

УДК 616.831-005.1:612.13:577.112.3

НООТРОПНІ ВЛАСТИВОСТІ ТЕТРАПЕПТИДУ АСЕТЫЛ-(D-LYS)-LYS-ARG-ARG-AMIDE (KK-1) НА МОДЕЛІ ХВОРОБИ АЛЬЦГЕЙМЕРА У ЩУРІВ, ЗУМОВЛЕНОЇ ХРОНІЧНИМ ВВЕДЕННЯМ СКОПОЛАМІНУ

Р.Д.Дейко, С.Ю.Штриголь, Т.В.Горбач*, О.О.Колобов, А.С.Симбірцев****

Національний фармацевтичний університет
Харківський національний медичний університет*
ФДУП «Державний науково-дослідний інститут особливо чистих біопрепаратів» ФМБА Росії**

Ключові слова: хвороба Альцгеймера; нейропротекція; меланокортини; тетрапептиди; експеримент

THE NOOTROPIC PROPERTIES OF THE TETRAPEPTIDE ACETYL-(D-LYS)-LYS-ARG-ARG-AMIDE (KK-1) ON THE MODEL OF SCOPOLAMINE-INDUCED ALZHEIMER'S DISEASE IN RATS

R.D.Deiko, S.Yu.Shtrygol', T.V.Gorbach*, O.O.Kolobov, A.S.Simbirtsev****

*National University of Pharmacy, Kharkiv National Medical University**, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg***

Key words: Alzheimer's disease; neuroprotection; melanocortins; tetrapeptide; experiment

Improvement of Alzheimer's disease (AD) therapy is one of the most important tasks of the modern medicine and pharmacy. Creation and the pharmacological study of the original medicines for treating AD are promising. The most promising class of these drugs is neuroprotectors. In the Research Institute of Highly Pure Biopreparations the tetrapeptide acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide (the laboratory code – KK-1) has been synthesized. Under the conditions of the pre-clinical study it has demonstrated the pronounced neuroprotective and nootropic properties on the model of cerebral ischemia. The aim of the current work is to study the nootropic properties of KK-1 on the model of AD in rats. The scopolamine-induced AD in rats was reproduced. For 10 days the rats with AD model were treated with KK-1 (0.1 mg/kg intranasally once a day) or with the reference medicine donepezil (1 mg/kg orally once a day). After the therapy the functional state of the rats' CNS was evaluated using the open-field test (OFT), extrapolation escape task (EET) and the test of the conditioned reflex of passive avoidance (CRPA). The level of acetylcholine (Ach) and the activity of acetylcholinesterase (ACE) were measured using spectrophotometry in the whole brain homogenate and brain synaptosomes. The peptide KK-1 studied reduced the stress-related anxiety in OFT in rats, increased their exploratory activity (by 1.4 times, $p < 0.05$ compared to the pathology group) and decreased the emotional response on the stress (by 44%, $p < 0.05$). In EET the tetrapeptide KK-1 stimulated the rats' cognitive functions, decreased the time of escape by 4.7 times ($p < 0.05$ compared to the pathology group). Under the conditions of the CRPA test the high anti-amnesic activity of KK-1 was found (56.5% on the 1st day after the therapy and 81.5% on the 10th day). According to all indices the activity of KK-1 exceeded the reference medicine donepezil. The mechanism of the KK-1 nootropic action is in the increase of the Ach level in the rats' brain synaptosomes probably due to stimulation of its synthesis. The peptide KK-1 moderately inhibits the ACE leading also to the Ach level increase in the cholinergic synapse synaptic cleft. It is likely that the peptide KK-1 has an effect on the G_q/G_{11} -peptide-coupled M_1 -, M_3 -, and M_5 -cholinergic receptors as a positive allosteric modulator.

Актуальність удосконалення нейропротекторної терапії хвороб неврологічного профілю зростає. Це пов'язано, перш за все, зі збільшенням захворюваності населення на цереброваскулярні, нейродегенеративні та травматичні

патології головного мозку (ГМ) і недостатньою ефективністю існуючих методів лікування.

Хвороба Альцгеймера (ХА) являє собою нейродегенеративне захворювання, на яке у 2015 році страждало 0,44% населення світу, а до 2050 року

кількість хворих має зрости вчетверо [21]. На теперішній час терапія ХА здійснюється переважно засобами патогенетичного спрямування, які уповільнюють її розвиток або зменшують прояви основних симптомів. Впродовж останніх років деякі з цих препаратів (донепезил, ривастигмін, мемантин тощо) вивчаються на предмет нейропротекторної активності, оскільки встановлена їх здатність уповільнювати загибель центральних холінергічних нейронів. Проте успіх їх використання в клініч-

Р.Д.Дейко – магістр фармації, аспірант кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

Т.В.Горбач – канд. біол. наук, доцент кафедри біологічної хімії Харківського національного медичного університету

О.О.Колобов – доктор біол. наук, завідувач лабораторії хімії пептидів ФДУП «Державний науково-дослідний інститут особливо чистих біопрепаратів» ФМБА Росії (м. Санкт-Петербург)

них умовах недостатньо високий. Тому пошук нових препаратів для лікування ХА спрямований на створення та фармакологічне вивчення оригінальних сполук, серед яких найбільш перспективними вважаються нейропротектори.

Традиційним способом створення нових нейропротекторів є модифікація хімічної будови ендogenous фізіологічно активних речовин. Одним із джерел таких сполук є система меланокортинів ГМ, представлена проопіомеланокортином (ПОМК) та його дериватами: меланокортин-стимулювальним гормоном (МСГ- α , - β та - γ), лейцин- та метіонін-енкефалінами, адренкортикотропіном (АКТГ) тощо. Залученість цієї системи до патогенезу ХА відома ще з 80-х років минулого століття, коли з'ясувалася позитивна кореляція між вмістом АКТГ у тканині ГМ та рівнем психічних функцій при деменції альцгеймерівського типу [11]. Виконувалися спроби впливати на перебіг ХА за допомогою пептидів, створених на основі АКТГ, наприклад, ОРГ₂₇₆₆, що являв собою синтетичний гомолог АКТГ₄₋₉ зі структурою Н-Met-Glu-His-Phe-D-Lys-Phe-OH [20]. Результати нещодавніх досліджень вказують на виразні нейропротекторні властивості за ХА деяких гомологів МСГ- α та АКТГ [14, 15]. Більше того, у Росії з метою корекції когнітивних порушень при ХА використовують гептапептидний гомолог АКТГ₄₋₇ семакс, що демонструє достатньо високу ноотропну активність. Таким чином, комплекс проведених досліджень свідчить про перспективність використання пептидів-представників системи меланокортинів для терапії ХА.

Тривалий час залишалися невідомими фармакологічні властивості Lys-Arg пар ПОМК, фізіологічна роль яких полягає у маркуванні цієї молекули задля її «нарізання» карбоксипептидазами на окремі фрагменти [19].

В результаті нещодавніх досліджень з'ясувалося, що послідовність Lys⁹⁴-Lys⁹⁵-Arg⁹⁶ присутня у β -вигині 4 петлі нейротрофічного фактора мозку (BDNF) та є комплементарною ділянці рецептора нейротрофінів р75^{NTR}, зв'язуючись з яким, молекула BDNF запускає ендogenous нейропротекторний каскад. У молекулі фактора росту нервів (NGF) цій ділянці є еквівалентною послідовність Lys³²-...-Lys³⁴, що також відповідає за афінитет NGF до рецепторів нейротрофінів [12]. В іншій роботі показано [9], що мінімальним фрагментом АКТГ, необхідним для зв'язування з меланокортиновим рецептором, є ділянка 15-18 (Lys-Lys-Arg-Arg). З огляду на накопичені дані в НДІ Особливо чистих біопрепаратів (м. Санкт-Петербург, Росія) синтезовано низку гомологів АКТГ₁₅₋₁₈, найоптимальніший комплекс фармакологічних властивостей серед яких виявляє тетрапептид acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide (лабораторний шифр КК-1). Цей фармакологічний препарат покращує церебральний та системний кровообіг щурів із гострим порушенням мозкового кровообігу, значно зменшує нейроапоптоз та нейродеструкцію за церебральної ішемії, оверекспресію NGF, імовірно, компенсуючи його ендogenous нейропротекторну функцію, демонструє антигіпоксичні, виразні ноотропні та антидепресантні властивості [3]. За рахунок D-форми лізину у молекулі КК-1 його дія є тривалою (понад 24 год).

Безпосередньо впливаючи на систему нейротрофінів ГМ, тетрапептид КК-1 є потенційно фармакологічно активним за ХА. Тому метою дослідження стало експериментальне вивчення його нейропротекторних та ноотропних властивостей на моделі ХА у щурів.

Матеріали та методи

Використано 28 білих рандомбредних щурів-самців ма-

сою 200-240 г, отриманих з виварію Центральної науково-дослідної лабораторії НФаУ. Формували 4 групи тварин по 7 у кожній: 1 – «Інтактний контроль» (ІК), 2 – «Контрольна патологія» (КП), 3 – «Препарат порівняння», 4 – «Пептид КК-1». Моделювали скополамін-зумовлену ХА [6]. Протягом 27 діб щурам усіх груп, окрім ІК, внутрішньоочеревинно (в/о) вводили скополамін (Sigma, США) в дозі 1 мг/кг 1 раз на день. З 28 дня протягом 10 діб тваринам 3 та 4 груп вводили препарат порівняння та нейропептид КК-1 відповідно. Як препарат порівняння використано інгібітор ацетилхолінестерази (АХЕ) центральної дії донепезил («Алзепіл», ЗАТ Фармацевтичний завод ЕГІС, Угорщина). Його вводили 1 раз на день внутрішньошлунково (в/ш) в дозі 1 мг/кг. Тетрапептид КК-1 вводили також 1 раз на день інтраназально (і/н) у дозі 0,1 мг/кг. Тварини групи КП і/н та в/ш отримували еквівалентну кількість ізотонічного розчину натрію хлориду.

Після курсу терапії оцінювали функціональний стан ЦНС тварин за тестами відкритого поля (ВП), екстраполяційного вивільнення (ЕВ) та умовного рефлексу пасивного уникнення (УРПУ) [6, 25]. Тести ВП та ЕВ виконували на перший день після терапії, а УРПУ – на перший та 10-й день. Критерій навченості УРПУ – перебування в освітленому відділі приладу не менше 180 с. Антиамнестичну активність (АА) розраховували за формулою Баттлера [5]:

$$AA = (\Delta LP_{\text{п}} - \Delta LP_{\text{с}}) / (\Delta LP_{\text{п}} - \Delta LP_{\text{с}}) \cdot 100 (\%),$$

де: АА – антиамнестична активність, %;

$\Delta LP_{\text{п}}$ – різниця латентного періоду входу до неосвітленої камери під час навчання та під час відтворення УРПУ для групи фармакологічного препарату (донепезил або КК-1);

Таблиця 1

Вплив фармакологічного препарату КК-1 та препарату порівняння донепезилу на рухову, орієнтовно-дослідницьку активність та емоційні реакції щурів із моделлю скополамін-зумовленої хвороби Альцгеймера, n=28

Показники (за 3 хв)	Інтактний контроль (n=7)	Скополамін 1 мг/кг в/о, 27 днів		
		контрольна патологія (n=7)	донепезил 1 мг/кг в/ш 10 днів (n=7)	КК-1 0,1 мг/кг і/н 10 днів (n=7)
Рухова активність (квадрати)	15,29±3,68	14,29±3,18	2,00±0,69* ^Λ	10,43±2,67\$
Орієнтовно-дослідницька активність:				
Сійки	5,71±1,17	2,43±0,57*	0,43±0,20* ^Λ	2,43±0,72*\$
Отвори	12,43±1,57	6,29±1,39*	2,00±0,62* ^Λ	9,57±1,38 ^Λ \$
Сума	18,00±2,08	8,71±1,76*	2,43±0,69* ^Λ	12,00±1,70*\$
Емоційні реакції:				
Болюси	1,00±0,69	0,86±0,86	2,00±0,98	0,29±0,18
Уринації	0,71±0,29	1,14±0,40	0,57±0,30	1,29±0,42
Грумінг	4,14±0,67	2,29±0,78	0,71±0,57*	2,29±0,47*\$
Сума	5,86±0,60	4,29±0,97	3,29±1,38	3,86±0,46*
Сума всіх видів активності	39,15±5,83	27,29±4,50 (– 30,3)	7,71±2,41* ^Λ (– 80,3)	26,29±3,10\$ (– 32,8)

Примітка. У дужках – % змін до групи контролю; відмінності статистично значущі (p<0,05): * – з групою інтактного контролю, ^Λ – з групою контрольної патології, \$ – з групою препарату порівняння (донепезил).

ДЛП_c – різниця латентного періоду входу до неосвітленої камери під час навчання та під час відтворення УРПУ для групи КП;

ДЛП_i – різниця латентного періоду входу до неосвітленої камери під час навчання та під час відтворення УРПУ для групи ІК.

Після цього щурів виводили з експерименту шляхом наркотизації та декапітували. ГМ виймали та заморожували в середовищі рідкого азоту для подальших біохімічних досліджень. У гомогенаті, отриманому з великих півкуль ГМ, спектрофотометрично визначали вміст ацетилхоліну (АХ) [7] та активність АХЕ за методом Елмана та співавторів [10]. За методом Хаєша [16] із тканини мозку виділяли синаптосоми холінергічних нейронів, де також визначали рівень АХ та активність АХЕ.

Результати обробляли статистично за допомогою програм Statistica 8.0 та Microsoft Excel. Використовували однофакторний дисперсійний аналіз (one-way ANOVA) або кутове пере-

творення Фішера φ при урахуванні результатів в альтернативній формі. Відмінності вважали статистично значущими при p<0,05.

Дослідження виконано відповідно до положень Директиви 2010/63/EU Європейського Парламенту і Ради ЄС «Про охорону тварин, використовуваних з науковою метою» (2010).

Результати та їх обговорення

Вплив фармакологічних препаратів на показники тварин зі скополамін-зумовленою ХА у тесті ВП наведено у табл. 1. Як видно з таблиці, тварини з модельною патологією (група КП) характеризуються зменшенням орієнтовно-дослідницької активності у 2,1 рази порівняно з групою інтактного контролю (p<0,05), у той час як їх локомоторна активність майже не змінюється. Це свідчить про підвищення емоційної лабільності та стрес-зумовленої тривожності щурів із моделлю ХА у відповідь на невідомий відкритий простір. Донепезил не тільки не відновлює,

але і зменшує як рухову, так і орієнтовно-дослідницьку (у 7,1 та 3,6 рази відповідно, порівняно з групою КП) активність щурів, виявляючи виразні седативні властивості (p<0,05). На тлі тетрапептиду КК-1 орієнтовно-дослідницька активність зростала у 1,4 рази порівняно з групою КП за рахунок збільшення горизонтального компоненту (кількості обстежених отворів, p<0,05 з групою патології). Також досліджуваний пептид статистично значущо зменшує кількість актів грумінгу (прояв стресової реакції) на 44% порівняно з групою контролю (p<0,05). Таким чином, в умовах тесту ВП тетрапептид КК-1 зменшує емоційну лабільність щурів із моделлю ХА, що виявляється підвищенням їх орієнтовно-дослідницької активності і зниженням проявів стрес-зумовленої компульсивної поведінки (грумінгу).

В тесті ЕВ тварини із модельною ХА характеризуються зниженням когнітивних функцій, що виявляється збільшенням часу, необхідного для пір-

Таблиця 2

Вплив фармакологічного препарату КК-1 та препарату порівняння донепезилу на показники щурів із моделлю скополамін-зумовленої хвороби Альцгеймера у тесті екстраполяційного вивільнення, n=28

Показники (за 3 хв)	Інтактний контроль (n=7)	Скополамін 1 мг/кг в/о, 27 діб		
		контрольна патологія (n=7)	донепезил 1 мг/кг в/ш 10 діб (n=7)	КК-1 0,1 мг/кг і/н 10 діб (n=7)
Час екстраполяційного вивільнення, с	37,17±8,51	51,29±3,12*	18,86±3,57	11,00±3,07*^
% тварин, що виконали завдання	100%	100%	100%	100%

Примітка. Відмінності статистично значущі ($p \leq 0,05$): * – з групою інтактного контролю, ^ – з групою контрольної патології.

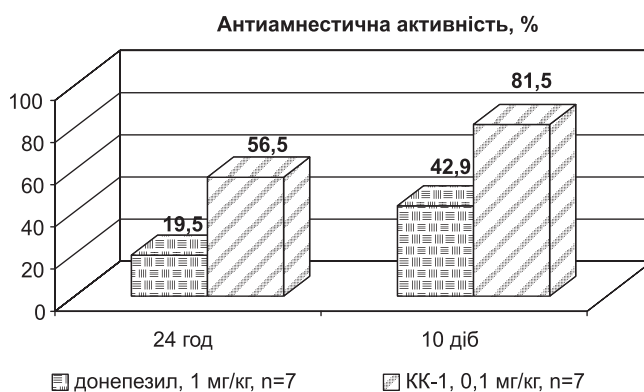


Рис. 1. Антиамнестична активність фармакологічного препарату КК-1 та препарату порівняння донепезилу у щурів з моделлю скополамін-зумовленої хвороби Альцгеймера в тесті умовного рефлексу пасивного уникнення на 1 та 10 добу після терапії

нання під край циліндра приладу ЕВ на 38% ($p < 0,05$ проти групи КП, табл. 2). Тетрапептид КК-1 позитивно впливає на цей показник. Він зменшує час піднірвання тварин під край циліндра у 4,7 рази порівняно з

групою КП ($p < 0,05$). Подібні результати отримані в експерименті на інтактних тваринах [2]. Отже, позитивний вплив тетрапептиду КК-1 на побудову оптимальної моделі поведінки щурів за умов тесту ЕВ характери-

зує його здатність стимулювати когнітивні функції, що є проявом ноотропної дії.

У тесті УРПУ (табл. 3) модельна ХА виявляється суттєвим зниженням латентного часу входу до затемненого відсіку приладу як на 1 добу (на 58,1%, $p < 0,05$ з групою КП), так і на 10 добу після терапії (на 61,1%, $p < 0,05$ з групою КП). Таким чином, спостерігається порушення формування та фіксації пам'ятного сліду в щурів з модельною патологією, що свідчить про погіршення їх мнестичних функцій.

Тетрапептид КК-1 та препарат порівняння підвищують латентний час входу тварин до затемненої камери. На 1 добу після терапії досліджуваний препарат КК-1 перевершує за активністю донепезил, який діє лише на рівні тенденції. На 10 до-

Таблиця 3

Вплив фармакологічного препарату КК-1 та препарату порівняння донепезилу на латентний час входу щурів до затемненого відсіку в тесті умовного рефлексу пасивного уникнення, n=28

Група, n	Латентний час входу в затемнений відсік приладу УРПУ, с		
	вихідний	через 24 год	через 10 діб
Інтактний контроль (n=7)	18,71±3,52	167,86±11,49	99,86±17,06
Контрольна патологія (скополамін) (n=7)	20,29±5,54	70,29±16,44*	38,86±11,62*
Скополамін + Донепезил (1 мг/кг в/ш) (n=7)	24,00±6,23	93,29±26,11*	69,43±11,10^
Скополамін + КК-1 (0,1 мг/кг і/н) (n=7)	20,14±3,73	126,14±23,62	89,71±19,09^

Примітка. Відмінності статистично значущі ($p \leq 0,05$): * – з групою інтактного контролю, ^ – з групою контрольної патології.

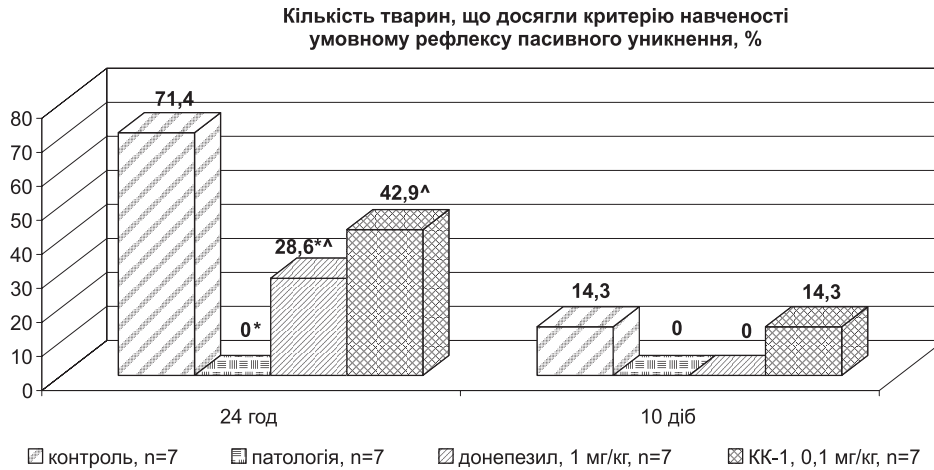


Рис. 2. Вплив фармакологічного препарату КК-1 та препарату порівняння донепезилу на кількість щурів із моделлю скополамін-зумовленої хвороби Альцгеймера, що досягли критерію навченості умовному рефлексу пасивного уникнення на 1 та 10 добу після терапії, n=28.
Примітка: відмінності статистично значущі ($p \leq 0,05$): * – з групою інтактного контролю; ^ – з групою контрольної патології

бу пептид КК-1 підвищує латентний час входу у 2,3 рази ($p < 0,05$ з групою КП), а донепезил – в 1,7 рази ($p < 0,05$ з групою КП).

На рис. 1 зображено АА активність фармакологічного препарату КК-1 та донепезилу через 24 год та 10 діб після тера-

пії (тест УРПУ). Як у першому, так і у другому випадках АА тетрапептиду КК-1 є вищою за показник препарату порівняння.

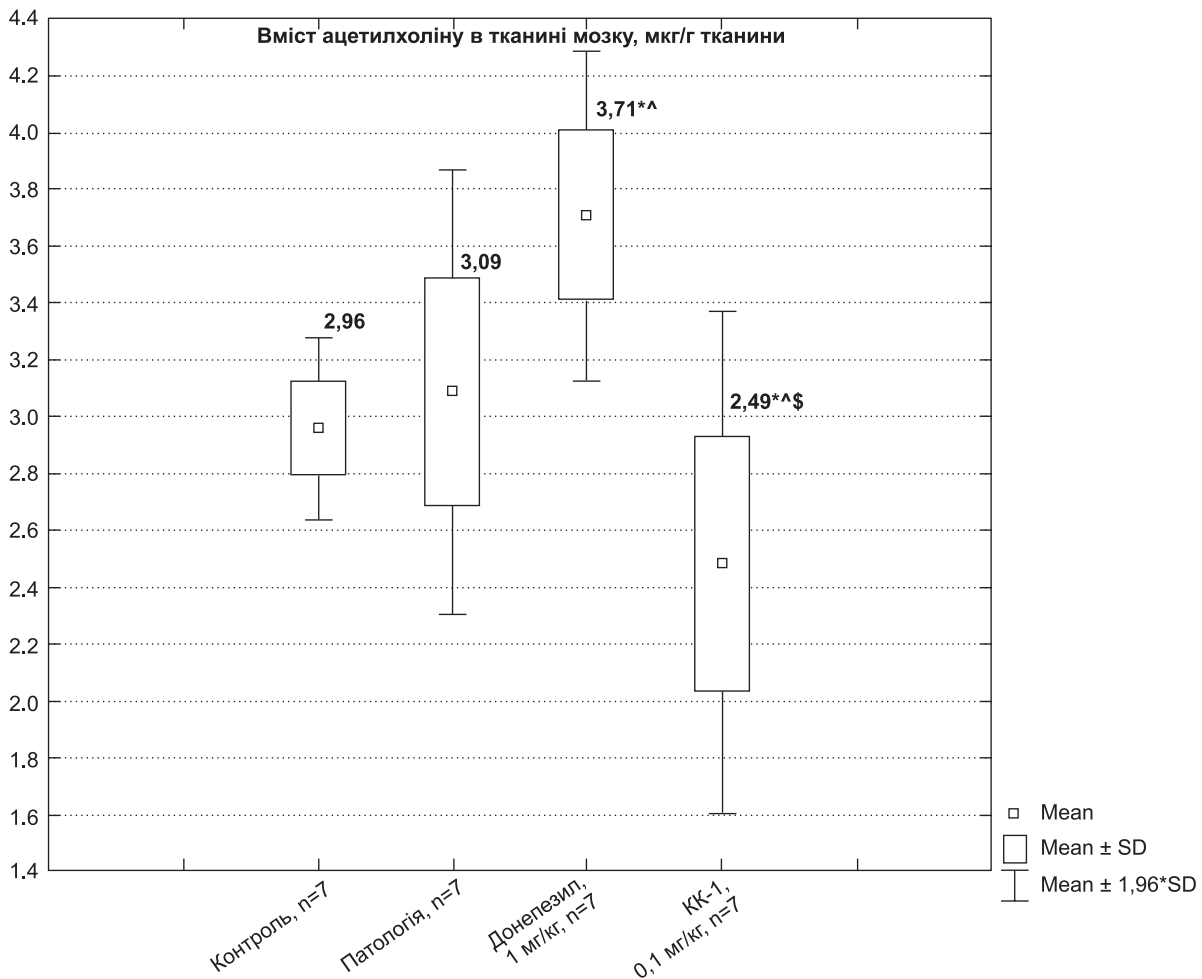


Рис. 3. Вплив фармакологічного препарату КК-1 та препарату порівняння донепезилу на вміст ацетилхоліну в тканині мозку щурів із моделлю скополамін-зумовленої хвороби Альцгеймера, n=28.
Примітка. Відмінності статистично значущі ($p \leq 0,05$): * – з групою контролю; ^ – з групою патології; \$ – з групою донепезилу

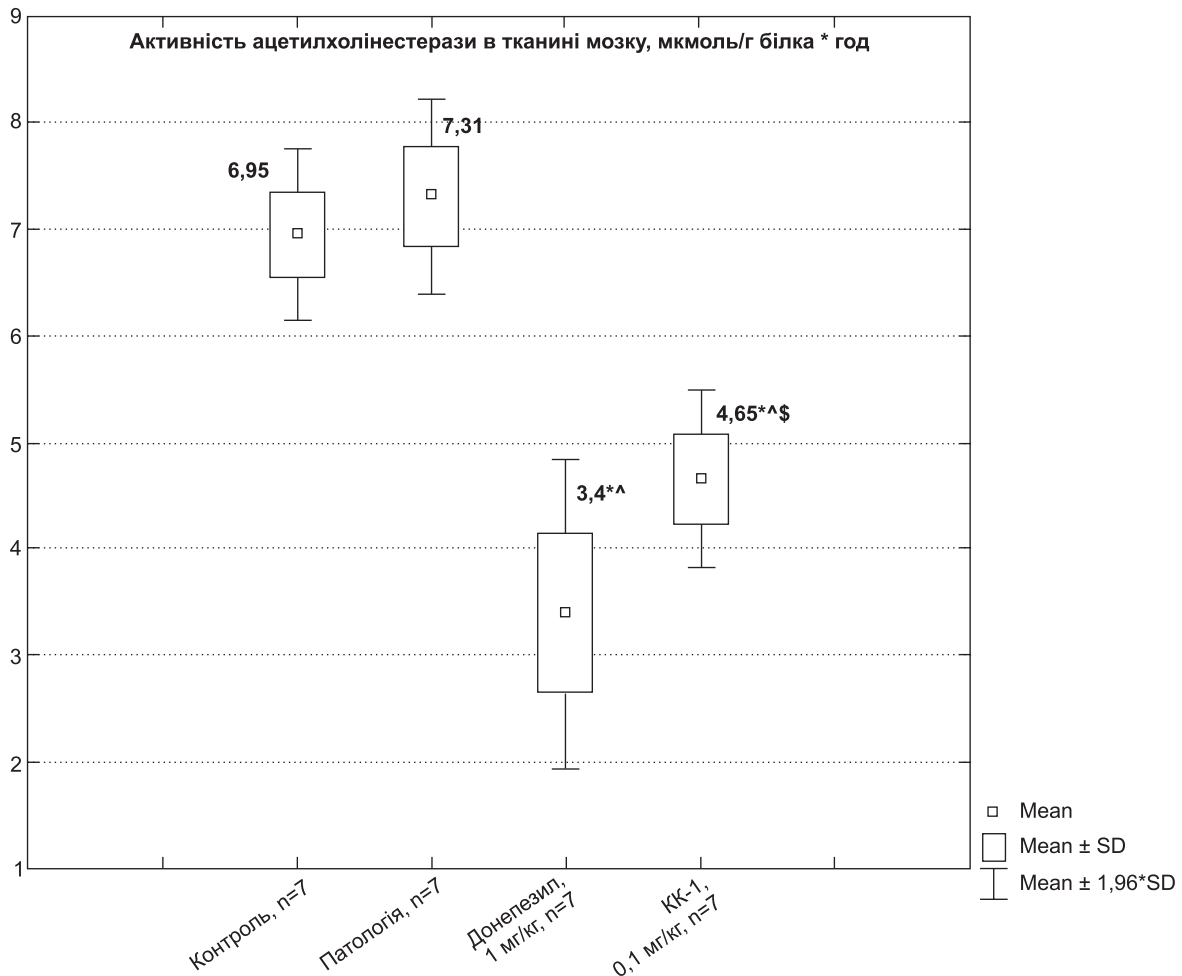


Рис. 4. Вплив фармакологічного препарату КК-1 та препарату порівняння донепезилу на активність ацетилхолінестерази в тканині мозку щурів із моделлю скополамін-зумовленої хвороби Альцгеймера, n=28. Примітка. Відмінності статистично значущі ($p \leq 0,05$): * – з групою контролю; ^ – з групою патології; \$ – з групою донепезилу

На 10 добу АА пептиду зростає, що свідчить про тривалість його ноотропного ефекту. Досліджуваний фармакологічний препарат позитивно впливає також на другий показник тесту УРПУ – кількість тварин, що досягли критерію навченості рефлексу (рис. 2). На 1 добу цей показник щурів групи КК-1 становив 42,9%, перевершуючи аналогічну активність донепезилу (статистично значущі відмінності з групою ІК відсутні), а на 10 добу – 14,3%, тим часом як відповідні показники в групах донепезилу та КП зменшувалися до 0% впродовж 10 діб.

Вміст АХ та активність АХЕ в тканині мозку та в синаптосомах зображено на рис. 3-6. За умов модельної ХА у синаптосомах ГМ щурів різко зростає

активність АХЕ (на 30,6%, $p < 0,05$ з групою ІК) та, як наслідок, зменшується кількість АХ (на 29%, $p < 0,05$ з групою ІК), але в тканині цілого мозку різниця між цими показниками в групах ІК та КП є статистично незначущою. Імовірно, загальний рівень АХ у тканині цілого мозку статистично значущо не зменшується за рахунок його наявності у позаклітинному просторі та тих клітинних утвореннях, де він не виконує медіаторної функції (наприклад, у тілі нейрону). Зростання активності АХЕ, що спостерігається в даному випадку, є фізіологічно обґрунтованим, оскільки тривала блокада постсинаптичних рецепторів скополаміном та надлишок незв'язаного з рецепторами медіатора у синаптичній

щіліні запускають механізм його ферментативного руйнування.

Препарат порівняння донепезил в цих умовах діє як типовий інгібітор АХЕ, зменшуючи активність ферменту як у синаптосомах (у 3,1 рази, $p < 0,05$ з групою КП), так і в тканині цілого мозку (у 2,2 рази, $p < 0,05$ з групою КП). Це приводить до зростання кількості АХ у тканині мозку та нормалізації у синаптосомах. Проте, як відомо з літературних джерел, накопичення АХ у синаптичній щіліні під дією донепезилу не корелює з його ноотропними властивостями в умовах деяких експериментальних моделей ХА [18], чим можуть пояснюватися низькі показники функціональної активності ЦНС щурів із моделлю

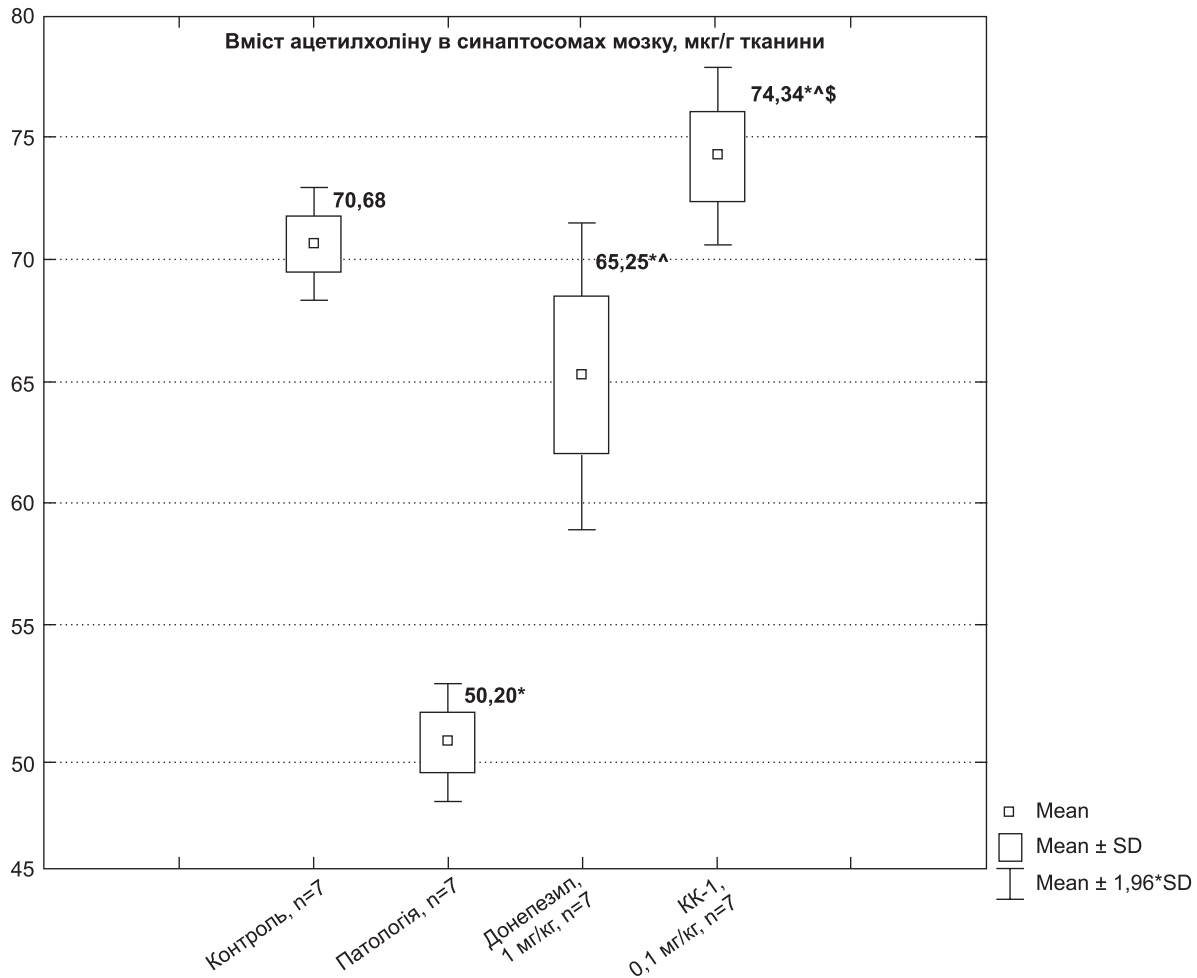


Рис. 5. Вплив фармакологічного препарату КК-1 та препарату порівняння донепезилу на вміст ацетилхоліну в синаптосомах мозку щурів із моделлю скополамін-зумовленої хвороби Альцгеймера, n=28. Примітка. Відмінності статистично значущі ($p \leq 0,05$): * – з групою контролю; ^ – з групою патології; \$ – з групою донепезилу

ХА, виявлені в тестах ВП, ЕВ та УРПУ.

Досліджуваний пептид КК-1, на відміну від донепезилу, незначно пригнічує АХЕ, проте сприяє накопиченню АХ у синаптосомах більш виразно, ніж препарат порівняння. Кількість медіатора зростає в 1,5 рази порівняно з групою КП ($p < 0,05$). За цим показником КК-1 перевершує активність донепезилу на 14% ($p < 0,05$). Той факт, що на тлі пептиду КК-1 рівень АХ у синаптосомах зростає виразніше, ніж під дією донепезилу, а активність АХЕ пригнічується слабше, дозволяє припустити позитивний вплив досліджуваного препарату на утворення або внутрішньоклітинний транспорт медіатора із соми нейрону, де він утворюється в цитозолі.

Відомо, що хронічна блокада мускаринових рецепторів (М-ХР) гіпокампу, смугастого тіла та кори переднього мозку скополаміном погіршує тривалу потенціацію (англ. long-term potentiation) – основну складову нейрональної пластичності [13, 23]. Здатність фармакологічного препарату КК-1 покращувати процеси навчання (зменшувати стрес-зумовлену тривожність щурів у тесті ВП, покращувати розумову діяльність у тесті ЕВ) і запам'ятовування (тест УРПУ) на тлі блокади холінергічних структур ГМ свідчить про його залученість до регуляції механізмів клітинної пам'яті. Вона може реалізовуватися також завдяки підвищенню афінитету АХ до центральних М-ХР. Такий механізм при-

таманий низці алостеричних агоністів та позитивних алостеричних модуляторів холінергічного рецепторного комплексу, які мають ряд переваг перед інгібіторами АХЕ (вищу фармакологічну активність) та прямими мускариновими агоністами (кращий профіль безпеки) [8, 24]. Оскільки скополамін є неселективним блокатором М-ХР, невідомо, за посередництва яких саме їх підтипів реалізується ноотропна активність пептиду КК-1.

Центральні М-ХР представлені 5 підтипами та є метаботропними G-білок-зв'язаними рецепторами (G-protein-coupled receptors, GPCR). З них 3 підтипи (M_1 , M_3 та M_5) пов'язані з G_q/G_{11} -білком, а два (M_2 та M_4) – з $G_{i/o}$ -білком [22]. За типом внут-

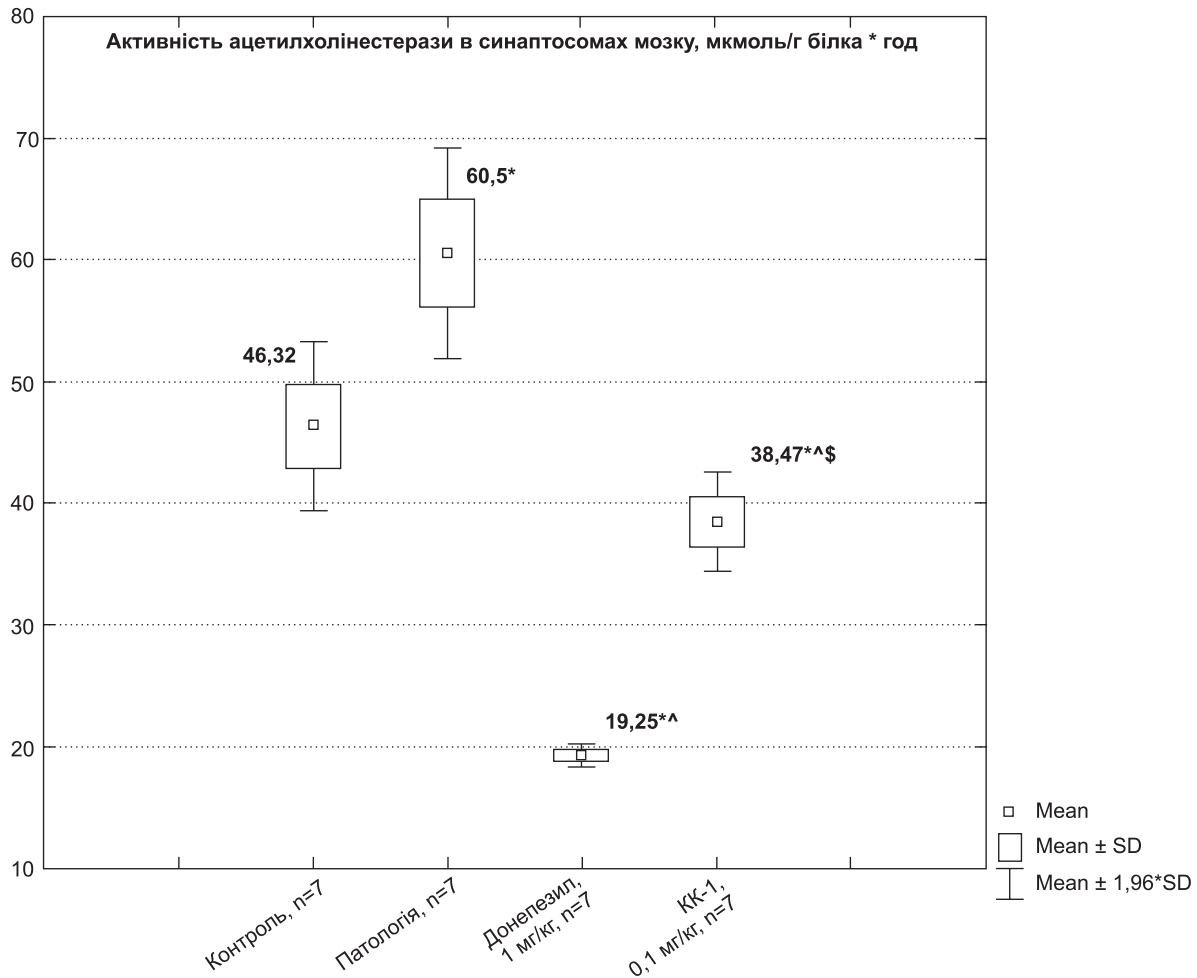


Рис. 6. Вплив фармакологічного препарату КК-1 та препарату порівняння донепезилу на активність ацетилхолінестерази в синапсах мозку щурів із моделлю скополамін-зумовленої хвороби Альцгеймера, n=28. Примітка. Відмінності статистично значущі ($p \leq 0,05$): * – з групою контролю; ^ – з групою патології; \$ – з групою донепезилу

рішньомембранного G-білка M_2 - та M_4 -XP є спорідненими з рецепторами меланокортинів (MCRs), за посередництва яких реалізується гормональна та медіаторна функція АКТГ. В роботах [1, 4] показано, що ділянка АКТГ 15-18 (Lys-Lys-Arg-Arg) є антагоністом молекули цього гормону, яка, зв'язуючись з MCRs, блокує внутрішньоклітинний аденілатциклазний сигнальний каскад. Тому взаємодія пептиду КК-1 із M_2 - або M_4 -XP може відбуватися тільки за принципом їх блокування, а не агонізму чи алостеричної модуляції. Більш імовірно є модуляція G_q/G_{11} -зв'язаних метаболічних мускаринових рецепторів (M_1 , M_3 та M_5). Таке припущення є доречним, тому що деякі нейротрофіни (NGF, BDNF), у складі яких присутня амінокислотна

послідовність КК-1, виявляють фармакологічні властивості через G_q/G_{11} -зв'язані рецептори тирозинкінази (TrkR), що належать до одного підтипу з M_1 -, M_3 -, та M_5 -XP [17]. В такому разі досліджуваний пептид КК-1 імітує роль ендогенних нейротрофінів, модулюючи активність G_q/G_{11} -зв'язаних М-XP, в результаті чого покращуються когнітивні функції тварин зі скополамін-зумовленою моделлю ХА. Ця теза потребує подальшого експериментального обґрунтування, дизайн якого полягав би в уточненні підтипу М-XP та характеру впливу пептиду КК-1 на них.

ВИСНОВКИ

1. Експериментальна модель хвороби Альцгеймера (ХА), зумовленої скополаміном, виявляється у щурів зниженням функціональної активності ЦНС.

2. Фармакологічний препарат acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide (КК-1) за інтраназального введення у дозі 0,1 мг/кг впродовж 10 днів знижує прояви модельної ХА у щурів. Зокрема, він зменшує стрес-зумовлену емоційну лабільність щурів у відкритому полі, стимулює когнітивні функції в тесті екстраполяційного вивільнення та чинить виразну антиамнестичну дію у тесті умовного рефлексу пасивного уникнення.

3. За впливом на функціональні показники ЦНС щурів із моделлю ХА пептид КК-1 перевершує ефект препарату порівняння – інгібітора ацетилхолінестерази центральної дії донепезилу. Ноотропна дія КК-1 за цих умов є тривалою (зберігається впродовж не менше 10 днів).

4. Досліджуваний препарат незначно пригнічує активність ацетилхолінестерази у синаптах головного мозку щурів із моделлю ХА, проте рівень ацетилхоліну на тлі КК-1 зростає

виразніше, ніж при застосуванні донепезилу. Отже, пептид КК-1 має важливі за ХА холінопозитивні властивості, які не обмежуються центральним антихолінестеразним механізмом.

5. Перспективним є подальше клінічне дослідження пептиду КК-1 як нейропротекторного та ноотропного засобу для лікування нейродегенеративних захворювань.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ванина В.И., Ковалицкая Ю.А., Колобов А.А. и др. // *Биоорганическая химия*. – 2006. – Т. 32, №5. – С. 1-8.
2. Дейко Р.Д., Штриголь С.Ю., Прусаков А.Н., Колобов О.О. // *Укр. біофармац. журн.* – 2015. – №1 (36). – С. 14-20.
3. Дейко Р.Д., Штриголь С.Ю., Колобов О.О. *Перспективи створення новітніх нейропротекторних та ноотропних засобів із пептидергічним механізмом дії / Наукова Україна: Проблеми сучасності та перспективи майбутнього: Матеріали II Всеукр. наук.-практ. конф. (м. Харків, 4-5 березня 2016 року)*. – К.: Наукове партнерство «Центр наукових технологій», 2016. – С. 11-20.
4. Ковалицкая Ю.А., Колобов А.А., Кампе-Немм Е.А. и др. // *Биоорганическая химия*. – 2008. – Т. 34, №1. – С. 29-35.
5. Радионова К.С., Бельник А.П., Островская Р.У. // *Бюл. эксперим. биол. и медицины*. – 2008. – Т. 146, №1. – С. 65-68.
6. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. докт. мед. наук А.Н.Миронова*. – Ч. I. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
7. Пат. 2256920 Российская Федерация МПК G 01 N 33/50 Способ определения ацетилхолина / И.Е.Трубицына, В.Н.Дроздов, Л.Б.Лазебник, А.Э.Лычкова. – 2003127761/15. Заявл.: 27.03.2005. Опубл.: 20.07.2005. – Бюл. 20. – 15 с.
8. Bubser M., Byun N., Wood M.R., Jones C.K. // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 208. – P. 121-166.
9. Costa J.L., Bui S., Reed P. et al. // *Gen. Comp. Endocrinol.* – 2004. – Vol. 136. – P. 12-16.
10. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.J., Featherstone R.M. // *Biochemical Pharmacol.* – 1961. – Vol. 7. – P. 88-95.
11. Facchinetti F., Nappi G., Petraglia F. et al. // *Life Sci.* – 1984. – Vol. 36. – P. 1691-1697.
12. Fletcher J.M., Morton C.J., Zwar R.A. et al. // *J. of Biol. Chemistry*. – 2008. – Vol. 283, №48. – P. 33375-33383.
13. Ghiglieri V., Sgobio C., Costa C. et al. // *Prog. Neurobiol.* – 2011. – Vol. 94. – P. 102-114.
14. Giuliani D., Bitto A., Galantucci M. et al. // *Neurobiol. Aging*. – 2014. – Vol. 35. – P. 537-547.
15. Giuliani D., Neri L., Canalini F. et al. // *Molecular and Cellular Neurosci.* – 2015. – Vol. 67. – P. 13-21.
16. Hajos E. // *Brain Res.* – 1975. – Vol. 93, №3. – P. 485-489.
17. Huang E.J., Reichardt L.F. // *Annu. Rev. Biochem.* – 2003. – Vol. 72. – P. 609-642.
18. Ihalaainen J., Sarajärvi T., Rasmusson D. et al. // *Neuropharmacol.* – 2011. – Vol. 61. – P. 891-899.
19. Kracht M., Holtmann H. *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. – Berlin, Heidelberg, New York, 2008. – P. 753.
20. Miller T.P., Fong K., Tinklenberg J.R. // *Biol. Psychiatry*. – 1993. – Vol. 33. – P. 307-309.
21. Patel V., Chisholm D., Dua T. et al. *Mental, Neurological, and Substance Use Disorders: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 4), Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank, 2016. – P. 94.*
22. Scarr E. // *CNS Neurosci. Ther.* – 2012. – Vol. 18. – P. 369-379.
23. Soares J.C., Oliviera M.G., Ferreira T.L. // *Neuropharmacol.* – 2013. – Vol. 73. – P. 320-326.
24. Vardigan J.D., Cannon C.E., Puri V. et al. // *Psychopharmacol. (Berl)*. – 2015. – Vol. 232. – P. 1859-1866.
25. Vogel H. (ed.). *Drug discovery and evaluation: pharmacological assays*. – Springer Science & Business Media, 2007. – P. 839-856.

НООТРОПНИ ВЛАСТИВОСТІ ТЕТРАПЕПТИДУ ACETYL-(D-LYS)-LYS-ARG-ARG-AMIDE (КК-1) НА МОДЕЛІ ХВОРОБИ АЛЬЦГЕЙМЕРА У ЩУРІВ, ЗУМОВЛЕНОЇ ХРОНІЧНИМ ВВЕДЕННЯМ СКОПОЛАМІНУ**Р.Д.Дейко, С.Ю.Штриголь, Т.В.Горбач*, О.О.Колобов**, А.С.Симбірцев******Національний фармацевтичний університет, Харківський національний медичний університет*, ФДУП «Державний науково-дослідний інститут особливо чистих біопрепаратів» ФМБА Росії, Санкт-Петербург****

Ключові слова: хвороба Альцгеймера; нейропротекція; меланокортини; тетрапептиди; експеримент

Удосконалення терапії хвороби Альцгеймера (ХА) – одне з найактуальніших завдань сучасної медицини та фармації. Перспективним є створення та фармакологічне вивчення оригінальних лікарських засобів для її терапії. Перспективним класом таких засобів є нейропротектори. У НДІ Особливо чистих біопрепаратів створено тетрапептид acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide (лабораторний шифр КК-1). В експерименті на моделі церебральної ішемії КК-1 виявляє потужні нейропротекторні та ноотропні властивості. Мета дослідження – дослідити ноотропні властивості КК-1 на моделі ХА. У щурів моделювали скополамін-зумовлену ХА. Протягом 10 днів їх лікували пептидом КК-1 (0,1 мг/кг інтраназально, 1 раз на день) або препаратом порівняння (донепезил, 1 мг/кг внутрішньошлунково, 1 раз на день). Після терапії оцінювали функціональний стан ЦНС щурів за тестами відкритого поля (ВП), екстраполяційного вивільнення (ЕВ) та умовного рефлексу пасивного уникнення (УРПУ). У гомогенаті цілого головного мозку (ГМ) та синапсосомах ГМ спектрофотометрично визначали рівень ацетилхоліну (АХ) та активність ацетилхолінестерази (АХЕ). Досліджуваний фармакологічний препарат КК-1 зменшує стрес-зумовлену тривожну поведінку щурів із модельною ХА за тестом ВП, підвищуючи їх орієнтовно-дослідницьку активність (у 1,4 рази, $p < 0,05$) та зменшуючи емоційні реакції (на 44%, $p < 0,05$). В тесті ЕВ пептид КК-1 покращує когнітивні функції щурів, зменшуючи час пірнання під край циліндра у 4,7 рази ($p < 0,05$). За тестом УРПУ встановлено високу антиамнестичну активність досліджуваного препарату (56,5% та 81,5% на 1 та 10 день після терапії відповідно). За усіма показниками КК-1 перевершує активність донепезилу. Механізм ноотропної дії КК-1 на моделі ХА полягає у підвищенні рівня АХ в синапсосомах М-холінергічних рецепторів, імовірно, шляхом стимуляції його синтезу. КК-1 помірно пригнічує АХЕ, чим додатково сприяє накопиченню АХ в синаптичній щільній холінергічного синапсу. Можливою є також взаємодія тетрапептиду КК-1 із G_q/G_{11} -зв'язаними M_1 -, M_3 -, та M_5 -холінергічними рецепторами за принципом позитивної алостеричної модуляції.

НООТРОПНЫЕ СВОЙСТВА ТЕТРАПЕПТИДА ACETYL-(D-LYS)-LYS-ARG-ARG-AMIDE (КК-1) НА МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА У КРЫС, ОБУСЛОВЛЕННОЙ ХРОНИЧЕСКИМ ВВЕДЕНИЕМ СКОПОЛАМИНА**Р.Д.Дейко, С.Ю.Штриголь, Т.В.Горбач*, А.А.Колобов**, А.С.Симбірцев******Национальный фармацевтический университет, Харьковский национальный медицинский университет*, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург****

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера; нейропротекция; меланокортины; тетрапептид; эксперимент

Усовершенствование терапии болезни Альцгеймера (БА) – одно из наиболее актуальных заданий современной медицины и фармации. Перспективно создание и фармакологическое исследование оригинальных лекарственных средств для ее терапии. Перспективным классом таких средств являются нейропротекторы. В НИИ Особо чистых биопрепаратов создан пептид acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide (лабораторный шифр КК-1). В эксперименте на модели церебральной ишемии КК-1 демонстрирует выраженные нейропротекторные и ноотропные свойства. Цель исследования – изучить ноотропные свойства КК-1 на модели БА. У крыс моделировали скополамин-обусловленную БА. На протяжении 10 дней осуществляли терапию фармакологическим препаратом КК-1 (0,1 мг/кг интраназально 1 раз в день) или препаратом сравнения (донепезил, 1 мг/кг внутривентрикулярно 1 раз в день). После терапии оценивали функциональное состояние животных по тестам открытого поля (ОП), экстраполяционного избавления (ЭИ) и условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ). В гомогенате целого головного мозга (ГМ) и синапсосомах ГМ спектрофотометрически определяли уровень ацетилхолина (АХ) и активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ). Исследуемый препарат КК-1 уменьшает стресс-обусловленную тревожность крыс с моделью БА в тесте ОП, повышая их ориентировочно-исследовательскую активность (в 1,4 раза, $p < 0,05$) и уменьшая уровень эмоциональных реакций (на 44%, $p < 0,05$). В тесте ЭИ тетрапептид КК-1 повышает когнитивные функции крыс, уменьшая время подныривания под край цилиндра в 4,7 раза ($p < 0,05$ с группой патологии). По тесту УРПИ установлена высокая антиамнестическая активность КК-1 (56,5% и 81,5% на первые и десятые сутки соответственно). По всем показателям КК-1 превышает активность препарата сравнения донепезила. Механизм ноотропного действия КК-1 на модели БА заключается в повышении уровня АХ в синапсосомах ГМ, вероятно, за счет стимуляции его синтеза. КК-1 умеренно угнетает АХЭ, чем дополнительно способствует накоплению АХ в синаптической щели холинергического синапса. Вероятно также взаимодействие пептида КК-1 с G_q/G_{11} -связанным M_1 -, M_3 -, и M_5 -холинергическими рецепторами по принципу позитивной алостерической модуляции.

Адреса для листування:

61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

E-mail: roman.deyko@gmail.com.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 22.11.2016 р.