при 37°C, чтобы отделить нейрональные клетки от глиальных. Суспензию клеток сливали, а прикрепленные клетки промывали 1 мл Дульбекко Фосфатно-солевым буфером, не содержащего кальция и магния (DPBS), (Gibco 14190144). Затем добавляли 5 мл 1X трипсина (ThermoFischer 15400054), и инкубировали клетки в течение 15 мин в инкубаторе (5% CO₂ при 37°C). После добавляли 5 мл питательной среды для ингибирования активности трипсина, а клетки центрифугировали при 1000 об/мин 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки рассаживали в 24-луночный планшет (80000 клеток на лунку), добавление веществ осуществляли через 48 ч после посадки.

Клетки инкубировали в течение 24 часов в следующих условиях:

ЛПС (250 нг/мл) или пептид FQSE (400, 40, 4, 0,04 мкМ). Также проводили совместную инкубацию с пептидом и ЛПС: (400 мкМ + ЛПС, 40 мкМ + ЛПС, 4 мкМ + ЛПС, 0,04 мкМ + ЛПС). На каждое экспериментальное условие 3-4 повторности. Среда для инкубации без веществ служила контрольными условиями.

В конце инкубации с веществами клетки отмывали 1 мл холодного DPBS и тут же лизировали в 1 мл Тризола, после чего проводили процедуру экстракции РНК. Уровни экспрессии мРНК генов TNF α , IL-1b, IL-6 и IKK β были исследованы.

12.2. Результаты.

Результаты количественного измерения уровня относительной экспрессии генов TNF α , IL-1b и IL-6 представлены на фиг. 77. Изменение уровней экспрессии TNF α в ответ на FQSE носило выраженный доза-зависимый эффект. В концентрации 400 мкМ пептид FQSE эффективно подавлял ЛПС-индуцированную экспрессию TNF α , однако эффекты более низких концентраций FQSE были статистически незначимыми. Возможно, что при хронической стимуляции потенциально более слабыми стрессорами, чем ЛПС, более низкие концентрации FQSE по-прежнему будут оказывать противовоспалительное действие. Это предположение подтверждается тем фактом, что FQSE (даже при 0,04 мкМ) способен снижать базальные уровни экспрессии TNF α и IL-6 в неактивированных глиальных клетках (без ЛПС).

FQSE демонстрирует высокую эффективность в отношении подавления ЛПС-индуцированной экспрессии как IL-1b, так и IL-6 в широком диапазоне доз.

Экспрессия нижестоящего сигнального гена NFK β IKK β (фиг. 78) не коррелировала с присутствием FQSE, однако уровни экспрессии гена были относительно слабыми при всех используемых условиях инкубации. Также важно отметить, что не было обнаружено значительных изменений в экспрессии IKK β в ответ на ЛПС, что указывает на то, что этот ген, по-видимому, не является релевантным маркером в данной модели.

12.3. Заключение.

FQSE подавляет LPS-индуцированную экспрессию провоспалительных цитокинов TNF-альфа, IL-1b и IL-6 в первичных глиальных клетках, что может указывать на его роль в регуляции нейровоспаления.

Полученные данные коррелируют с предыдущими результатами вестерн-блоттинга (пример 9), где было обнаружено, что FQSE способен нормализовать индуцированные стрессом уровни фосфорилирования ERK1/2 (участники пути MAPK). Подавление экспрессии провоспалительных цитокинов, наблюдаемое в настоящем исследовании, также можно рассматривать как результат ГАМК-А-триггерной репрессии MAPK (Lee et al. (2013). Neurotransmitters and microglial-mediated neuroinflammation. Curr. Prot. Rept. Sci., 14(1), 21-32).

Пример 13. Исследование распределения FQSE в структурах мозга крыс после интраназального введения.

Целью фармакокинетического исследования пептида FQSE было установление распределения препарата FQSE в отделах мозга крыс при интраназальном введении.

13.1. Дизайн исследования.

Меченный тритием пептид FQSE вводился интраназально (и/н) в объеме в дозе 500 мкг/кг. Вводимый крысам препарат содержал 2000 мкКи меченного тритием пептида [³H] Ас-FQSE. Через 6 мин после введения были получены исследуемые образцы тканей мозга, крови и мочи.

13.1.1. Выбор вида животных.

Исследования на животных предоставляют полную информацию о токсичности вещества, которое предполагается применять человеком. Данное исследование является частью комплексного фармакокинетического и фармакологического исследования препарата, предназначенного для терапии нейродегенеративных заболеваний. Для исследования были выбраны подходящие для такого исследования самцы крыс линии Wistar.

13.1.2. Количество животных.

Количество животных, используемое в исследовании, составит 5 самцов крыс линии Wistar, что достаточно для достоверности данных изучаемых эффектов.

13.1.3. Способ введения и выбор доз.

Вещество вводили однократно, одномоментно (болюсное введение) интраназально.

13.1.4. Подготовка доз.

Исследование проводилось с использованием меченного тритием пептида Ас-FQSE. Для этого крысам вводили 2000 мкКи [³H] Ас-FQSE в дозе 500 мкг/кг (около 150 мкг). Растворы для введения животным готовили с использованием физиологического раствора. Объем раствора для интраназального введения составлял 20 мкл для крыс.

Дозы после приготовления до введения хранятся при 4±2°C в течение 3 ч.

13.1.5. Содержание животных.

Животные содержались в поликарбонатных клетках Тип-3 (825 кв.см) на подстилке; клетки были покрыты стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением. В качестве подстилки использовали коммерческий подстил LIGNOCEL (JRS, Germany), представляющий специально приготовленные древесные чипы.

Проводили рутинную проверку подстилки на микробиологическое загрязнение. Результаты анализов хранятся в документации лаборатории.

Комбикорм полнорационный для лабораторных животных "Чара" (Ассортимент Агро, Россия) давался ad libitum в кормовое углубление крышки клетки. В лаборатории проводился периодический анализ на микробиологическую контаминацию образцов корма. Результаты анализа, а также данные о составе и качестве корма от производителя хранятся в документации лаборатории.

Очищенная питьевая вода, давалась ad libitum в стандартных питьевых бутылочках. Образцы воды периодически анализировали на микробиологическое загрязнение. Результаты анализов прикладывались в текущую документацию лаборатории.

Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (18-26°C и 30-70% относительная влажность). Температура и влажность постоянно контролировали в каждой экспериментальной комнате. В комнатах содержания животных поддерживали 12 часовой цикл освещения и, по крайней мере, десятикратная смена объема воздуха комнаты в час.

Животных адаптировали в лаборатории в течение как минимум 3 дней до введения. Во время этого периода осуществляли ежедневный осмотр внешнего состояния животных. Животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями в экспериментальные группы не включались.

Каждому животному присваивали индивидуальный номер, помечаемый проколом ушной раковины, и фиксируемый на карточке клетки. Все проводимые процедуры проводили в соответствии с международными Европейскими (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes) и Российскими (ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными) биоэтическими правилами.

13.2. Методы.

13.2.1. Введение животным пептида и забор крови.

В экспериментах на крысах использовали однократное, болюсное, интраназальное введение препарата FQSE. Предварительно крыс анестезировали хлоралгидратом (300 мг/кг) и через 10 мин вводили препарат FQSE, в объеме 20 мкл, в дозе 500 мкг/кг, в которой содержалось 2000 мкКи меченого пептида [³H] Ас-FQSE. Крыс декапитировали через 6 мин после введения препарата. Биоптаты органов промывали в физиологическом растворе в течение 5-7 с, помещали во взвешенные пластиковые пробирки, взвешивали и замораживали жидким азотом. Предназначенный для введения животным раствор пептида Ас-FQSE готовили с использованием стерильного физиологического раствора (0,9% NaCl).

13.2.2. Подготовка проб тканей для анализа.

При приготовлении тканей для ВЭЖХ анализа, замороженные и взвешенные образцы проб тканей в пластиковых пробирках подвергались лиофильной сушке в течение 2 суток. Для приготовления пептидного экстракта проводили последовательные экстракции органическими растворителями, упаривание под уменьшенным давлением и центрифугирование. Лиофильно высушенные образцы крови прогревали при 65°C в течение 30 мин, после чего образцы измельчались в этих же пластиковых пробирках горизонтальными ножами, вращающимися со скоростью 5000 об/мин. Первую экстракцию этих образцов прово-

дили 90% водным ацетонитрилом, содержащим 1% трифторуксусной кислоты. В водно-ацетонитрильный раствор, использованный для экстракции, добавляли по 10 мкг пептида Ac-FQSE, предназначенного для идентификации фракции пептида при хроматографии. После центрифугирования раствор, содержащий меченный тритием пептид и компоненты плазмы крови, подвергался сушке под уменьшенным давлением, реэкстракции метанолом и повторному центрифугированию. Полученный при этом раствор, содержащий меченный тритием пептид и компоненты плазмы крови, подвергался сушке под уменьшенным давлением, реэкстракции 0.1% водным раствором гептафтормасляной кислоты и последующему центрифугированию. Для верификации метода подготовки проб в 200 мкл свежеполученной крови крысы ввели 10 мКи пептида [³H] Ac-FQSE в объеме 10 мкл раствора, после чего образец подвергли обработке по описанной выше схеме. В результате проведенного анализа в этом образце найдено 95% исходного меченого пептида [³H] Ac-FQSE.

13.3. Результаты.

Количественный анализ пептидов проводили с помощью ВЭЖХ на колонке Kromasil C18, 4×150 мм в градиенте метанола (0-40%), присутствии 0.08% TFA и 0.02% HFBA (гептафтормасляная кислота). Фракции, содержащие пептид Ac-FQSE, собирали и в них проводили определение радиоактивности с помощью жидкостного сцинтилляционного счета. Распределение пептида Ac-FQSE в тканях показано в табл. 15.

Таблица 15. Распределение пептида Ac-FQSE в тканях мозга крыс через 6 мин после интраназального введения 2000 мКи [³H] Ac-FQSE в дозе 500 мкг/кг. Значения концентраций пептида Ac-FQSE представлены в виде среднее ± ошибка среднего

Структура мозга/ ткань	Вес, г	Счёт, DPM/g x 1000	Концентрация, нг/г
1. Обонятельные луковицы	0.040 ± 0.003	930 ± 80	30.3 ± 2.6
2. Мозжечок	0.246 ± 0.015	220 ± 30	7.2 ± 0.9
3. Гипоталамус	0.084 ± 0.012	310 ± 35	10.2 ± 1.1
4. Кора префронтальная	0.096 ± 0.006	290 ± 30	9.5 ± 1.0
5. Хабенула	0.026 ± 0.002	155 ± 25	5.1 ± 0.8
6. Гиппокамп	0.096 ± 0.015	300 ± 40	10.8 ± 1.5
7. Кора затылочная	0.125 ± 0.005	190 ± 25	6.1 ± 0.8
8. Стриатум	0.128 ± 0.012	165 ± 20	5.4 ± 0.7
9. Кровь	1.277 ± 0.25	1420 ± 170	45.2 ± 5.4
10. Моча	0.130 ± 0.080	15 ± 3	0.5 ± 0.1

Установлено, что при интраназальном введении наибольшее количество пептида FQSE обнаруживается в тканях обонятельных луковиц, где его содержание значительно выше, чем в остальных отделах мозга. При этом концентрация пептида Ac-FQSE в тканях ниже, чем его содержание в крови. Также установлено, что более высокое количество пептида наблюдается для тканей префронтальной коры, гиппокампа и гипоталамуса, по сравнению с остальными отделами мозга. Установлено, что пептид Ac-FQSE способен преодолевать гематоэнцефалический барьер. Его концентрация в мозге через 6 минут после интраназального введения составляет примерно 1/5-1/10 от его концентрации в крови.

13.4. Выводы.

Установлено, что при интраназальном введении наибольшее количество пептида FQSE обнаруживается в тканях обонятельных луковиц, где его содержание значительно выше, чем в остальных отделах мозга. Также установлено, что более высокое количество пептида FQSE наблюдается для тканей префронтальной коры, гиппокампа и гипоталамуса, по сравнению с остальными отделами мозга. Установлено, что пептид FQSE способен преодолевать гематоэнцефалический барьер.

Эквиваленты.

Специалисты в данной области узнают или смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многочисленные эквиваленты конкретных вариантов осуществления, конкретно описанных в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты входят в объем следующей формулы изобретения.

Включение по ссылке.

Все патенты и публикации, на которые здесь делается ссылка, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Обсуждаемые здесь публикации предоставляются исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в данном документе не должно быть истолковано как признание того, что настоящее изобретение не имеет права датировать такую публикацию более ранней датой в силу предше-

ствующего изобретения.

Как используется в данном документе, все заголовки предназначены просто для организации и не ограничивают открытие каким-либо образом. Содержание любого отдельного раздела может быть одинаково применимо ко всем разделам.

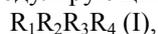
Как упоминается в данном документе, все процентные содержания композиции даны по массе от всей композиции, если не указано иное. Используемое здесь слово "включать" и его варианты не предназначены для ограничения, так что перечисление элементов в списке не исключает других подобных элементов, которые также могут быть полезны в композициях и методах данной технологии. Точно так же термин "может" и его варианты предназначены для неограничивающего характера, так что упоминание о том, что вариант осуществления может содержать определенные элементы или особенности, не исключает других вариантов осуществления настоящей технологии, которые не содержат их элементы или особенности. Кроме того, термин "в основном" означает, что указанная характеристика, параметр или значение не обязательно должны быть достигнуты точно, но что отклонения или вариации, включая, например, допуски, ошибку измерения, ограничения точности измерения, производственные допуски и другие факторы, известные специалистам в данной области техники, может иметь место в количествах, которые не исключают эффект, который должны были обеспечить характеристика, параметр или значение. В представленном здесь описании термин "примерно" или "приблизительно" относится к диапазону значений в пределах плюс или минус 10% от указанного числа.

Хотя неограниченный термин "содержащий" в качестве синонима таких терминов, как "включающий", "содержащий" или "имеющий", используется здесь для описания и утверждения изобретения, настоящее изобретение или его варианты осуществления могут альтернативно описываться с использованием альтернативные термины, такие как "состоящий из" или "состоящий по существу из".

Используемые здесь слова "предпочтительный" и "предпочтительно" относятся к вариантам осуществления технологии, которые обеспечивают определенные преимущества при определенных обстоятельствах. Однако другие варианты осуществления также могут быть предпочтительными при тех же или других обстоятельствах. Кроме того, перечисление одного или нескольких предпочтительных вариантов осуществления не подразумевает, что другие варианты осуществления бесполезны, и не предназначено для исключения других вариантов осуществления из объема технологии.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции, содержащей синтетический нейромодулирующий пептид, для лечения аффективного расстройства, при этом нейромодулирующий пептид определяется общей формулой I



где R_1 выбран из аминокислот W, F и D;

R_2 выбран из аминокислот Q, D и K;

R_3 выбран из аминокислот S, Q и T; и

R_4 выбран из аминокислот V и E.

2. Применение по п.1, где R_1 это W.

3. Применение по п.1, где R_1 это F.

4. Применение по п.1, где R_1 это D.

5. Применение по п.1, где R_2 это D.

6. Применение по п.1, где R_2 это Q.

7. Применение по п.1, где R_2 это K.

8. Применение по п.1, где R_3 это Q.

9. Применение по п.1, где R_3 это S.

10. Применение по п.1, где R_3 это T.

11. Применение по п.1, где R_4 это V.

12. Применение по п.1, где R_4 это E.

13. Применение по п.1, где

R_1 это W;

R_2 это D;

R_3 это Q; и

R_4 это V.

14. Применение по любому из пп.1-13, где композиция способна связываться с сайтом связывания бензодиазепина рецептора ГАМК-А.

15. Применение по п.14, где композиция способна связываться с нейростероидным сайтом рецептора ГАМК-А.

16. Применение по любому из пп.1-13, где композиция способна связываться с сайтом связывания α - β рецептора ГАМК-А.

17. Применение по п.1, где

R_1 это F;

R₂ это Q;
R₃ это S; и
R₄ это E.

18. Применение по п.17, где композиция способна связываться с бензодиазепиновым сайтом связывания рецептора ГАМК-А.

19. Применение по п.17, где композиция способна связываться с сайтом связывания нейростероидов рецептора ГАМК-А.

20. Применение по п.17, где композиция способна связываться с сайтом связывания α - β рецептора ГАМК-А.

21. Применение по п.1, где

R₁ это D;
R₂ это K;
R₃ это T; и
R₄ это E.

22. Применение по п.21, где композиция способна связываться с сайтом связывания бензодиазепина рецептора ГАМК-А.

23. Применение по п.21, где композиция способна связываться с сайтом связывания нейростероидов рецептора ГАМК-А.

24. Применение по п.21, где композиция способна связываться с сайтом связывания α - β рецептора ГАМК-А.

25. Применение по любому из пп.1-24, где значение изоэлектрической точки (pI) нейромодулирующего пептида составляет менее примерно 6.

26. Применение по п.25, где значение изоэлектрической точки (pI) нейромодулирующего пептида составляет от примерно 3,5 до примерно 4,5.

27. Применение по п.26, где значение изоэлектрической точки (pI) нейромодулирующего пептида составляет от примерно 3,3 до примерно 4,2.

28. Применение композиции, содержащей синтетический нейромодулирующий пептид, для лечения аффективного расстройства, при этом нейромодулирующий пептид определяется общей формулой I



где R₁ выбран из аминокислот W, F и D;

R₂ выбран из аминокислот Q, D и K;

R₃ выбран из аминокислот S, Q и T; и

R₄ выбран из аминокислот V и E; и

где пептид химически модифицирован путем ацетилирования на N-конце и/или метилирования на C-конце.

29. Применение по любому из пп.1-28, где композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

30. Применение по любому из пп.1-28, где композиция дополнительно содержит средство доставки.

31. Применение по п.30, где средство доставки выбрано из липосом, наночастиц и полисахаридов.

32. Применение по п.31, где полисахарид выбран из циклодекстрина, хитозана, целлюлозы и альгината.

33. Применение по любому из пп.1-32, где композиция имеет состав для интраназального введения.

34. Применение по п.33, где композиция содержит по меньшей мере один ингибитор протеаз слизистой оболочки носа.

35. Применение по п.34, где ингибитор выбран из бестатина, комостатамилазы, лейпептина, апро-тинина, бацитрацина, амастатина, боролейцина, пурамицина, соли желчных кислот и фузидовой кислоты.

36. Применение по любому из пп.1-32, где композиция имеет состав для ингаляционного введения.

37. Применение по п.36, где ингаляционное введение осуществляется с помощью интраназального устройства с сухим порошком.

38. Применение по любому из пп.1-32, где композиция имеет состав для внутривенного введения.

39. Применение по любому из пп.1-32, где композиция имеет состав для перорального введения.

40. Применение по любому из пп.1-39, где пептид модулирует рецептор гамма-аминомасляной кислоты A (ГАМК-А).

41. Применение по любому из пп.1-40, где аффективное расстройство представляет собой депрессию.

42. Применение по п.41, где депрессия выбрана из большого депрессивного расстройства, дистимии, прорывной депрессии, рефрактерной к лечению депрессии и депрессии, связанной с болезнью Паркинсона, депрессии, связанной с посттравматическим стрессовым расстройством, послеродовой депрес-

сии, биполярной депрессии и суицидальных мыслей.

43. Применение по любому из пп.1-40, где аффективное расстройство представляет собой тревожное расстройство.

44. Применение по п.43, где тревожное расстройство выбрано из тревоги разлуки, селективного мутизма, специфической фобии (SP), социальной тревоги (SAD), панического расстройства, агорафобии, тревоги, вызванной употреблением веществ/лекарств, и тревоги из-за другого медикаментозного состояния, генерализованной тревожности (ГТР), посттравматического стрессового расстройства (ПТСР), большого депрессивного расстройства (БДР), терапевтически-резистентной депрессии (ТРД), послеродовой депрессии (ПРД), биполярного расстройства или биполярной депрессии, обсессивно-компульсивного расстройства (ОКР) и синдрома дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), социальной фобии, возбуждения при болезни Альцгеймера, агрессии при болезни Альцгеймера и обсессивно-компульсивного синдрома.

45. Применение по п.44, где аффективное расстройство представляет собой паническое расстройство.

46. Применение по п.44, где аффективное расстройство представляет собой синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ).

47. Применение по любому из пп.1-40, где аффективное расстройство представляет собой расстройство, связанное со стрессом.

48. Применение по любому из пп.1-47, дополнительно включающее введение антидепрессанта, где антидепрессант необязательно выбран из группы, состоящей из ингибиторов обратного захвата серотонина, селективных ингибиторов обратного захвата норэпинефрина, SSRI/SNRI комбинированного действия, антагонистов/ингибиторов обратного захвата серотонина-2, антидепрессанта с антагонизмом альфа-2 + антагонизмом серотонина-2 и серотонина-3, антидепрессанта с ингибированием обратного захвата серотонина/норэпинефрина/дофамина, антидепрессанта с ингибированием обратного захвата норэпинефрина и дофамина, антагониста 5-HT₁альфа, антагониста 5-HT₁бета, агонистов рецептора 5-HT_{1A}, агонистов и антагонистов рецептора 5-HT_{1A}, антагонистов рецептора 5-HT₂, виллоксазина гидрохлорида, дегидроэпиандростерона, антагонистов рецептора NMDA, потенциаторов рецептора АМРА, антагонистов субстанции Р/антагонистов рецептора нейрокина-1, непептидного антагониста субстанции Р, антагонистов нейрокина 2, антагонистов нейрокина 3, антагонистов рецепторов кортикотропин-рилизинг-фактора, антиглюкокортикоидных препаратов, антагонистов глюкокортикоидных рецепторов, агентов, блокирующих кортизол, ингибиторов синтеза оксида азота, ингибиторов фосфодиэстеразы, ингибиторов энкефалиназы, агонистов рецептора ГАМК-А, агентов, улавливающих свободные радикалы, атипичных MAOI, селективных MAOI ингибиторов, гормонов, фолиевой кислоты, лейковорина, трамадола и триптофана в комбинации с антипсихотическим лекарственным средством, при этом указанное антипсихотическое лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из атипичного антипсихотического препарата и стабилизатора дофаминовой системы.

49. Применение по любому из пп.1-48, дополнительно включающее введение дополнительного препарата от депрессии, необязательно выбранного из одного или более препаратов из: CYMBALTA пероральный, LEXAPRO пероральный, EFFEXOR XR пероральный, ZOLOFT пероральный, CELEXA пероральный, TRAZODONE пероральный, PROZAC пероральный, WELLBUTRIN XL пероральный, CITALOPRAM пероральный, PRISTIQ пероральный, AMITRIPTYLINE пероральный, SAVELLA пероральный, VIBRYD пероральный, PAXIL CR пероральный, WELLBUTRIN пероральный, PAXIL пероральный, SERTRALINE пероральный, REMERON пероральный, NORTRIPTYLINE пероральный, VENLAFAXINE пероральный, FLUOXETINE пероральный, BUPROPION HCL пероральный, MIRTAZAPINE пероральный, RITALIN пероральный, PAROXETINE пероральный, WELLBUTRIN SR пероральный, DOXEPIN пероральный, METHYLPHENIDATE пероральный, SYMBYAX пероральный, ESCITALOPRAM OXALATE пероральный, PAMELOR пероральный, IMIPRAMINE пероральный, BRINTELIX пероральный, DULOXETINE пероральный, NARDIL пероральный, FETZIMA пероральный, EMSAM TRANSDERMAL, PARNATE пероральный, PEXEVA пероральный, BRISDELLE пероральный, CLOMIPRAMINE пероральный, ANAFRANIL пероральный, TOFRANIL пероральный, FLUVOXAMINE пероральный, ZYBAN пероральный, DESIPRAMINE пероральный, SARAFEM пероральный, PROZAC WEEKLY пероральный, APLENZIN пероральный, METHYLIN пероральный, NEFAZODONE пероральный, QUILLIVANT XR пероральный, TOFRANIL-PM пероральный, NORPRAMIN пероральный, REMERON SOLTAB пероральный, BUPROPION HBR пероральный, OLEPTRO ER пероральный, DESVENLAFAXINE SUCCINATE пероральный, BUPROBAN пероральный, IMIPRAMINE PAMOATE пероральный, VILAZODONE пероральный, MILNACIPRAN пероральный, PAROXETINE MESYLATE пероральный, SURMONTIL пероральный, MAPROTILINE пероральный, PROTRIPTYLINE пероральный, PHENELZINE пероральный, MARPLAN пероральный, OLANZAPINE-FLUOXETINE пероральный, TRANYLCPROMINE пероральный, SELEGILINE трансдермальный, AMOXAPINE пероральный, FORFIVO XL пероральный, ISOCARBOXAZID пероральный, DESVENLAFAXINE пероральный, KHEDEZLA пероральный, LEVOMILNACIPRAN пероральный, VORTIOXETINE пероральный и DESVENLAFAXINE FUMARATE пероральный.

50. Применение по любому из пп.1-49, дополнительно включающее введение дополнительного препарата лечения тревожности, необязательно выбранного из одного или более агентов из бензодиазепинов, выбранных из алпразолама (XANAX), клоназепама (KLONOPIN), диазепама (VALIUM), лоразепама (ATIVAN), оксазепама (SERAX) и хлордиазепоксиды (librium); из бета-блокаторов, выбранных из пропранолола (INDERAL) и атенолола (TENORMIN); из трициклических антидепрессантов, выбранных из имипрамина (TOFRANIL), дезипрамина (NORPRAMIN, PERTOFRANE), нортриптилина (AVENTYL или PAMELOR), amitриптилина (ELAVIL), доксемина (SINEQUAN или ADAPIN), кломипрамина (ANAFRANIL); из ингибиторов моноаминоксидазы (MAOIs), выбранных из фенелзина (NARDIL), транилципромина (PARNATE); из селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (SSRIs), выбранных из флуоксетина (PROZAC), флувоксамина (LUVOX), сертралина (ZOLOFT), пароксетина (PAXIL), эсциталопрам оксалата (LEXAPRO), циталопрама (CELEXA); из ингибиторов обратного захвата серотонина-норадренина (SNRIs), выбранных из венлафаксина (EFFEXOR), венлафаксина пролонгированного действия (EFFEXOR XR) и дулоксетина (CYMBALTA); из мягких транквилизаторов, таких как буспирон (BUSPAR); и из противосудорожных препаратов, выбранных из вальпроата (DEPAKOTE), прегабалина (LYRICA) и габапентина (NEURONTIN).

51. Применение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество композиции как определено по любому из пп.1-40 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель, для лечения аффективного расстройства.

52. Способ модуляции рецептора гамма-аминомасляной кислоты A (ГАМК-A) в клетке, включающий контактирование клетки с композицией, содержащей синтетический нейромодулирующий пептид, определенный общей формулой I



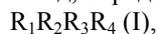
где R_1 выбран из аминокислот W, F и D;

R_2 выбран из аминокислот Q, D и K;

R_3 выбран из аминокислот S, Q и T; и

R_4 выбран из аминокислот V и E.

53. Способ лечения нейродегенеративного заболевания у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей синтетический нейромодулирующий пептид, определенный общей формулой I



где R_1 выбран из аминокислот W, F и D;

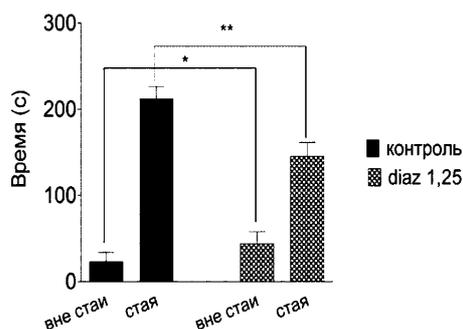
R_2 выбран из аминокислот Q, D и K;

R_3 выбран из аминокислот S, Q и T; и

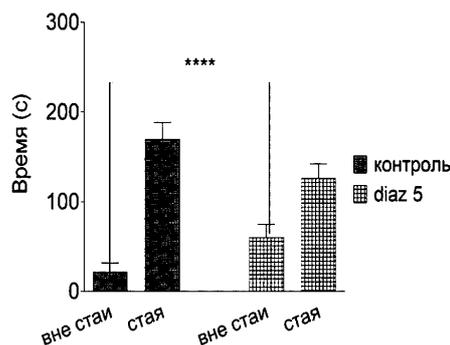
R_4 выбран из аминокислот V и E.

54. Способ по п.53, где нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Паркинсона.

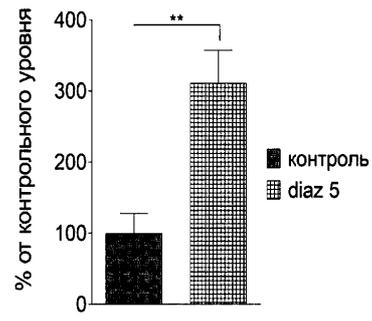
55. Способ по п.53, где нейродегенеративное заболевание - это болезнь Альцгеймера.



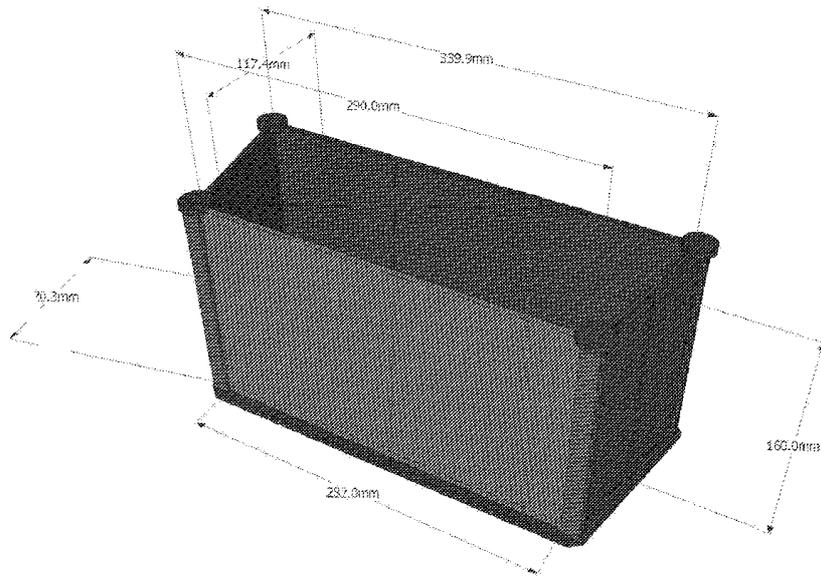
Фиг. 1А



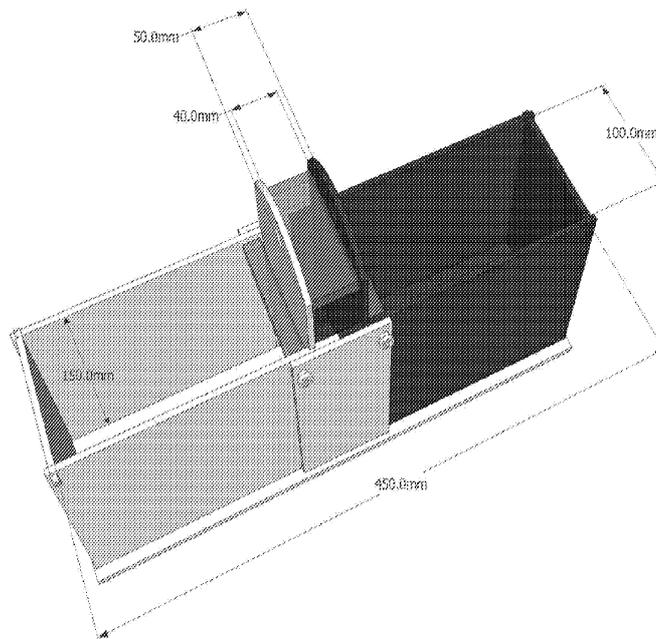
Фиг. 1Б



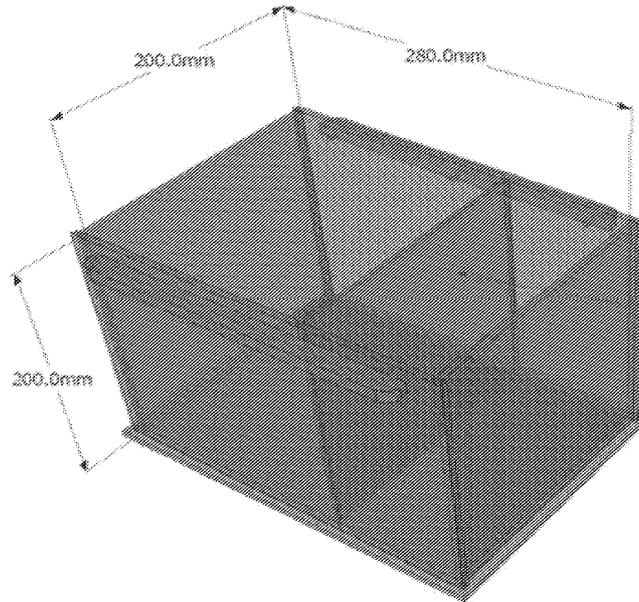
Фиг. 1В



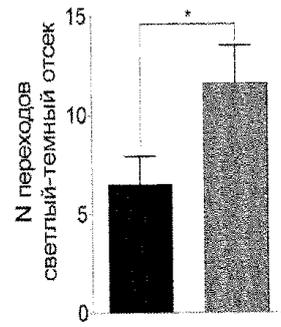
Фиг. 2



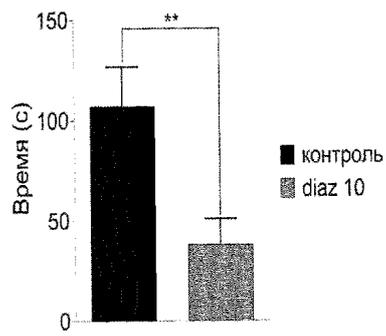
Фиг. 3



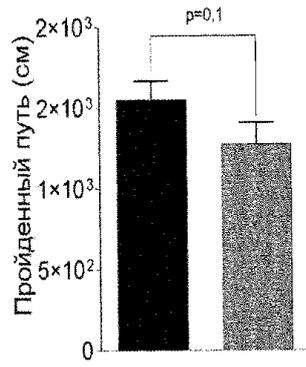
Фиг. 4



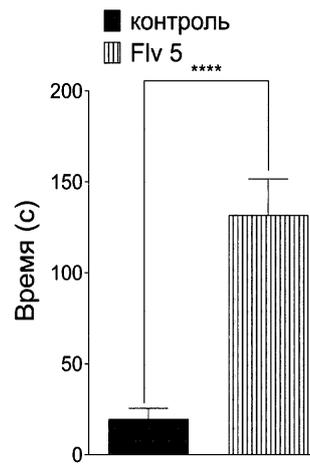
Фиг. 5А



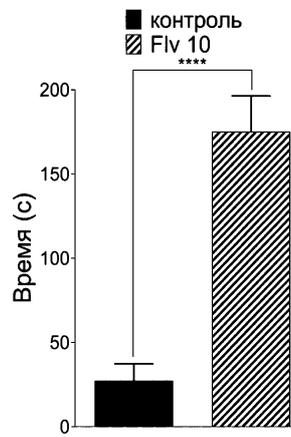
Фиг. 5Б



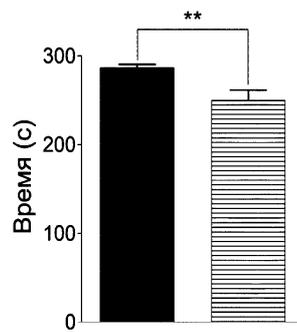
Фиг. 5В



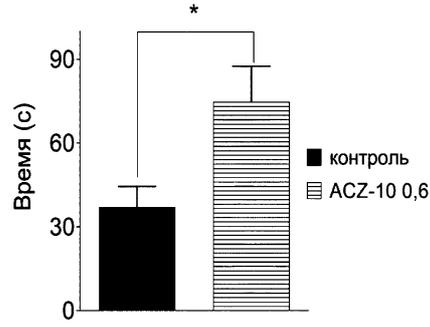
Фиг. 6А



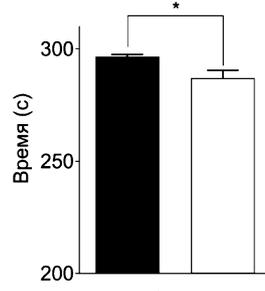
Фиг. 6Б



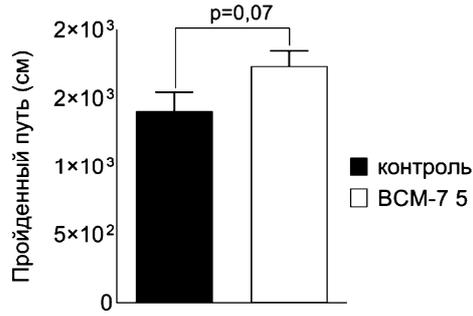
Фиг. 7А



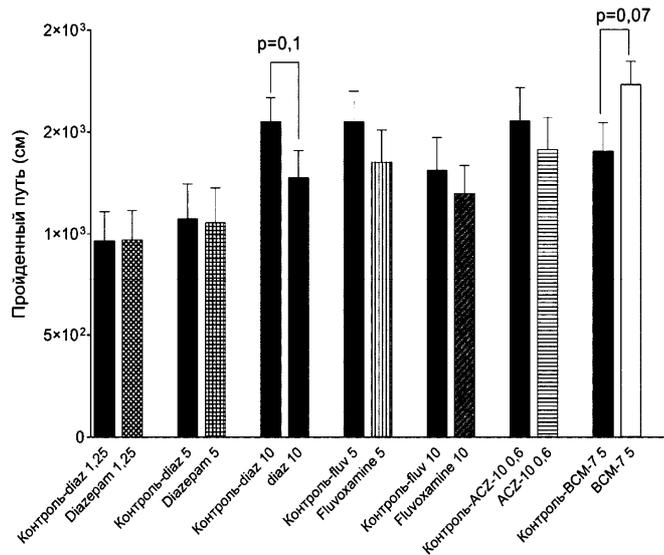
Фиг. 7Б



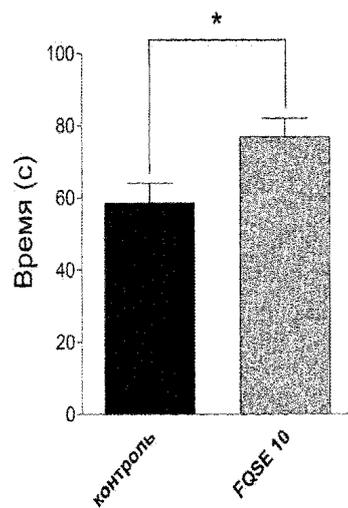
Фиг. 8А



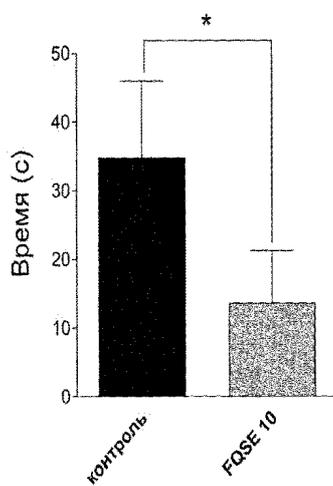
Фиг. 8Б



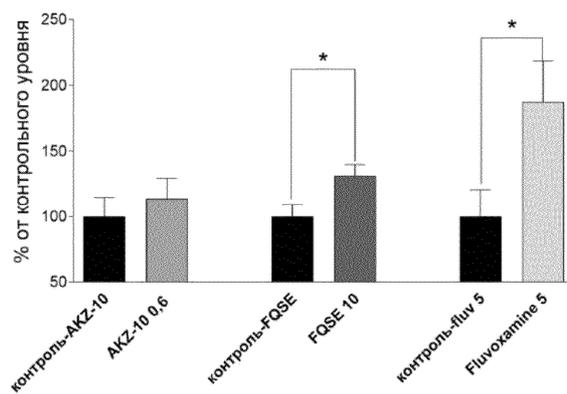
Фиг. 9



Фиг. 10А

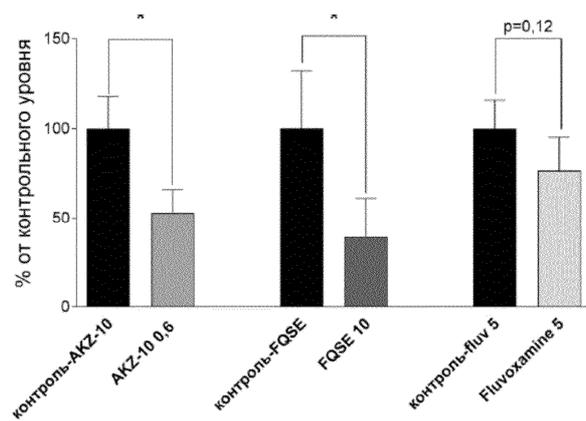


Фиг. 10Б

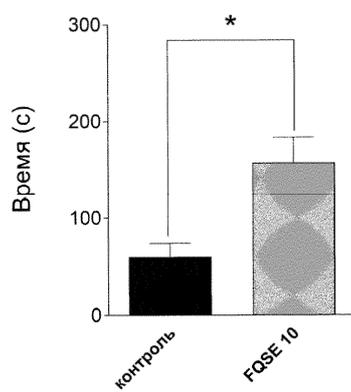


Фиг. 11А

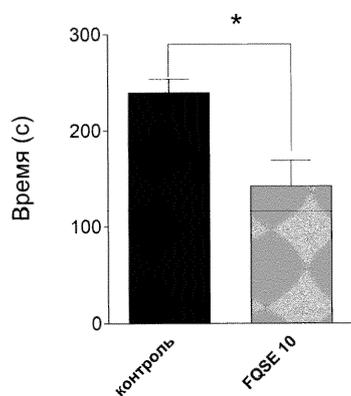
048019



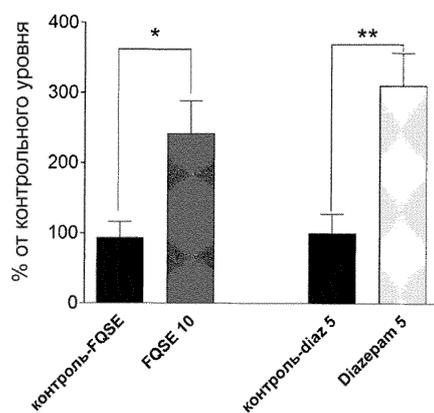
Фиг. 11Б



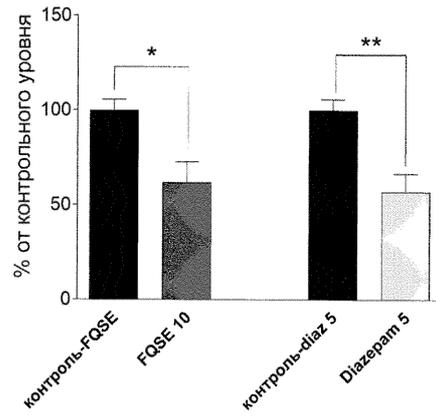
Фиг. 12А



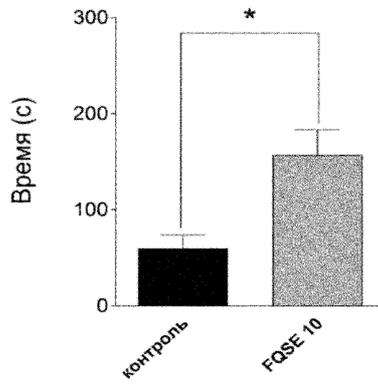
Фиг. 12Б



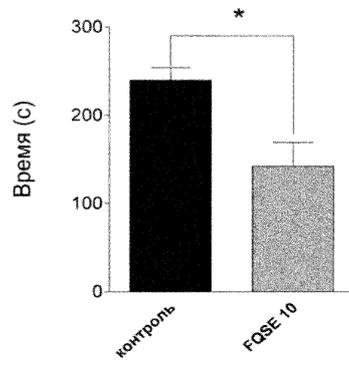
Фиг. 13А



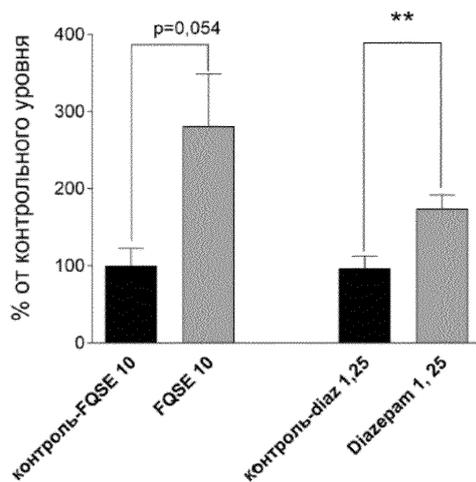
Фиг. 13Б



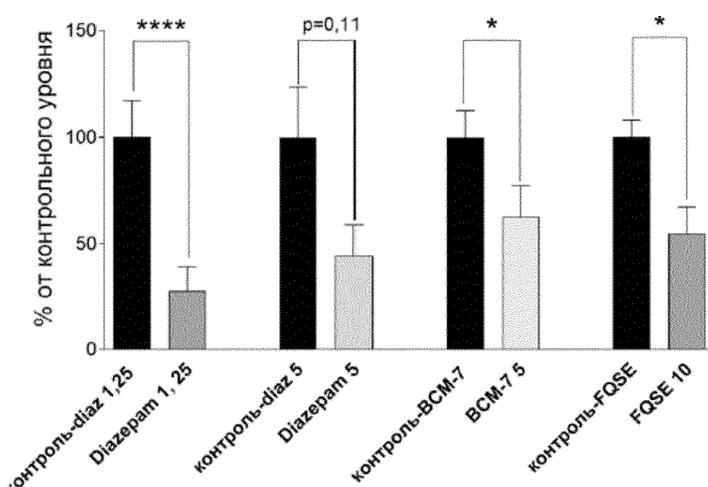
Фиг. 14А



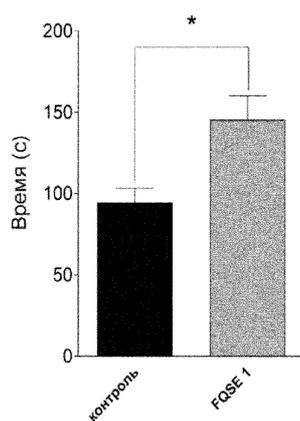
Фиг. 14Б



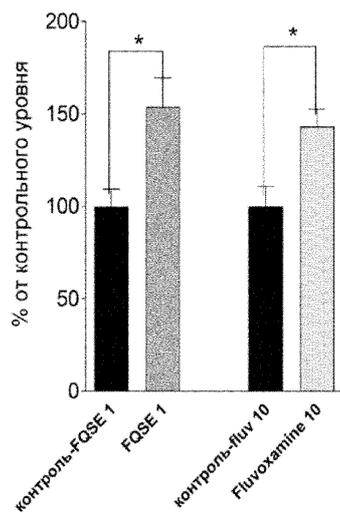
Фиг. 15А



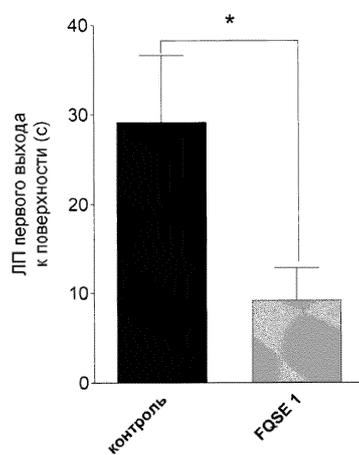
Фиг. 15Б



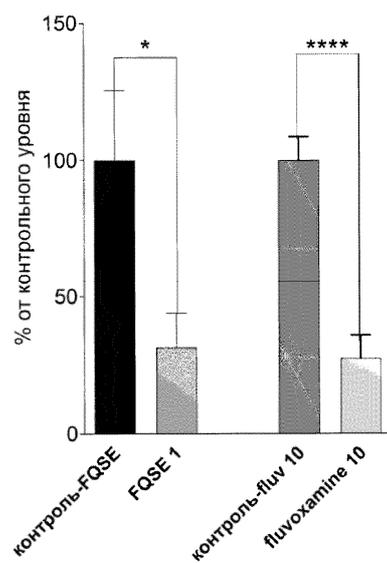
Фиг. 16А



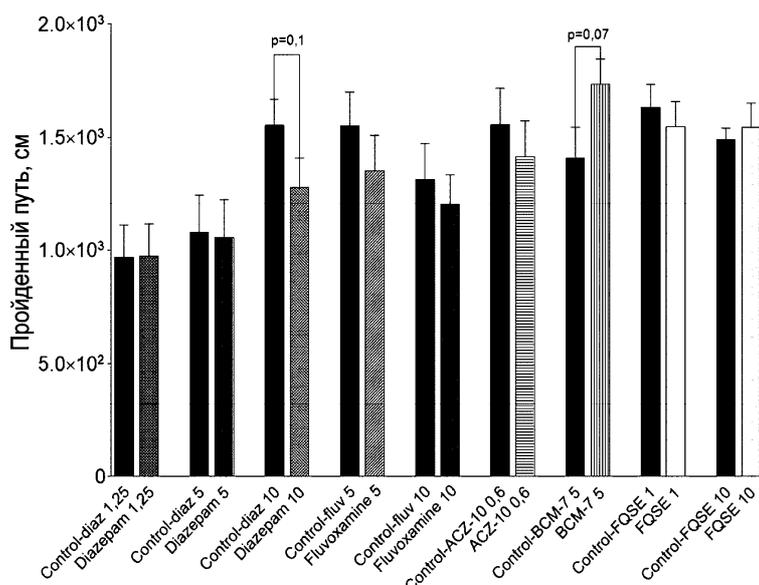
Фиг. 16Б



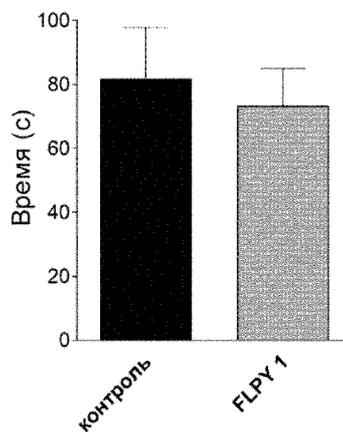
Фиг. 17А



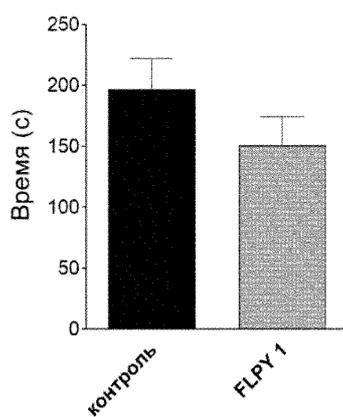
Фиг. 17Б



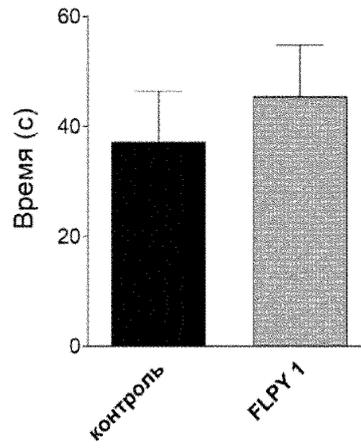
Фиг. 18



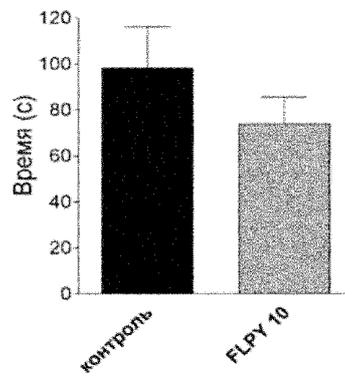
Фиг. 19А



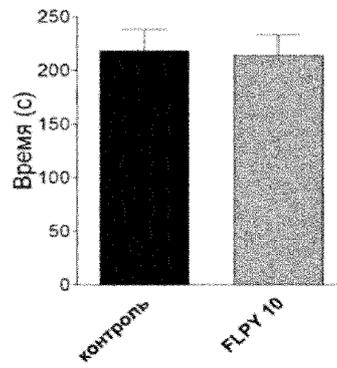
Фиг. 19Б



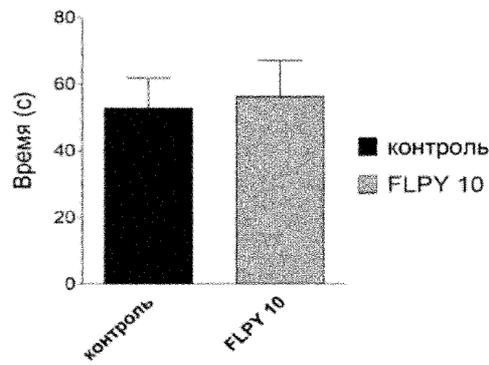
Фиг. 19В



Фиг. 20А

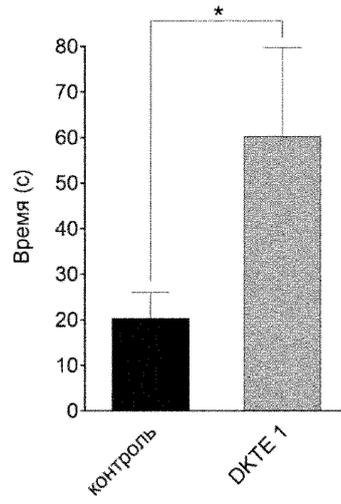


Фиг. 20Б

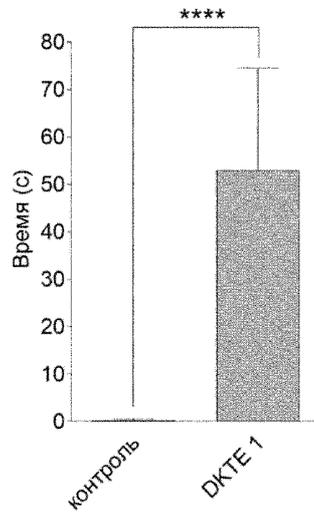


Фиг. 20В

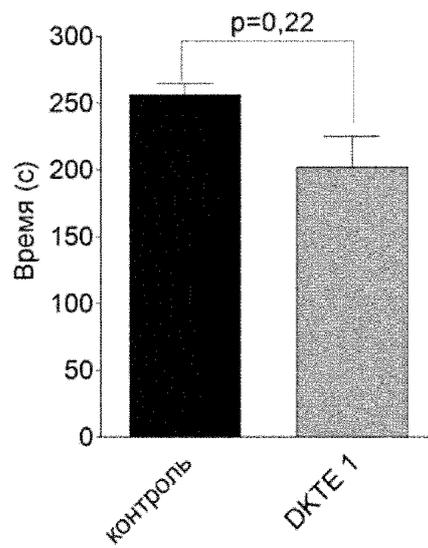
048019



Фиг. 21А

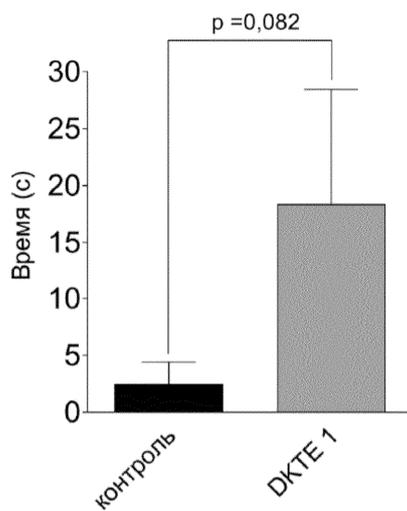


Фиг. 21Б

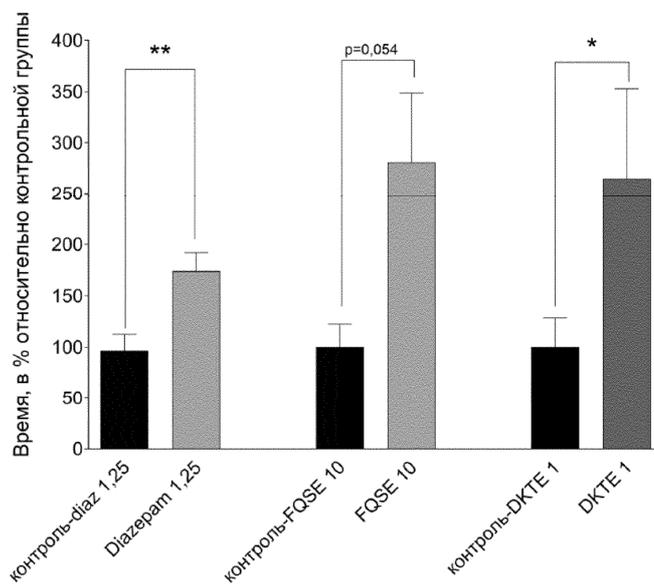


Фиг. 21В

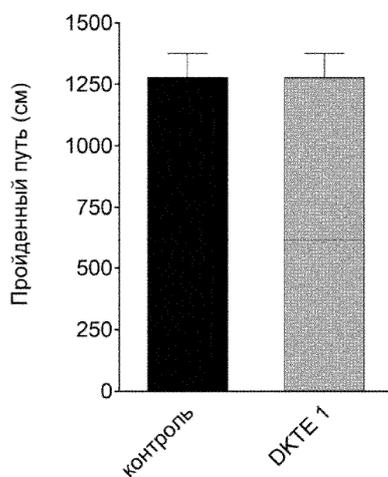
048019



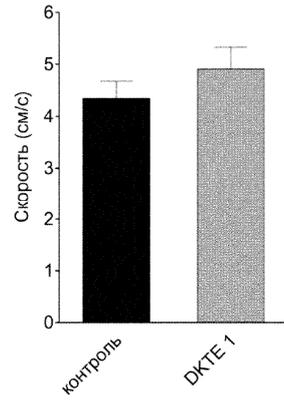
Фиг. 22



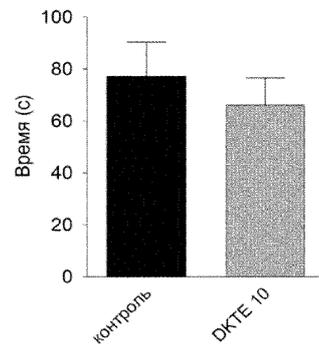
Фиг. 23



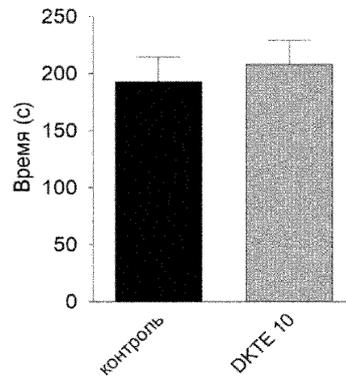
Фиг. 24А



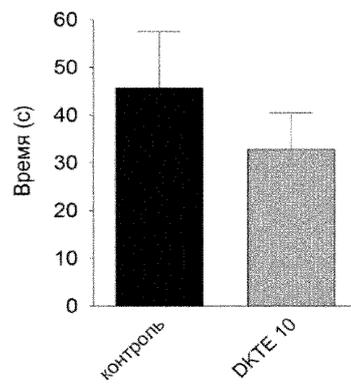
Фиг. 24Б



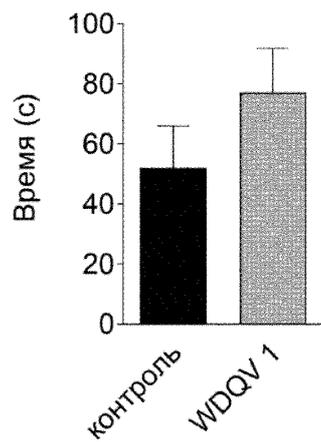
Фиг. 25А



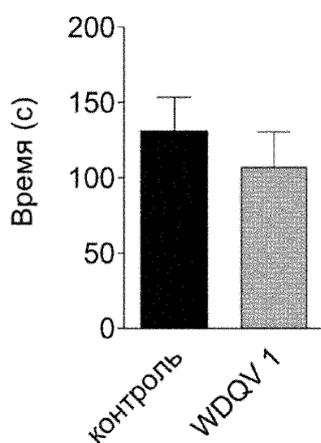
Фиг. 25Б



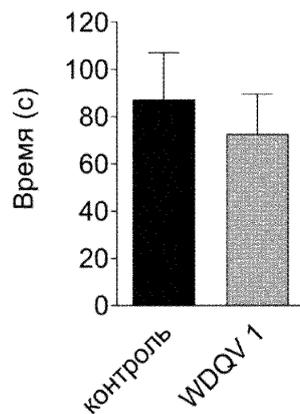
Фиг. 25В



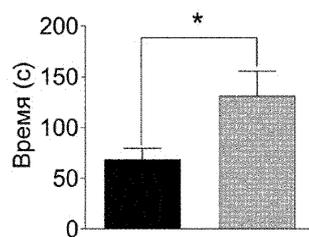
Фиг. 26А



Фиг. 26Б

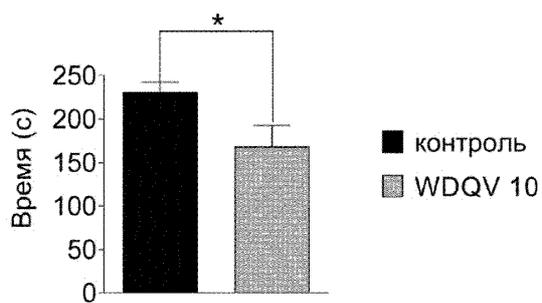


Фиг. 26В

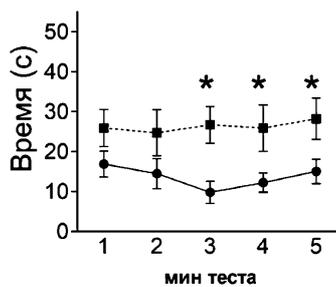


Фиг. 27А

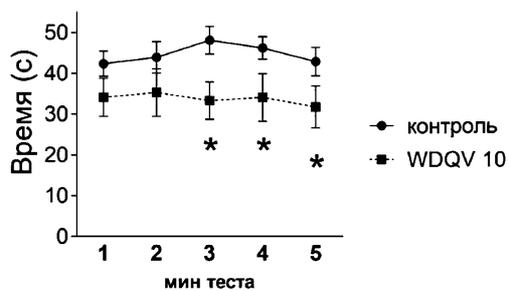
048019



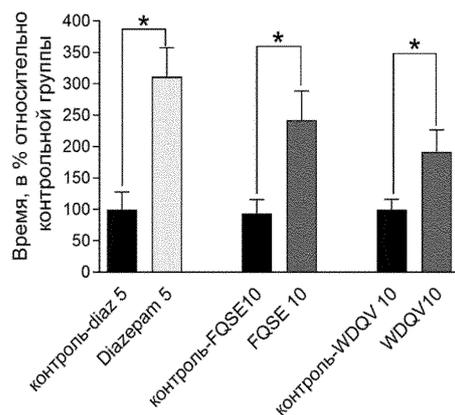
Фиг. 27Б



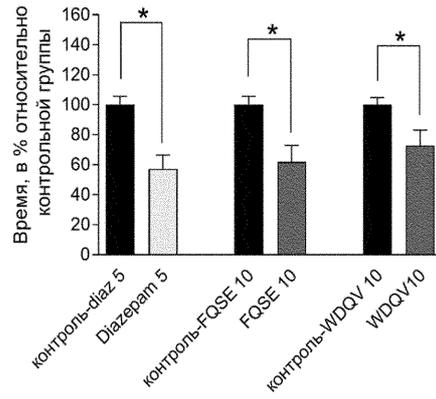
Фиг. 27В



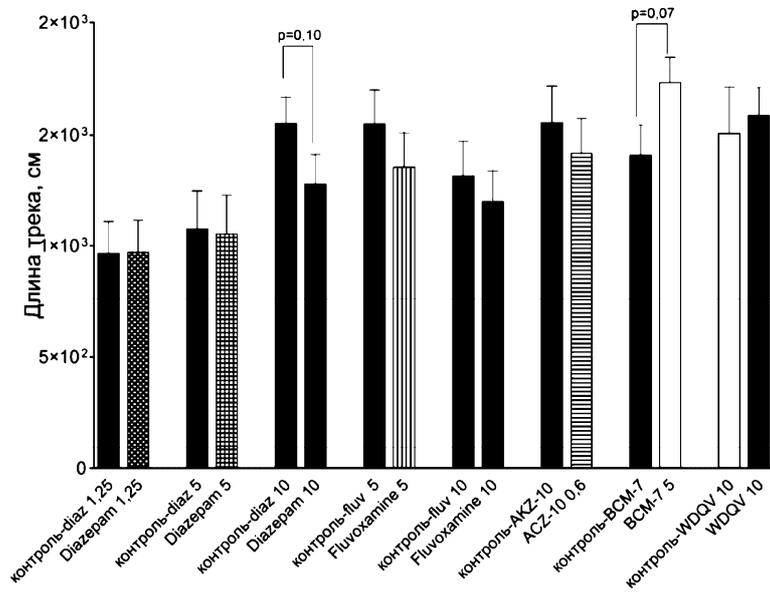
Фиг. 27Г



Фиг. 28А



Фиг. 28Б

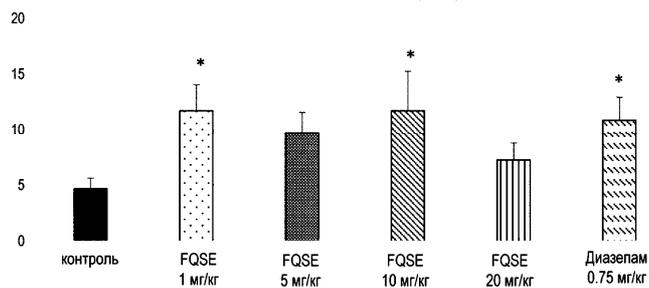


Фиг. 29



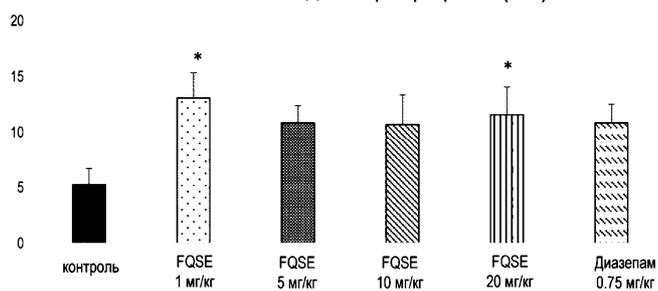
Фиг. 30

Количество стоек (ОП)



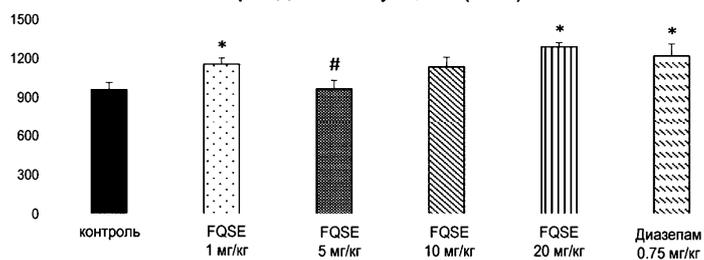
Фиг. 31

Количество выходов в центр арены (ОП)



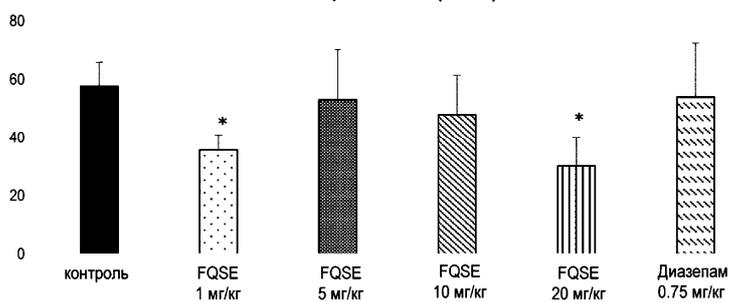
Фиг. 32

Пройденный путь, см (ПКЛ)



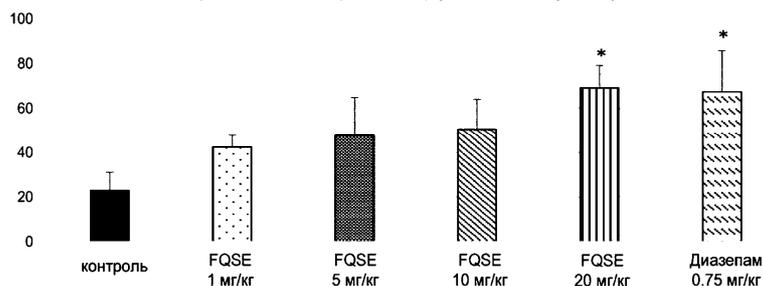
Фиг. 33

Замирание, с (ПКЛ)



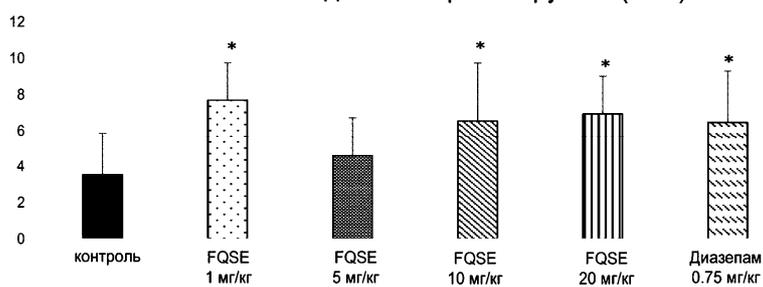
Фиг. 34

Время на открытых рукавах, с (ПКЛ)



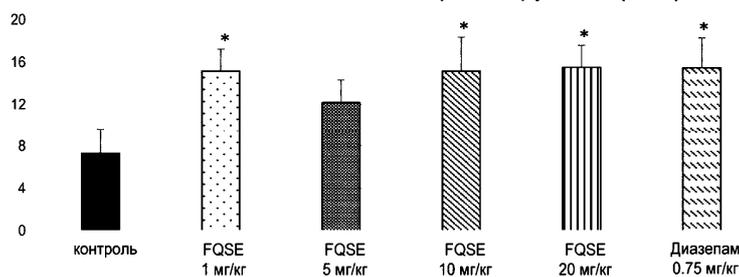
Фиг. 35

Количество выходов на открытые рукава (ПКЛ)



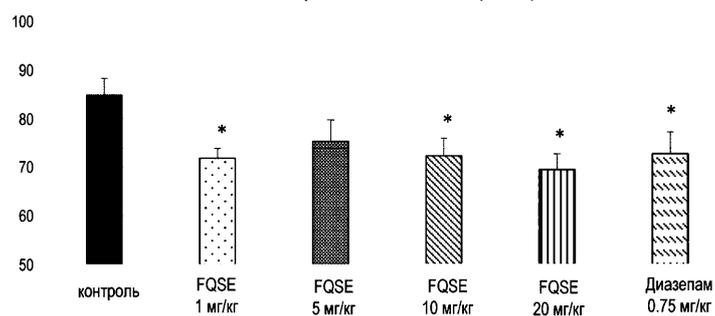
Фиг. 36

Количество свешиваний с открытых рукавов (ПКЛ)



Фиг. 37

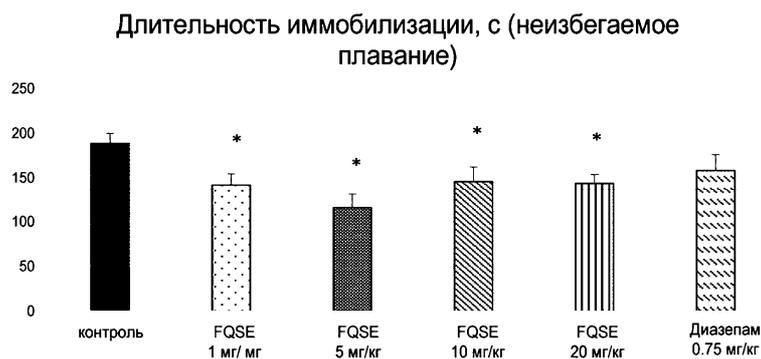
Индекс тревожности, % (ПКЛ)



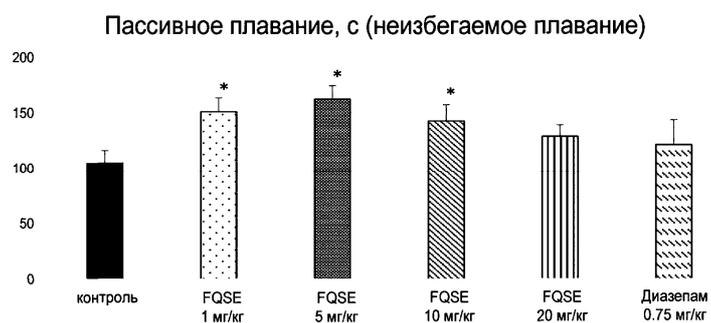
Фиг. 38



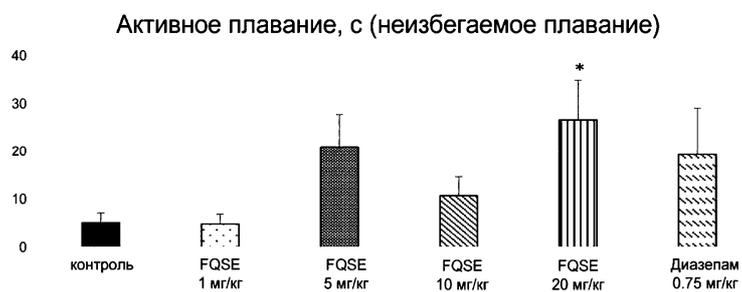
Фиг. 39



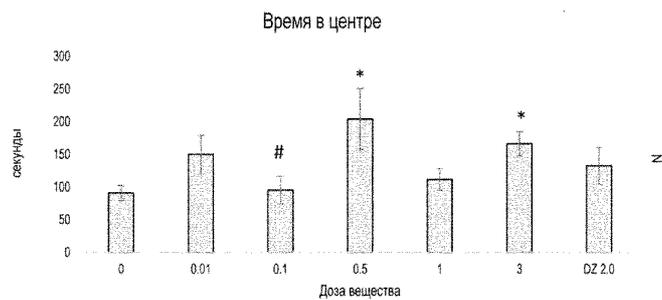
Фиг. 40



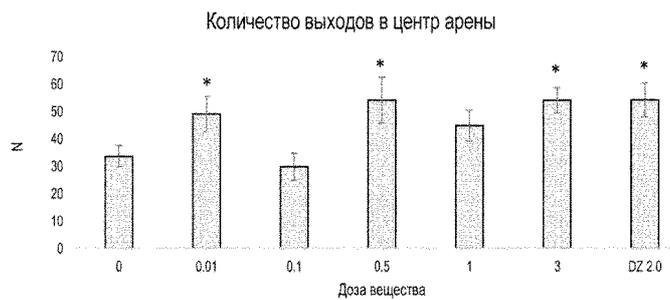
Фиг. 41



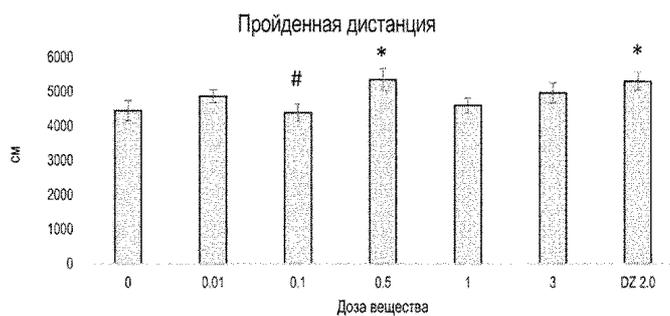
Фиг. 42



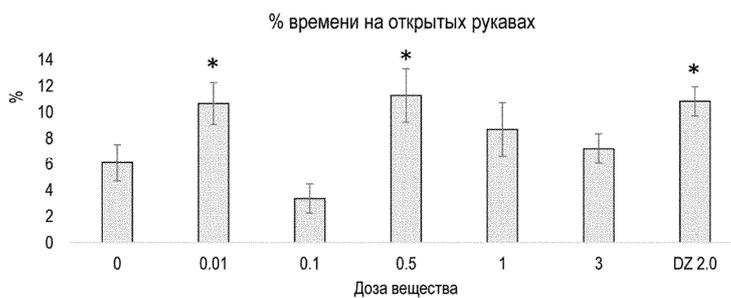
Фиг. 43А



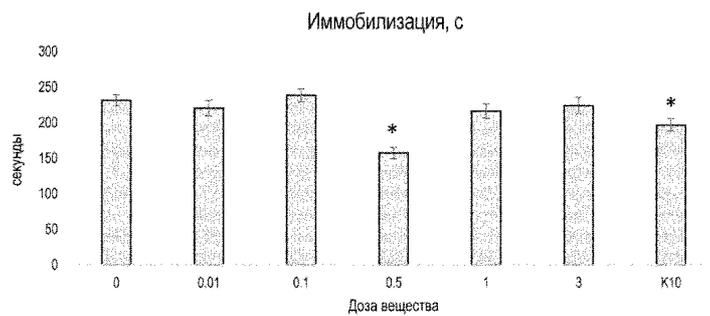
Фиг. 43Б



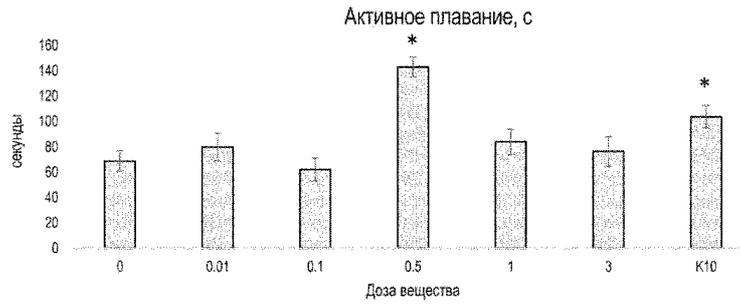
Фиг. 43В



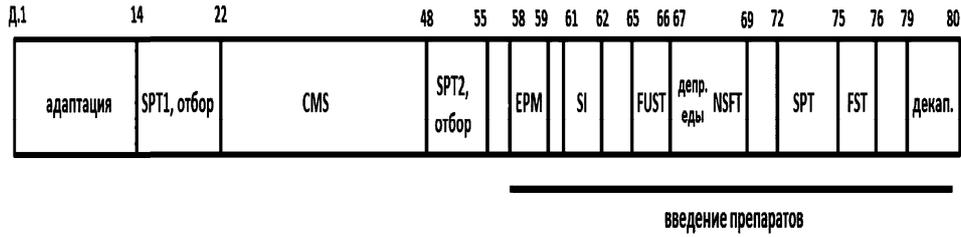
Фиг. 44



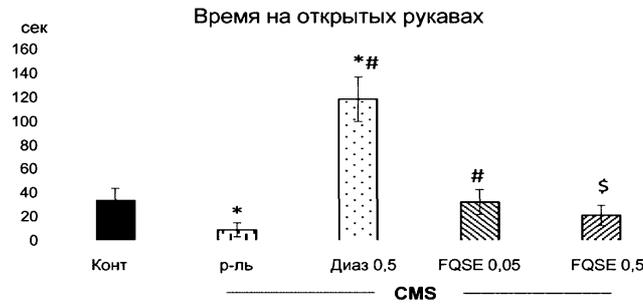
Фиг. 45А



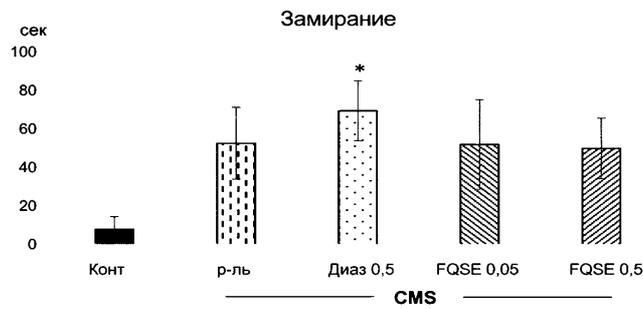
Фиг. 45Б



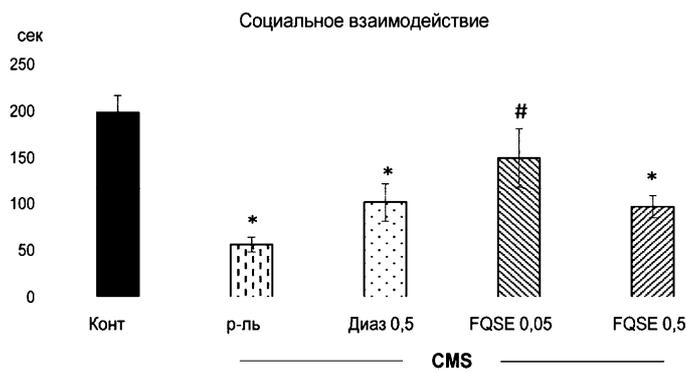
Фиг. 46



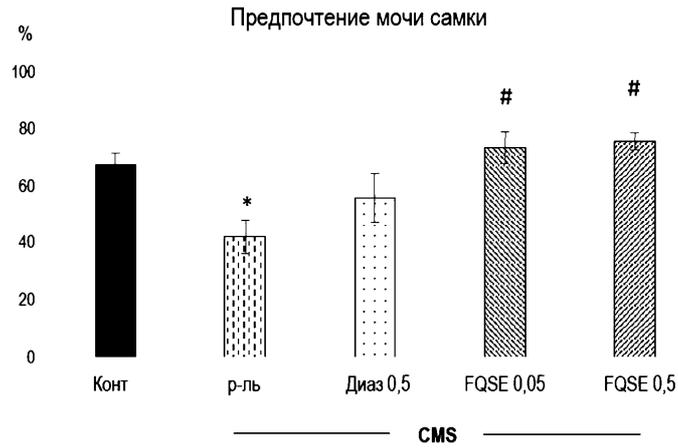
Фиг. 47А



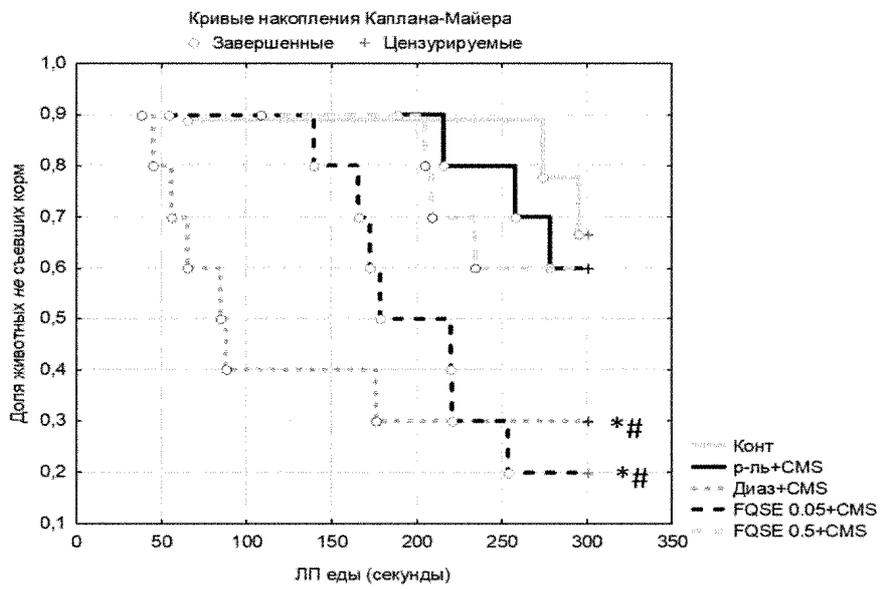
Фиг. 47Б



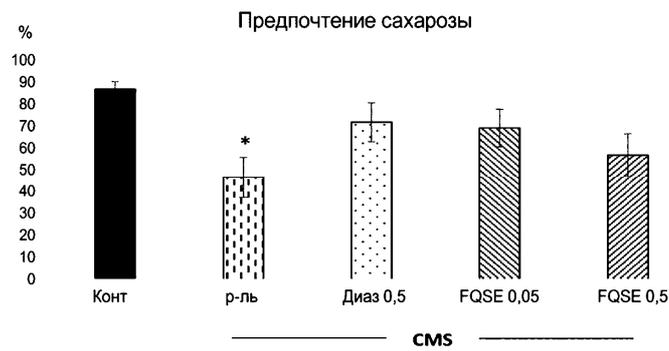
Фиг. 48



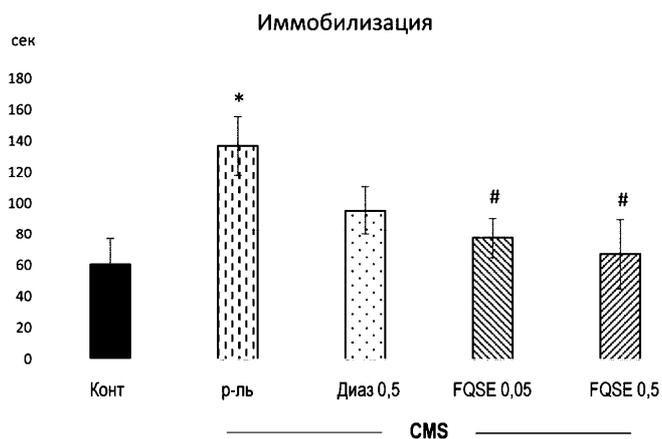
Фиг. 49



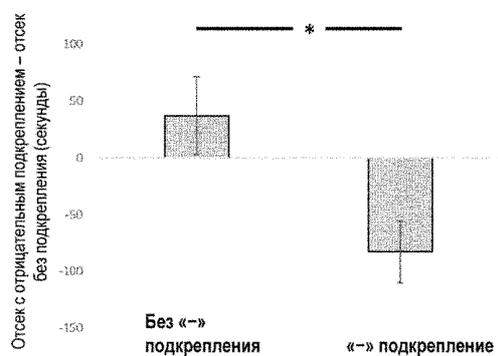
Фиг. 50



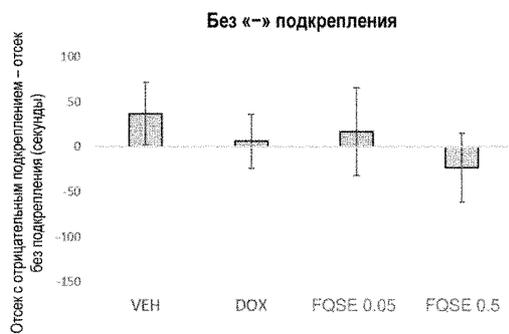
Фиг. 51



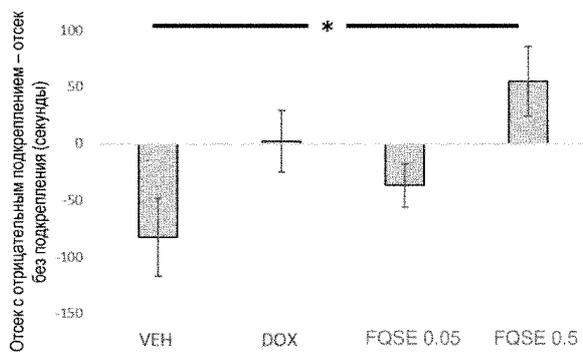
Фиг. 52



Фиг. 53А



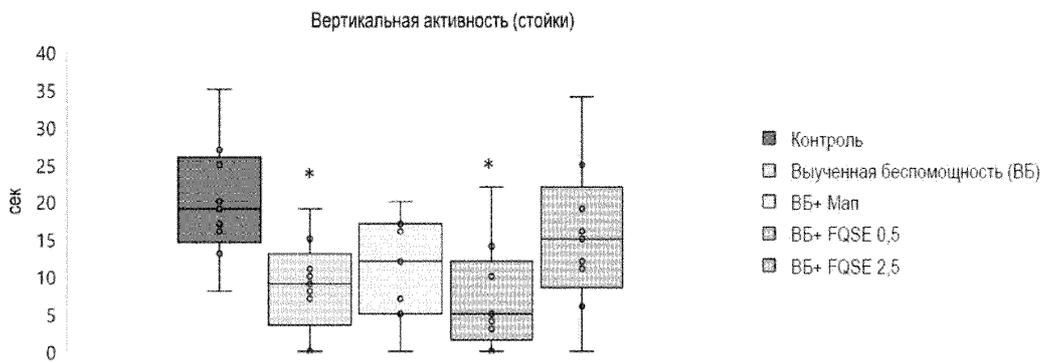
«-» подкрепление
Фиг. 53Б



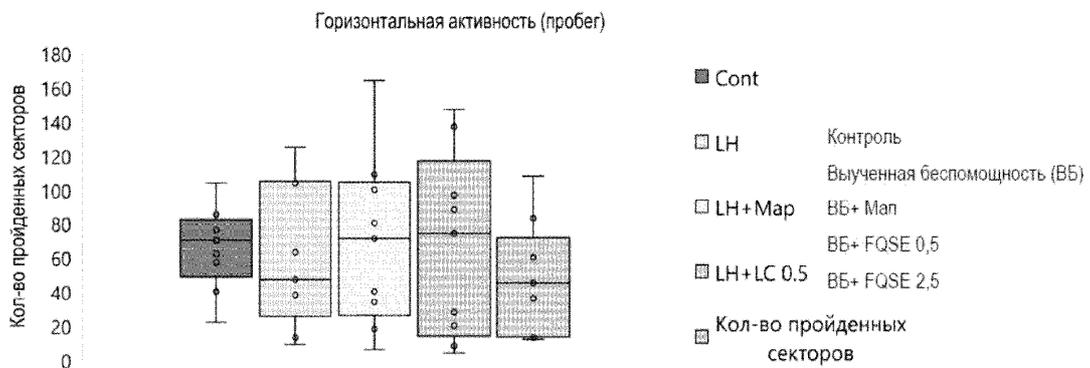
Фиг. 53В



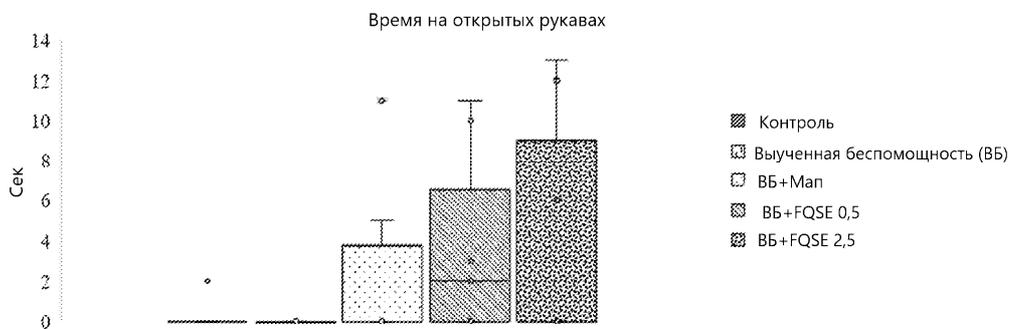
Фиг. 54



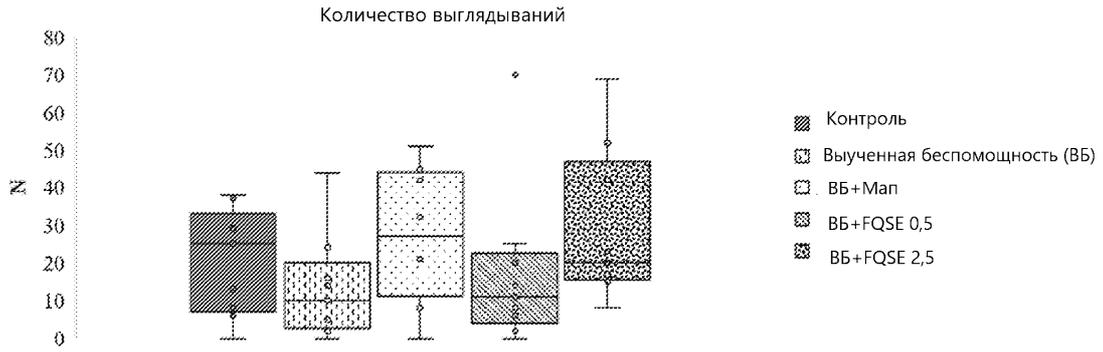
Фиг. 55А



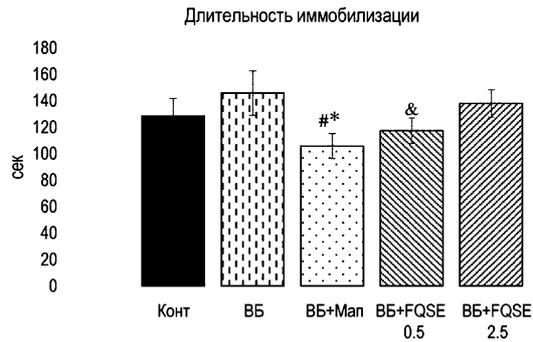
Фиг. 55Б



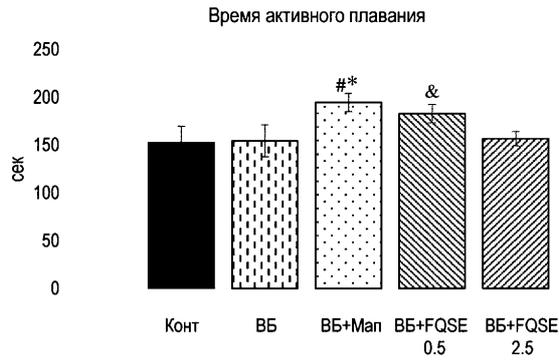
Фиг. 56А



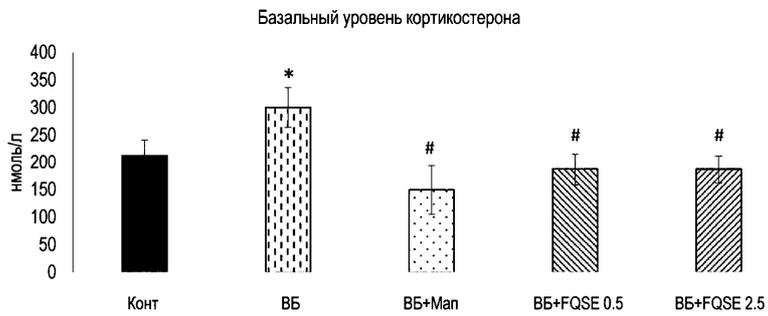
Фиг. 56Б



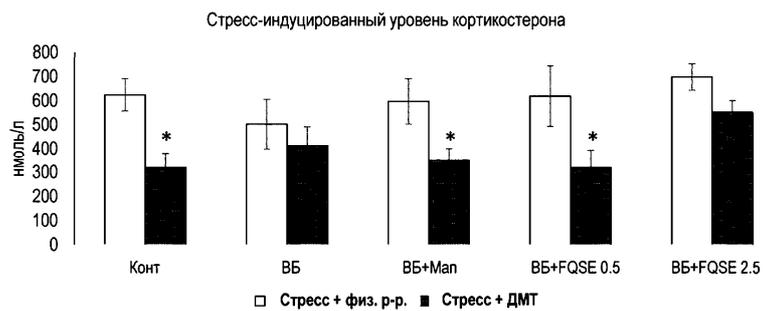
Фиг. 57А



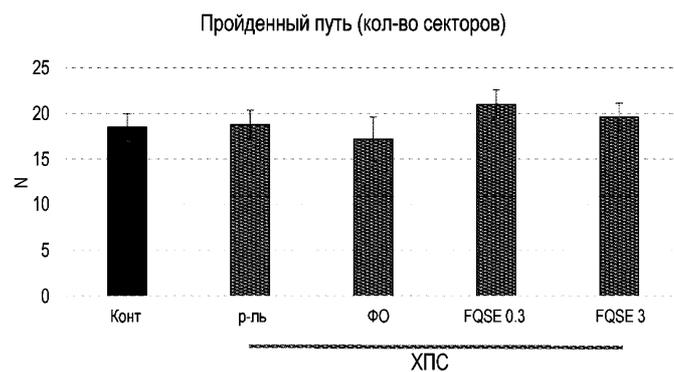
Фиг. 57Б



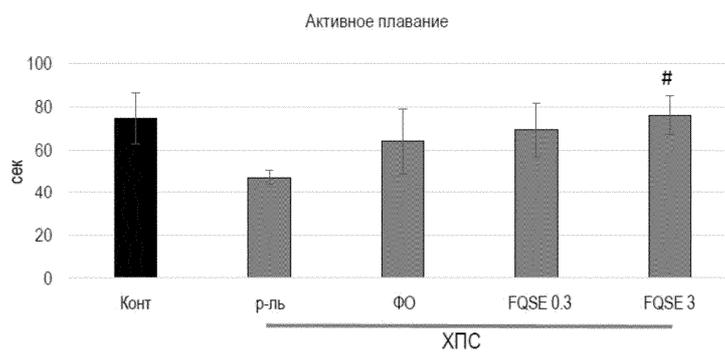
Фиг. 58



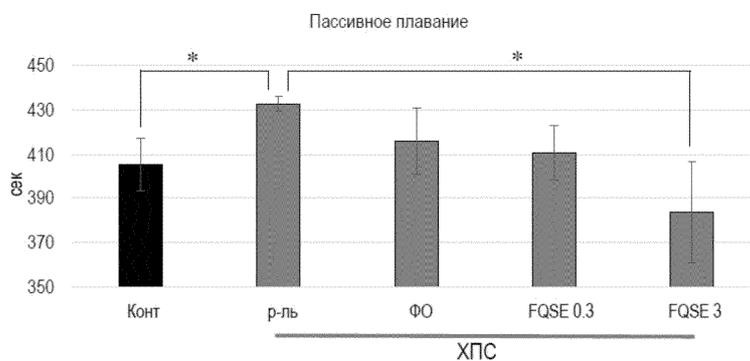
Фиг. 59



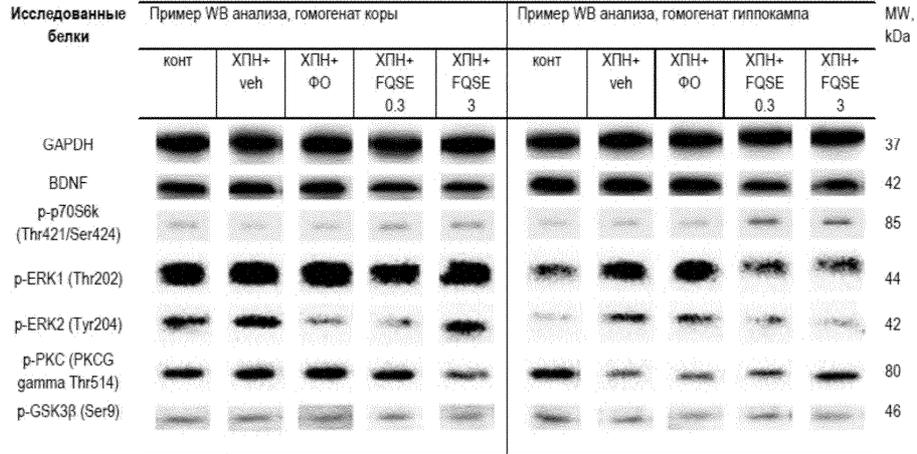
Фиг. 60



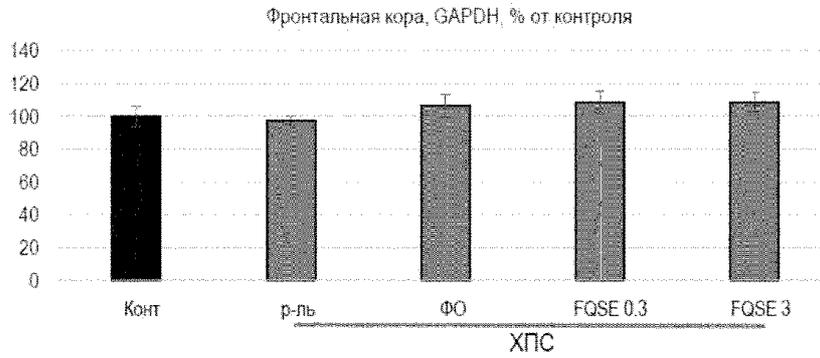
Фиг. 61А



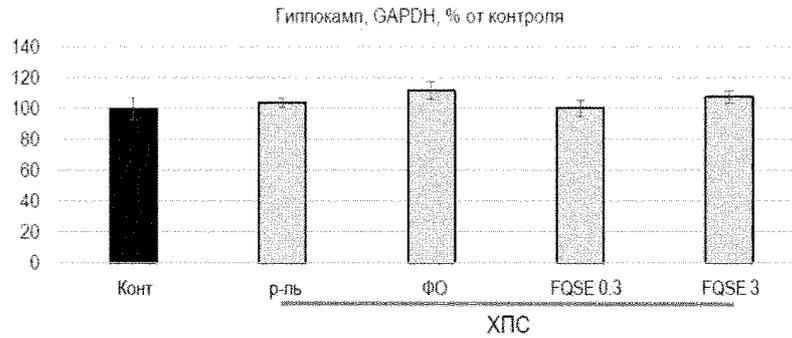
Фиг. 61Б



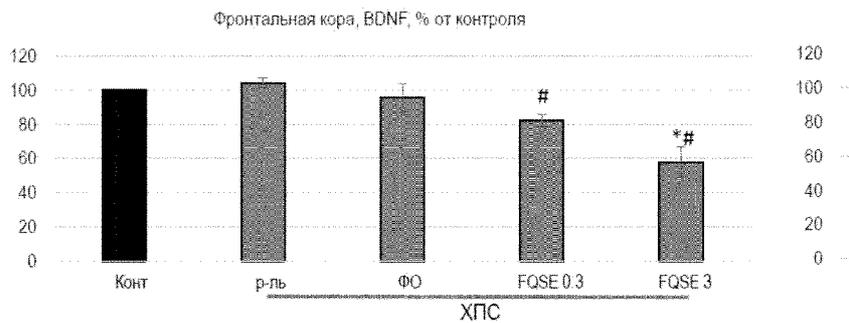
Фиг. 62



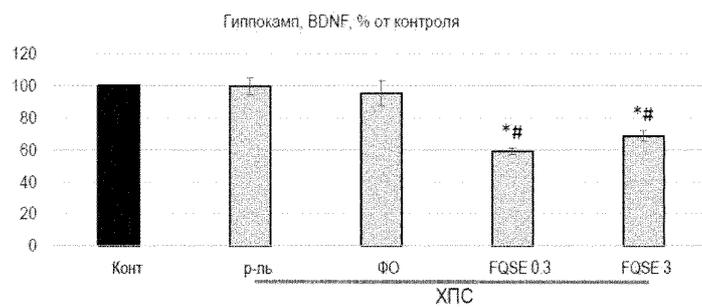
Фиг. 63А



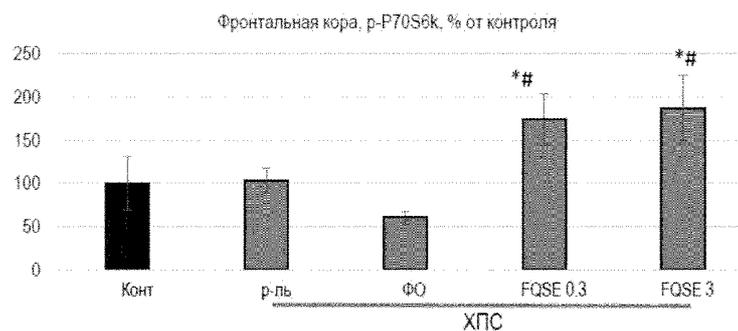
Фиг. 63Б



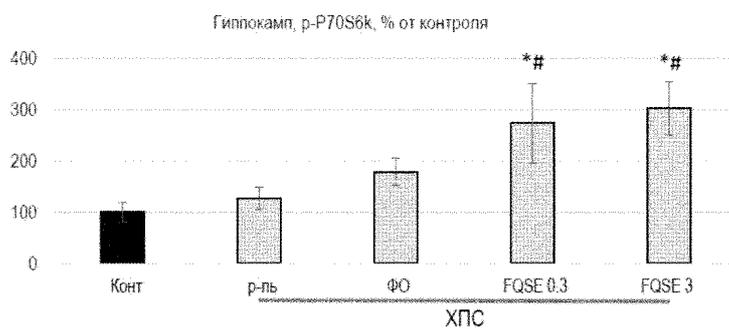
Фиг. 64А



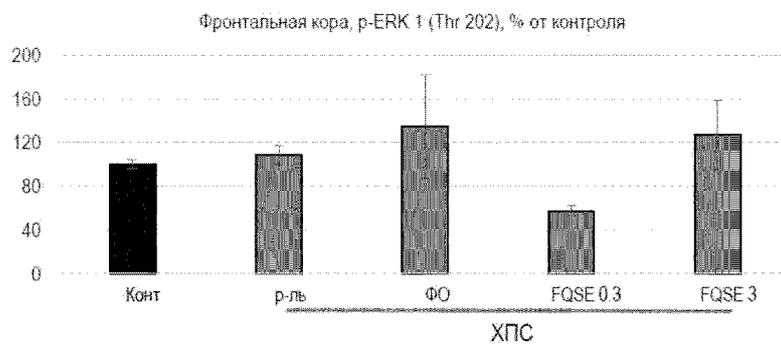
Фиг. 64Б



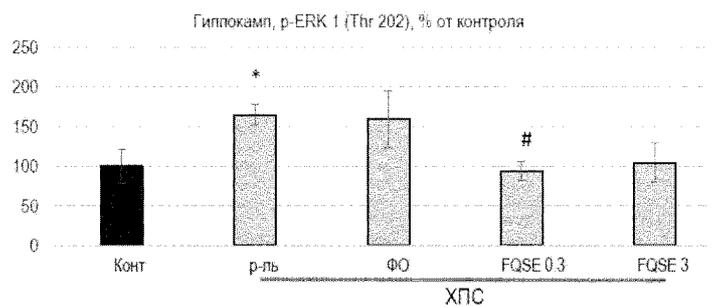
Фиг. 65А



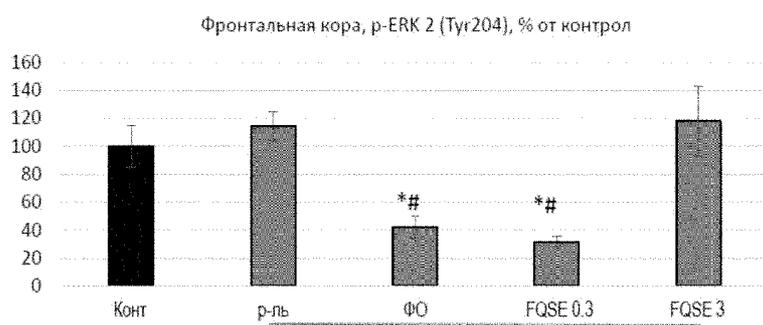
Фиг. 65Б



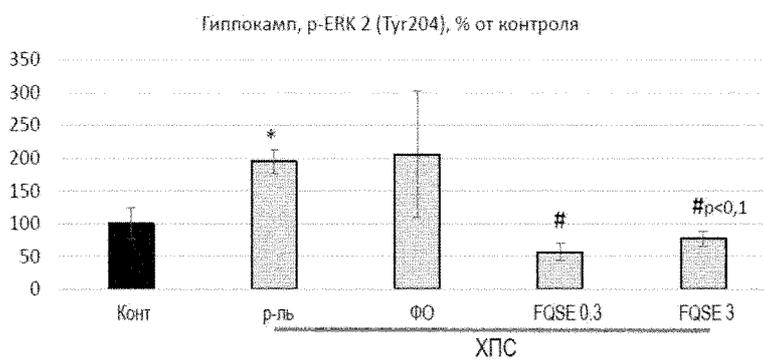
Фиг. 66А



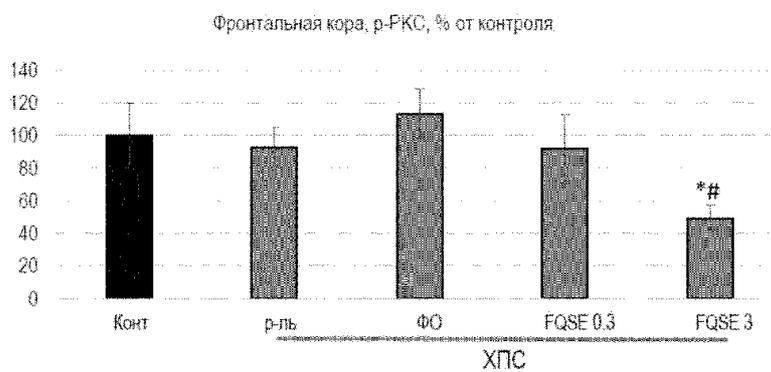
Фиг. 66Б



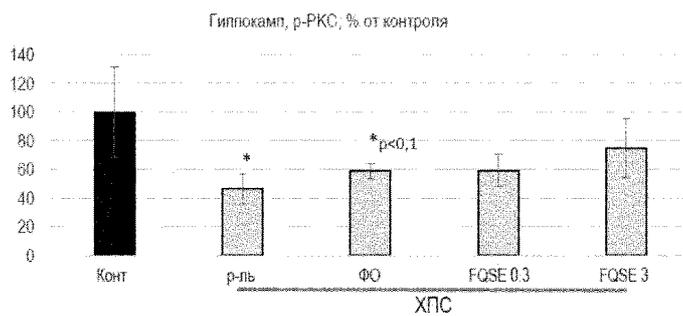
Фиг. 67А



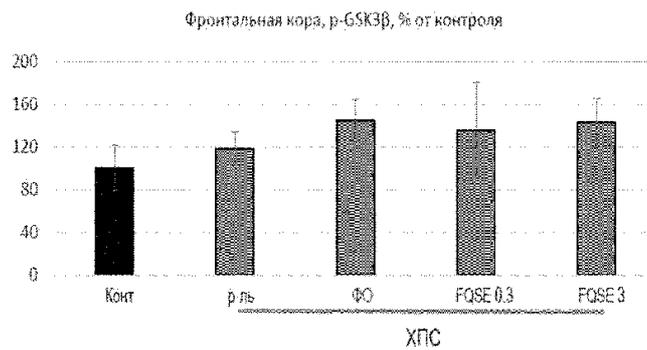
Фиг. 67Б



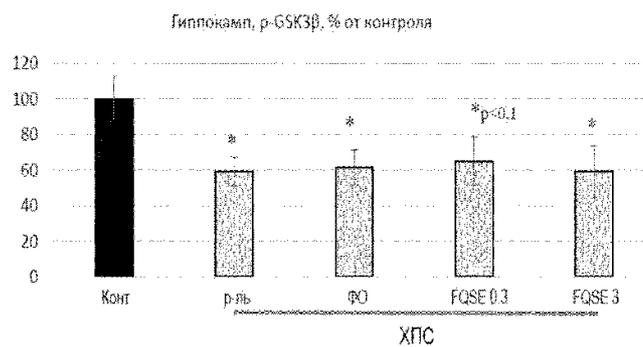
Фиг. 68А



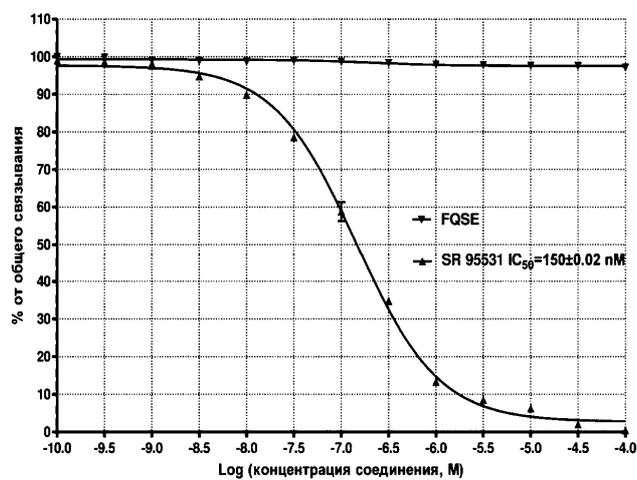
Фиг. 68Б



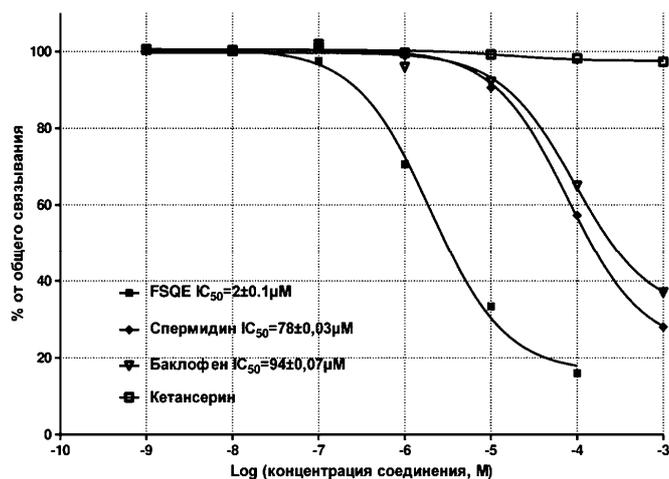
Фиг. 69А



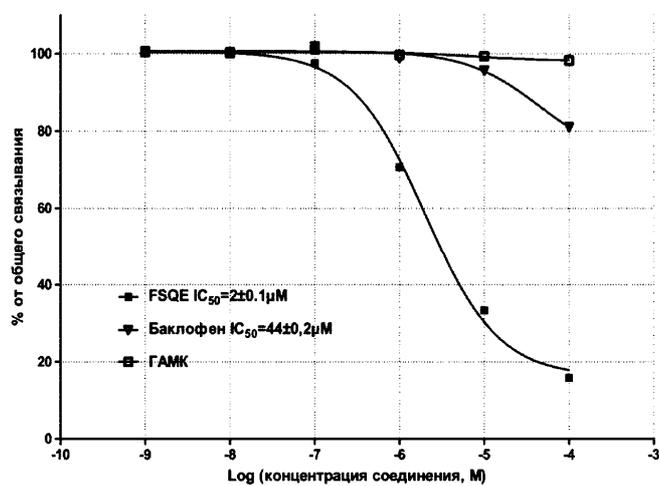
Фиг. 69Б



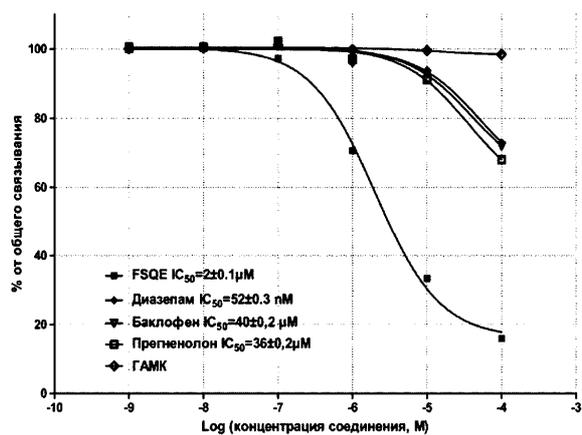
Фиг. 70



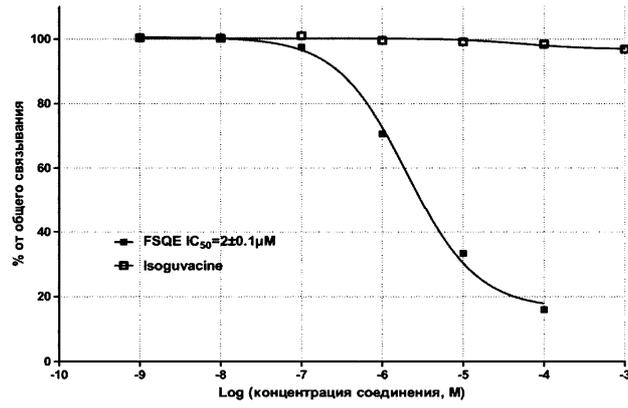
Фиг. 71



Фиг. 72



Фиг. 73



Фиг. 74



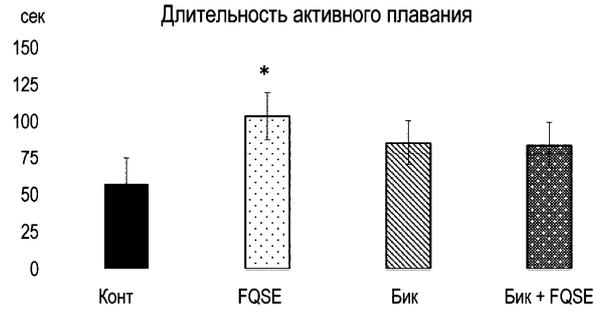
Фиг. 75А



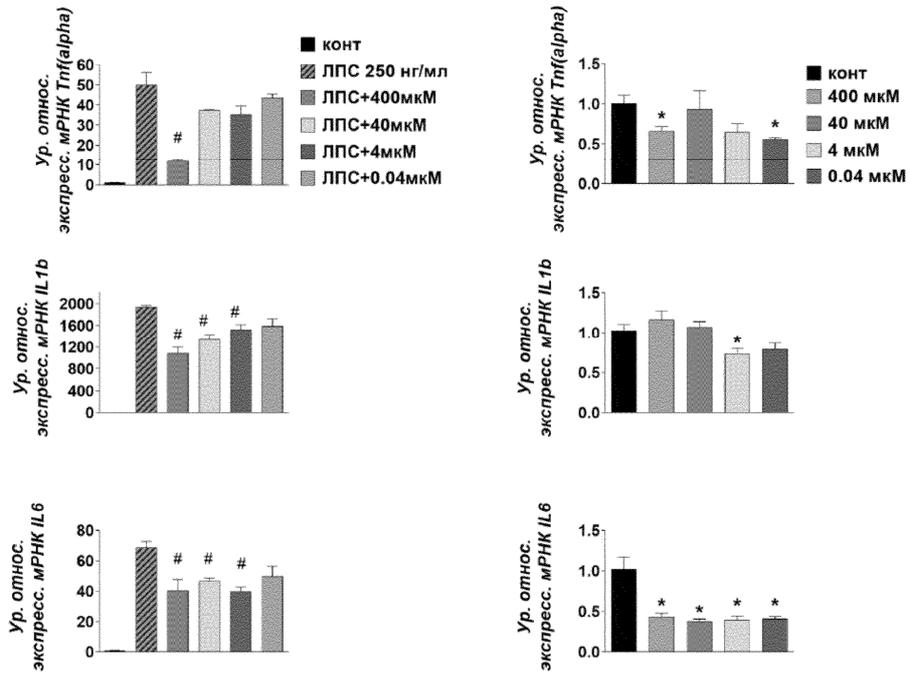
Фиг. 75Б



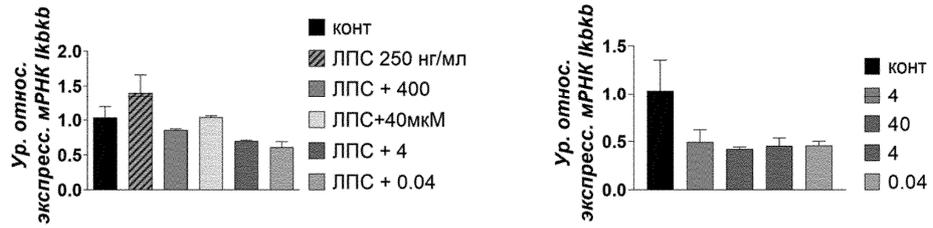
Фиг. 75В



Фиг. 76



Фиг. 77



Фиг. 78

