

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК [612.821.2+615.212]:547.466

ПОНТЕЛЕЕВА
Ирина Васильевна

**МНЕМОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ
ПРОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ДИ- И ТРИПЕПТИДОВ
В УСЛОВИЯХ АССОЦИАТИВНОГО ОБУЧЕНИЯ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Минск 2014

Работа выполнена в государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»

Научный руководитель: **Кравченко Елена Валериевна**, кандидат биологических наук, ведущий фармаколог государственного предприятия «Академфарм»

Официальные оппоненты: **Бизунок Наталья Анатольевна**, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой фармакологии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Канунникова Нина Павловна, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры технологии, физиологии и гигиены питания учреждения образования «Гродненский государственный университет имени Я. Купалы»

Оппонирующая организация: учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Защита состоится 15 января 2015 г. в 13:00 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.10 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, e-mail: uchsovet@bsmu.by, тел. 8(017)2725598.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан «12» декабря 2014 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций, доктор мед. наук



А.П. Шепелькевич

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия особую значимость приобретает поиск путей фармакологической коррекции мнестико-интеллектуальных расстройств. Нарушения когнитивных функций являются полиэтиологическими состояниями, которые развиваются при различных психических, неврологических и соматических заболеваниях [Захаров В.В., Яхно Н.Н., 2005]. Распространенными причинами мнестических нарушений являются патологическая тревожность [Башкатова В.Г., 2008], психосоциальный стресс [Kuhlmann S. et al., 2005], посттравматические стрессовые расстройства [Siegmund A., Wotjak C.T., 2006; Millan M.J. et al., 2012], обсессивно-компульсивные расстройства [Millan M.J. et al., 2012], нейродегенеративные заболевания [Цаплина А.П., 2009], эпилепсии [Бурчинский С.Г., 2012], цереброваскулярные, инфекционные и воспалительные заболевания, травмы [Яхно Н.Н., 2007], нарушения восприятия и обработки сенсорной информации [Садовская Ю.Е., 2011].

Ноотропные средства, улучшающие память, внимание, ориентировку, активирующие высшие интегративные функции мозга [Яхно Н.Н. и др., 2009], с уверенностью могут быть отнесены к группе жизненно важных препаратов [Косарев В.А., Бабанов С.А., 2010]. Однако применяемые в настоящее время в клинической практике ноотропы недостаточно эффективны и преимущественно воздействуют только на когнитивный компонент болезни, не влияя на другие составляющие психических, неврологических и соматических заболеваний.

Внимание ученых сосредоточено на поиске новых соединений ди- и трипептидной природы, в том числе на основе биологически активных коротких фрагментов нейропептидов [Островская Р.У. и др., 2002; Гудашева Т.А., 2011]. Активность в отношении множественных мишеней воздействия, а также способность проникать через биологические барьеры и сравнительно высокая энзиматическая стабильность обуславливают перспективность создания на их основе мультитаргетных пероральных лекарственных средств. Рациональным подходом к поиску средств фармакотерапии мнестических нарушений является изучение пролинсодержащих активных фрагментов пептидов-регуляторов центральной нервной системы (ЦНС) из группы гипофизарных гормонов.

В связи с вышеизложенным, актуальна разработка мнемотропных лекарственных средств на основе пролинсодержащих ди- и трипептидов, при этом особенно перспективны лекарства, совмещающие достоинства противотревожных и ноотропных средств.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами, темами. Диссертация выполнена в рамках заданий «Психофармакологическое исследование пролинсодержащих олигопептидов» ГППНИ «Фармтехнологии» (№ ГР 20110658,

2011 г.), «Разработка фармацевтических композиций на основе олигопептидов с нейротропным действием и их доклиническое изучение» ГПНИ «Медицина и фармация» (подпрограмма «Фармакология и фармация», № ГР 20121291, 2012–2013 гг.) и «Разработать лекарственное средство для лечения синдрома дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) на основе нейротропного пептида и освоить его производство в ГП «Академфарм» ИФБ НАН Беларуси» ГНТП «Фармацевтические субстанции и лекарственные средства» (подпрограмма «Аминокислоты», № ГР 20114863, 2011–2015 гг.).

Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям 2.7. «Новые лекарственные средства и биокорректоры различных заболеваний, фармацевтические субстанции, современные диагностические тест-системы, технологии их производства, оценки качества и безопасности» и 4.1. «Самоорганизация живых систем, закономерности течения патологических процессов, коррекция жизненно важных функций» перечня фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011–2015 гг., утвержденного Постановлением Совета Министров Республики Беларусь № 585 от 19.04.2010 г., а также входит в структуру приоритетных направлений научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2011–2015 гг. (23. Макротехнология «лекарственные, лечебно-диагностические препараты и тест-системы»), утвержденных Указом Президента Республики Беларусь № 378 от 22.07.2010 г.

Цель и задачи исследования. *Цель* исследования – экспериментальное обоснование перспективности использования новых пролинсодержащих ди- и трипептидов в качестве ноотропных средств.

Достижение поставленной цели потребовало решения следующих *задач*:

1. Изучить зависимость структура-действие и провести отбор перспективных соединений с ноотропной активностью в ряду пролинсодержащих ди- и трипептидов (пролил-лейцин, лизил-пролина гидрохлорид, лейцил-пролина гидрохлорид, пролил-лейцил-глицина амид, изолейцил-пролил-изолейцин) в тесте условного рефлекса пассивного избегания в экспериментах на аутбредных крысах Wistar.

2. Проанализировать влияние дипептида пролил-лейцин, проявившего высокую ноотропную активность, на различные фазы процессинга памяти в опытах на аутбредных крысах Wistar в тесте условного рефлекса пассивного избегания.

3. Изучить нейрокорректорную эффективность дипептида пролил-лейцин у инбредных мышей BALB/c с врожденной патологией когнитивных функций по тесту обучения навыку доставания корма с использованием тонких манипуляторных движений.

4. Определить спектр нейротропных эффектов наиболее активных пролинсодержащих пептидов с использованием различных нейрофармакологических моделей и оценить перспективность их применения.

Объекты исследования – пролинсодержащие дипептиды (пролил-лейцин (Pro–Leu, ИФБ-30), лизил-пролина гидрохлорид (Lys–Pro, ИФБ-31), лейцил-пролина гидрохлорид (Leu–Pro), N-фенилацетил-L-пролил-глицина этиловый эфир (ноопепт)) и трипептиды (пролил-лейцил-глицина амид (Pro–Leu–Gly), изолейцил-пролил-изолейцин (Ile–Pro–Ile)). Препараты сравнения: церебролизин, пир-ацетам (ноотропил), персен-форте. Мыши-самцы инбредные BALB/c (всего – 151) и аутбредные ICR (всего – 121); крысы-самцы аутбредные Wistar (всего – 741).

Предмет исследования – ноотропная активность пролинсодержащих ди- и трипептидов в отношении процессов ассоциативного обучения, спектр нейрофармакологической активности и побочное нейротропное действие пролинсодержащих дипептидов (Pro–Leu, ноопепт) и трипептида Pro–Leu–Gly.

Положения, выносимые на защиту:

1. Впервые показано, что пролинсодержащие дипептиды пролил-лейцин, лизил-пролина гидрохлорид, лейцил-пролина гидрохлорид обладают высокой ноотропной активностью, проявляющейся облегчением выработки условного рефлекса пассивного избегания в условиях внутрибрюшинного введения животным в дозах от 0,01 до 0,5 мг/кг. Пролинсодержащий трипептид пролил-лейцил-глицина амид в отличие от указанных дипептидов обладает амнестическим эффектом в интервале доз 0,01–0,1 мг/кг.

2. Дипептид пролил-лейцин при внутрижелудочном введении облегчает все фазы процессинга памяти, включая ввод и первичную обработку информации, консолидацию и извлечение памятного следа в тесте условного рефлекса пассивного избегания. У инбредных мышей BALB/c с врожденными нарушениями когнитивных функций пролил-лейцин (внутрибрюшинно) оказывает нейрокорректорное действие по тесту обучения инструментальному навыку доставания корма с использованием тонких манипуляторных движений.

3. Проліл-лейцин сочетает ноотропные свойства с выраженной анксиолитической активностью, что отличает его от классических ноотропных средств и является основанием для его использования в качестве бифункционального психотропного агента при когнитивных расстройствах с невротической компонентой.

4. При расширенном психофармакологическом тестировании пролил-лейцина не обнаружено его существенного влияния на психомоторную активность животных, миорелаксантных, противосудорожных и антигипоксических свойств, что свидетельствует о селективном психотропном действии пролил-лейцина в отношении психоэмоциональной сферы.

Личный вклад соискателя. Тема работы предложена научным руководителем к.б.н. Е.В. Кравченко. Этапы работы спланированы с участием соискателя. Автором самостоятельно выполнена экспериментальная часть работы, проведен научный анализ полученных данных и статистическая обработка, их

интерпретация, сформулированы выводы, рекомендации по практическому использованию.

Основные научные результаты, представленные в диссертации, получены автором лично и изложены в статьях и материалах конференций [1–15]; личный вклад диссертанта в подготовку публикаций составляет 85–95 %. Результаты исследований ноотропных свойств Pro–Leu, Lys–Pro, Leu–Pro, а также способности Pro–Leu–Gly вызывать амнезию у животных на модели «дефицита обученности» опубликованы в статьях [2–7] – вклад диссертанта 90 %. Особенности влияния Pro–Leu на фазы процессинга памяти и в отношении генетически обусловленных нарушений процессов ассоциативного обучения у инбредных животных отражены в статье [9] и материалах конференций [11] – вклад 85 %. Анксиолитическое действие Pro–Leu описано в статье [8] и материалах конференций [12, 13] – вклад 95 %. Результаты определения спектра нейротропных эффектов наиболее активных из изученных пролинсодержащих пептидов изложены в статье [1] и материалах конференций [10, 14, 15] – вклад соискателя 90 %. Разработанные фармацевтические композиции с ноотропной и мнемотропной активностью защищены двумя патентами на изобретения [16–17]. Получено также уведомление о положительном результате предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента на изобретение «Дипептид и фармацевтическая композиция с мнемотропной активностью».

Апробация результатов диссертации. Результаты исследований, включенные в диссертацию, представлены на Международной научной конференции «Молекулярная и биохимическая фармакология» (Гродно, 2008); Международной научно-практической конференции «Экспериментальная и клиническая фармакология» (Гродно, 2011); Международной конференции «Актуальные вопросы диагностики, терапии и реабилитации психических и поведенческих расстройств» (Гродно, 2012); IV Международной научной конференции «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, 2012); Международной научно-практической конференции «Белорусские лекарства» (Минск, 2012).

Опубликованность результатов диссертации. По материалам диссертации опубликовано 9 статей, соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (4,56 авторских листа), 6 тезисов в материалах научных конференций, 2 патента на изобретение. Общий объем всех опубликованных материалов по теме диссертации составляет 6,22 авторских листа.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, 6 глав, заключения, библиографического списка (304 наименования, включая 134 источника на русском, 153 источника на иностранном языках и 17 публикаций соискателя). Работа изложена на 155 страницах, содержит 15 таблиц, 10 рисунков, 4 приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 обобщены литературные данные об эпидемиологических, клинических и этиологических аспектах когнитивных расстройств, их связи с патологическими состояниями ЦНС, а также о подходах к фармакологической коррекции. Охарактеризованы вещества пептидной природы, являющиеся регуляторами когнитивных функций. Проанализированы нейрохимические механизмы и методологические аспекты изучения процессов ассоциативного обучения. Обозначены нерешенные вопросы. Обоснована перспективность разработки мнемотропных средств на основе пролинсодержащих ди- и трипептидов.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на инбредных (BALB/c) и аутбредных (ICR) мышах, а также на аутбредных (Wistar) крысах, поставляемых лабораторией биомоделей Института биоорганической химии НАН Беларуси. В работе использовали: *дипептиды* Pro-Leu (Sigma, США) в дозах 0,01; 0,1; 0,5 мг/кг, внутривенно (в/в); Pro-Leu (синтезирован д.х.н., проф. Куваевой З.И., д.х.н. Книжниковым В.А., Поповой Л.А., государственное научное учреждение «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси») – 0,5 мг/кг, в/в или 0,1; 0,5; 1; 10 мг/кг, внутривенно (в/в); Lys-Pro (Sigma, США) – 0,01; 0,1; 0,5 мг/кг, в/в; Leu-Pro (Sigma, США) – 0,01; 0,1; 0,5 мг/кг, в/в; ноопепт (N-фенилацетил-L-пролилглицина этиловый эфир; предоставлен Институтом фармакологии им. В.В. Закусова Российской академии медицинских наук, синтезирован Т.А. Гудашевой, изучен Р.У. Островской и др., 2002) – 0,1; 0,5 мг/кг, в/в; *трипептиды* Pro-Leu-Gly (Sigma, США) – 0,01; 0,1; 0,5 мг/кг, в/в; Ile-Pro-Ile (Sigma, США) – 0,01; 0,1; 0,5 мг/кг, в/в; *лекарственные средства*: церебролизин (с содержанием 215,2 мг концентрата церебролизина в 1 мл водного раствора, ЭБЕВЕ Нейро Фарма ГмбХ, Австрия) – 430,4 мг/кг, в/в; пирацетам (ноотропил; с содержанием 200 мг пирацетама в 1 мл водного раствора, ЮСБ С.А. ФАРМА СЕКТОР, Бельгия) – 250 мг/кг, в/в; персен-форте (активные компоненты – сухие экстракты корневищ с корнями валерианы, листьев мелиссы лекарственной, листьев мяты перечной, Lek, Словения) – 30; 70 мг/кг, в/в; вальпроевая кислота (ВК) (конвулекс; Gerot Pharmazeutika GmbH, Австрия) – 100; 150; 200; 250; 300 мг/кг, в/в; *фармакологические анализаторы*: тофизопам – лиганд бензодиазепинового участка связывания ГАМК_A-бензодиазепин-ионофор-рецепторного комплекса (Sigma, США) – 1 мг/кг, в/в; хемоконвульсант пентилентетразол (ПТЗ) – блокатор ионофора ГАМК_A-рецептора (Sigma, США) – 55; 60; 70; 74; 80 мг/кг, подкожно (п/к); растворитель – вода дистиллированная, в/в или в/ж.

Методы тестирования когнитивных способностей (ассоциативное обучение). Тест условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) (вариант *step-through*) является базисной моделью для оценки ноотропной активности [Воро-

нина Т.А., Островская Р.У., 2012]. Выработку и воспроизведение УРПИ (через 24 ч) проводили с помощью установки «PACS-30» (Columbus Instruments, США) по стандартной методике с использованием режима, позволяющего моделировать «дефицит обученности» (*undertraining*, 0,5 мА, 2 с, 50 Гц). Образцы применяли 1-кратно (перед выработкой УРПИ) или 2-кратно (накануне выработки и воспроизведения УРПИ). Критериями оценки обученности животных являлись латентный период (ЛП) перехода животного в темный отсек (ЛП_{перех}), время пребывания в светлом отсеке (Т_{св}), доля животных в группе, обучившихся пассивному избеганию темного отсека (Д), и мнестическая активность (М_а), определяемая по формуле [Ostrovskaya R.U. et al., 1993]:

$$M_a = \frac{ЛП_{оп} - ЛП_{к}}{180 - ЛП_{к}} \times 100 \%,$$

где М_а – мнестическая активность соединения, оцененная с учетом ЛП_{перех} и отражающая облегчение обучения, %; ЛП_{оп} – среднее ЛП_{перех} животных основной группы, с; ЛП_к – то же для контрольной группы, с; 180 – максимально возможный ЛП_{перех}, с.

Оценка влияния на различные фазы процессинга памяти в тесте УРПИ. Для получения данных о влиянии на процесс ввода и первоначальной обработки информации тестируемый образец вводили перед процедурой обучения, на процесс консолидации – непосредственно после таковой, на процесс извлечения информации – перед воспроизведением условного рефлекса [Воронина Т.А., Островская Р.У., 2012]. *Методика обучения навыку доставания корма (НДК) с использованием тонких манипуляторных движений.* Выработка НДК у грызунов с помощью тонких манипуляторных движений (тест Skilled Reaching) относится к категории инструментальных условных рефлексов. Использовали мышей BALB/c с сонаправленными поведенческими (когнитивные дисфункции [А.П. Бельник, 2007; Д.Р. Зиновьев, 2009], повышенный уровень базовой тревожности [С. Belzung, 2000]) и нейротрансмиттерными нарушениями (низкий уровень ацетилхолина в гиппокампе [А.П. Бельник, 2007], сниженная бензодиазепиновая рецепция, сниженный уровень мозгового нейротрофического фактора в условиях стрессового воздействия [С.Б. Середенин, 2006, 2007]). Животных обучали НДК через отверстие из бункера (Lafayette, США). В течение 4 дней проводили групповые тренировочные сеансы с последующим 4-кратным тестированием способности к воспроизведению НДК с интервалом 2–5 сут. Критериями, применяемыми при оценке динамики приобретения НДК, являлись: результативность (отношение числа успешно изъятых из бункера и помещенных в рот зерен к общему числу предъявленных зерен – К_р) и эффективность выполнения НДК (отношение числа результативных движений к общему числу движений (результативных и нерезультативных) верхней конечностью в бункер – К_{эф}) [Макаренко А.Н. и др., 2005].

Методы нейрофармакологического исследования. Для оценки уровня тревожности (УТ) крыс Wistar использовали *методику конфликтной ситуации по Vogel* [Vogel J.R. et al., 1971]. У животных вырабатывали навык взятия воды из поилки анксиометра (Columbus Instruments, США), затем осуществляли депривацию воды (48 ч) и последующее тестирование (10 мин), при этом каждое 20-е взятие воды из поилки сопровождалось электроболевым раздражением (0,35 мА). Регистрировали число наказуемых взятий воды [Воронина Т.А. и др., 2012]. Оценку УТ мышей BALB/c осуществляли с помощью *методики предпочтения места*: в течение 5 мин проводили регистрацию перемещений животного в установке «ОРТО-МАХ» (Columbus Instrument, США) и определяли длительность пребывания животных суммарно в боковых (А+F), «промежуточных» (В+Е) и центральных (С+D) зонах установки. Наличие седативного или активирующего действия оценивали с помощью показателей общей активности ($A_{\text{общ}}$) и пройденной дистанции ($D_{\text{пройд}}$). Кроме того, УТ крыс Wistar изучали с использованием *методики оценки поведения в темной/светлой камере*, основанной на стремлении грызунов избегать ярко освещенных мест. На модели *нормобарической гипоксии с гиперкапнией* [Воронина Т.А. и др., 2012] у мышей ICR оценивали противогипоксическую активность образцов. Противосудорожную активность изучали в *тесте максимального электрошока (МЭШ)* [Castel-Branco M.M. et al., 2009] с помощью установки «ECT Unit 57800» (Ugo Basile, Италия): крысам Wistar применяли электростимуляцию через пиннеальные электроды (60 Гц, 60 мА, 200 импульсов/с, продолжительность импульса – 0,9 мс, продолжительность шока – 0,8 с); оценивали число животных с тонической экстензией задних конечностей и продолжительность судорог. Исследование влияния ноопепта на *противосудорожные эффекты вальпроевой кислоты* осуществляли на модели судорог, вызванных введением ПТЗ в среднесмертельной дозе (LD_{50} ; 74 мг/кг, п/к) мышам ICR. Оценивали ЛП судорожных припадков со степенью тяжести 4–6 баллов ($ЛП_{\text{СП}}$), долю животных в группе, защищенных от судорожных припадков со степенью тяжести 5 и 6 баллов ($D_{\text{защ}}$), общее число судорожных припадков со степенью тяжести 3 и выше балла и смертность [Крыжановский Г.Н. и др., 1991]. Возможное *миорелаксантное действие* изучали в экспериментах на мышях BALB/c в тестах бокового положения, подтягивания на перекладине, удерживания на перевернутой сетчатой платформе, а также вращающегося стержня с помощью установки «Rota-Rod for mice» (Ugo Basile, Италия) по стандартным методикам [Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., 2005; Михайлова Л.М. и др., 2005]. Оценку выраженности синдрома отмены осуществляли с помощью *метода акустической стартл-реакции (АСР)* [Майский А.И., Салимов Р.М., 2005] в установке «Responder-X» (Columbus Instruments, США) в опытах на крысах Wistar.

Статистическую обработку данных проводили с применением программного обеспечения Excel 2010, Origin 6.1, Statistica 6.0, Biostat 4.03, StatPlus 2007, Corel-DRAW 12. Использовали методы непараметрической статистики (критерии Манна–Уитни, Уилкоксона, Краскела–Уоллиса, ранговый дисперсионный анализ Фридмана с последующей обработкой данных методом апостериорных сравнений по критериям Даннета или Данна). В случае нормального распределения данных в вариационных рядах, определяемого с помощью теста Шапиро–Уилка, использовали дисперсионный анализ ANOVA (однофакторный или для повторных измерений). Дисперсионный анализ ANOVA однофакторный применяли при наличии нескольких групп с последующей обработкой данных методом апостериорных сравнений по критерию наименьшей значимой разницы Фишера (НЗР Фишера). Анализ качественных признаков проводили с помощью критерия χ^2 и точного критерия Фишера. ЛД₅₀, дозу вещества, предотвращающую у 50 % животных развитие судорог со степенью тяжести 4 балла и выше (ЭД₅₀) и их доверительные интервалы вычисляли методом наименьших квадратов с использованием пробит-анализа (Litchfield–Wilcoxon). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. Данные представляли в виде $X \pm S_x$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование активности пролинсодержащих ди- и трипептидов в тесте УРПИ. Влияние пролинсодержащих ди- и трипептидов на мнестические функции крыс *Wistar* в условиях однократного введения. На этапе скрининга в тесте УРПИ с низким уровнем подкрепления введение пролинсодержащих дипептидов Pro–Leu, Lys–Pro и Leu–Pro (в/б, 1-кратно) способствовало облегчению выработки условнорефлекторного навыка. У половозрелых крыс применение Pro–Leu (0,5 мг/кг), Lys–Pro (0,01; 0,1; 0,5 мг/кг) сопровождалось статистически значимым повышением значений $T_{св}$, а Leu–Pro (0,01; 0,1; 0,5 мг/кг) – ЛП_{перех} и $T_{св}$ относительно исходного уровня ($P < 0,05$), тогда как в контроле соответствующие изменения отсутствовали (таблица 1).

У неполовозрелых крыс применение Pro–Leu (0,1; 0,5 мг/кг) вело к статистически значимому увеличению $T_{св}$, а Pro–Leu (0,5 мг/кг) – ЛП_{перех} и D относительно таковых в контроле, а также ЛП_{перех} по сравнению с исходным уровнем ($P < 0,05$, таблица 1). Введение Lys–Pro (0,1 мг/кг) и Leu–Pro (0,01, 0,1; 0,5 мг/кг) существенно увеличивало ЛП_{перех} и $T_{св}$ относительно исходного уровня ($P < 0,05$); при введении растворителя соответствующие различия не выявлены (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние пролинсодержащих ди- и трипептидов на мнестические функции крыс Wistar в тесте УРПИ в условиях однократного в/б введения

Образец, доза (мг/кг)	n	Этап	ЛП _{перех} , с	T _{св} , с	M _a , %	D, %
<i>Половозрелые животные</i>						
Растворитель	10	I	41,9±13,0	41,9±13,0	–	10,0 (1/10)
		II	35,7±16,5	87,8±19,9		
Pro-Leu, 0,5	11	I	33,7±8,4	33,7±8,4	31,5	36,4 (4/11)
		II	81,2±24,1	105,5±21,7 °		
Растворитель	9	I	34,9±7,5	34,9±7,5	–	33,3 (3/9)
		II	73,7±26,7	99,8±24,1		
Lys-Pro, 0,01	9	I	28,1±5,1	28,1±5,1	50,7	66,7 (6/9)
		II	127,6±26,3	133,2±23,5 °		
Lys-Pro, 0,1	9	I	17,2±4,8	17,2±4,8	6,5	33,3 (3/9)
		II	80,6±25,6	91,9±22,6 °		
Lys-Pro, 0,5	9	I	26,0±4,5	26,0±4,5	23,1	44,4 (4/9)
		II	98,3±26,6	117,2±21,7 °		
Растворитель	9	I	53,8±15,3	53,8±15,3	–	33,3 (3/9)
		II	95,7±24,7	101,8±24,7		
Leu-Pro, 0,01	10	I	40,7±8,4	40,7±8,4	30,4	50,0 (5/10)
		II	121,3±22,7 °	125,9±22,3 °		
Leu-Pro, 0,1	9	I	49,8±16,0	49,8±16,0	13,3	44,4 (4/9)
		II	106,9±25,8 °	114,8±23,1 °		
Leu-Pro, 0,5	9	I	42,6±8,7	42,6±8,7	41,2	44,4 (4/9)
		II	130,4±20,5 °	132,0±20,9 °		
<i>Неполовозрелые животные</i>						
Растворитель	23	I	41,2±8,0	41,2±8,0	–	17,4 (4/23)
		II	60,3±13,1	81,3±12,8 °		
Pro-Leu, 0,1	8	I	48,0±8,9	48,0±8,9	45,2	50,0 (4/8)
		II	114,4±24,9	140,4±19,9 ° *		
Pro-Leu, 0,5	23	I	37,8±6,6	37,8±6,6	44,3	52,2 ^φ (12/23)
		II	113,3±15,5 ° *	125,3±13,8 ° *		
Растворитель	13	I	35,4±6,8	35,4±6,8	–	23,1 (3/13)
		II	61,2±18,9	79,2±16,8		
Lys-Pro, 0,1	8	I	45,3±18,3	45,3±18,3	35,9	50,0 (4/8)
		II	103,8±29,0 °	115,8±26,4 °		
Lys-Pro, 0,5	5	I	77,6±9,2	77,6±9,2	52,2	60,0 (3/5)
		II	123,2±35,6	156,0±22,1		
Растворитель	8	I	49,1±9,1	49,1±9,1	–	37,5 (3/8)
		II	84,8±28,0	101,4±27,9		
Leu-Pro, 0,01	8	I	21,9±5,0	21,9±5,0	55,2	75,0 (6/8)
		II	137,3±28,0 °	163,6±13,4 °		
Leu-Pro, 0,1	8	I	24,5±5,3	24,5±5,3	9,1	37,5 (3/8)
		II	93,5±25,5 °	118,4±23,3 °		
Leu-Pro, 0,5	8	I	31,9±9,1	31,9±9,1	58,0	75,0 (6/8)
		II	140,0±26,2 °	141,6±25,3 °		

Примечание – Различия статистически значимы по сравнению: ° – с исходным уровнем, $P<0,05$, критерий Уилкоксона; * – с контролем, $P<0,05$, критерий НЗР Фишера; ^φ – то же, $P<0,05$, критерий χ^2 ; I – обучение, II – воспроизведение УРПИ спустя 24 ч; здесь и далее: n – число животных в группе

Влияние пролинсодержащих ди- и трипептидов на мнестические функции половозрелых крыс Wistar в условиях повторного (двукратного) введения. Соединения со стимульными свойствами способны вызывать «обучение, зависящее от состояния», когда повторное введение является обязательным условием воспроизведения навыка [Трофимов С.С. и др., 2000]. Учитывая влияние пролинсодержащих ди- и трипептидов (в т. ч. Pro-Leu и Pro-Leu-Gly) на эмоциональную реактивность и/или ноцицептивную систему организма, изучали влияние образцов на мнестические функции крыс в условиях 2-кратного введения (за 60 мин до помещения крысы в экспериментальную установку при выработке и при воспроизведении УРПИ через 24 ч). Воспроизводили УРПИ спустя 24 ч (на фоне введения образцов) и 7 сут после выработки навыка (на фоне отмены образцов) (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние пролинсодержащих ди- и трипептидов на мнестические функции половозрелых крыс Wistar в тесте УРПИ в условиях двукратного в/б введения

Образец, доза (мг/кг)	n	Этап	ЛП _{перех} , с	T _{св} , с	M _a , %	Д, %
1	2	3	4	5	6	7
Растворитель	14	I	40,3±12,3	40,3±12,3	–	–
		IIa	106,1±21,7	134,2±15,2 [×]		50,0 (7/14)
		IIб	91,0±21,5	111,2±17,8 [×]		35,7 (5/14)
Pro-Leu, 0,01	15	I	34,9±10,5	34,9±10,5	–	–
		IIa	128,4±19,6 [×]	148,9±14,8 [×]	30,2	66,7 (10/15)
		IIб	87,0±18,5	114,1±15,4 [×]	-4,5	26,7 (4/15)
Pro-Leu, 0,1	23	I	61,6±11,2	61,6±11,2	–	–
		IIa	136,6±13,7 [×]	151,7±10,4 [×]	41,3	65,2 (15/23)
		IIб	125,4±15,5 [×]	139,4±12,2 [×]	38,7	60,9 (14/23)
Pro-Leu, 0,5	15	I	27,3±4,8	27,3±4,8	–	–
		IIa	131,4±18,4 [×]	152,3±11,4 [×]	34,2	66,7 (10/15)
		IIб	125,9±20,5 [×]	128,7±19,4 [×]	39,2	66,7 (10/15)
Pro-Leu-Gly, 0,01	14	I	32,1±9,1	32,1±9,1	–	–
		IIa	63,3±17,8	100,7±17,7	-57,9	21,4 (3/14)
		IIб	62,7±18,6	80,3±17,8	-31,8	21,4 (3/14)
Pro-Leu-Gly, 0,1	14	I	33,9±7,3	33,9±7,3	–	–
		IIa	92,9±21,3	106,9±20,0	-17,9	42,9 (6/14)
		IIб	57,8±18,3	75,9±17,9	-37,3	21,4 (3/14)
Pro-Leu-Gly, 0,5	15	I	45,4±13,3	45,4±13,3	–	–
		IIa	119,3±20,5 [×]	135,1±16,2 [×]	17,9	60,0 (9/15)
		IIб	94,1±20,6	103,1±18,8	3,5	40,0 (6/15)
Растворитель	8	I	34,6±10,5	34,6±10,5	–	–
		IIa	105,6±29,0	109,9±27,2	–	50,0 (4/8)
		IIб	80,9±27,0	91,8±24,6	–	25,0 (2/8)
Lys-Pro, 0,01	15	I	37,9±10,1	37,9±10,1	–	–
		IIa	158,2±14,9 [×]	158,2±14,9 [×]	70,7	86,7 (13/15)
		IIб	109,1±20,6 [×]	125,8±16,3 [×]	28,5	53,3 (8/15)
Lys-Pro, 0,1	8	I	32,9±9,0	32,9±9,0	–	–
		IIa	162,6±17,4 [×]	162,6±17,4 [×]	76,6	87,5 (7/8)
		IIб	72,6±27,2	77,6±25,9	-8,4	25,0 (2/8)

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7
Ноопепт, 0,5	8	I	27,1±6,0	27,1±6,0	–	–
		Па	118,0±30,3	119,1±29,7	16,7	62,5 (5/8)
		Пб	121,5±28,8 [×]	126,9±25,9 [×]	41,0	62,5 (5/8)
Пирацетам (ноотропил), 250	8	I	38,5±19,9	38,5±19,9	–	–
		Па	152,1±21,9 [×]	152,1±21,9 [×]	62,5	75,0 (6/8)
		Пб	98,0±31,1 [×]	104,8±28,7 [×]	17,3	50,0 (4/8)

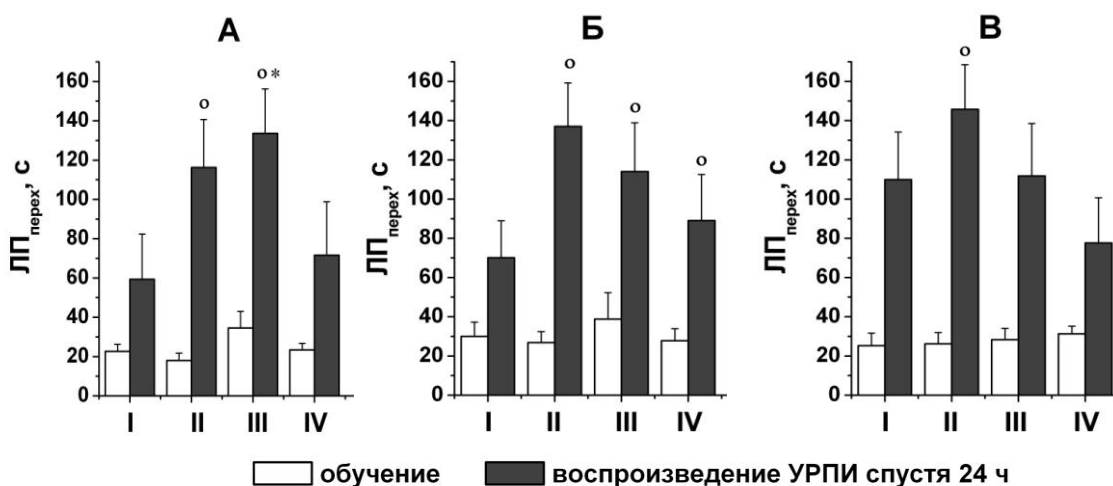
Примечание – Различия статистически значимы по сравнению: [×] – с исходным уровнем, $P < 0,05$, критерий Даннета; I – обучение, Па и Пб – воспроизведение УРПИ спустя 24 ч и 7 сут после обучения соответственно.

Показано, что Pro-Leu (0,1; 0,5 мг/кг) и Lys-Pro (0,01 мг/кг) улучшали обучаемость УРПИ крыс Wistar по критериям $T_{св}$ и/или ЛП_{перех} при раннем (через 24 ч) и отсроченном (спустя 7 сут) воспроизведении навыка по сравнению с исходным уровнем ($P < 0,05$, таблица 2). Введение Pro-Leu (0,01 мг/кг), Lys-Pro (0,1 мг/кг) и Pro-Leu-Gly (0,5 мг/кг) значимо улучшало обучаемость только при тестировании через 24 ч. Выраженность мнестических эффектов дипептидов не уступала либо превосходила таковую ноопепта (0,5 мг/кг) и пирацетама (250 мг/кг). Для Pro-Leu-Gly установлено наличие амнезирующего действия (в дозах 0,01; 0,1 мг/кг).

С учетом этих данных, для углубленного изучения отобраны Pro-Leu, ноопепт и Pro-Leu-Gly. Развернутый анализ спектра ноотропной активности включает в себя изучение влияния пептидов на фазы процессинга памяти в диапазоне эффективных доз. Кроме того, принимая во внимание наличие у образцов пептидной связи, важно установить, сохраняется ли эффект при введении внутрь. Поскольку для ноопепта и Pro-Leu-Gly такие исследования были проведены [Ostrovskaya R.U. et al., 1993; Островская и др., 2001; Puciłowski O., 1982], нами изучались эффекты Pro-Leu.

Влияние дипептида Pro-Leu на фазы процессинга памяти в тесте УРПИ. Введение Pro-Leu (в/ж, 8-кратно) облегчало обучение крыс Wistar: отмечено статистически значимое увеличение значений ЛП_{перех} при воспроизведении УРПИ относительно таковых при обучении на стадиях ввода и первоначальной обработки информации (0,1; 0,5 мг/кг), консолидации (0,1; 0,5 мг/кг) и извлечения энграммы памяти (0,1 мг/кг) – рисунок 1, А–В. В контроле аналогичные эффекты отсутствовали.

Повышение дозы до 10 мг/кг не вело к существенному углублению мнестической активности дипептида. Церебролизин обладал ноотропным действием только в отношении консолидации памятного следа (рисунок 1, А–В). Таким образом, показан ряд преимуществ Pro-Leu перед церебролизином: более высокая активность (диапазон действующих доз ниже на 3 порядка), эффективность в условиях в/ж введения, облегчающее действие в отношении всех фаз процессинга памяти.

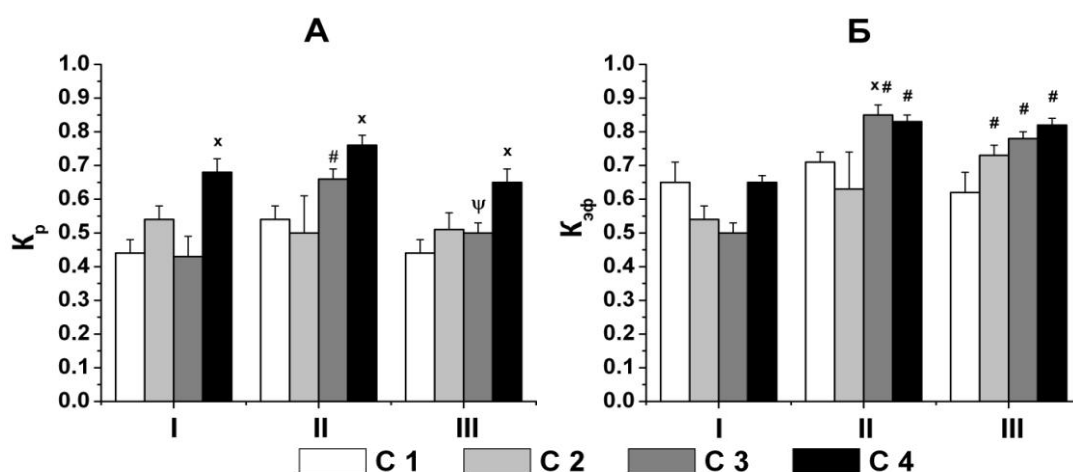


I – контроль (растворитель), II – Pro-Leu (0,1 мг/кг), III – Pro-Leu (0,5 мг/кг), IV – церебролизин (430,4 мг/кг); различия статистически значимы по сравнению: * – с контролем ($P < 0,05$, критерий НЗР Фишера), ° – с исходным уровнем ($P < 0,05$, критерий Уилкоксона)

Рисунок 1 – Влияние Pro-Leu (в/ж) и церебролизина (в/б) на фазы процессинга памяти (ввод и первичную обработку информации – А, консолидацию – Б и извлечение памятного следа – В) у крыс Wistar в тесте УРПИ

Влияние дипептида Pro-Leu на обучение НДК с использованием тонких манипуляторных движений у инбредных мышей BALB/c с врожденными нарушениями когнитивных функций. Для углубленного изучения потенциальных ноотропов, помимо теста УРПИ (с авersiveм подкреплением), целесообразно использовать другие формы обучения, среди которых была выбрана методика обучения НДК (с позитивным подкреплением). Данные об облегчении выработки условнорефлекторных навыков с пищевым подкреплением на фоне введения ноопепта и Pro-Leu-Gly опубликованы [Кравченко Е.В., Киркевич О.Г., 2008; Pan W., Kastin A.J., 2007]. Использование Pro-Leu (0,5 мг/кг, в/б, 13-кратно) ускоряло выработку НДК у мышей BALB/c: во время 3-го сеанса тестирования K_p был значимо выше такового в контроле на 53,5 % ($P < 0,05$) и соответствовал уровню, достигавшемуся у особей контрольной группы в 4-м сеансе (рисунок 2, А). У мышей, получавших Pro-Leu, значения $K_{эф}$ в 3-м сеансе существенно превосходили таковые в 1-м сеансе на 19,7 % ($P < 0,05$) при отсутствии динамики в контроле, а в 3-м и 4-м сеансах были выше, чем в контроле на 27,7–70,0 % ($P < 0,05$, рисунок 2, Б).

Назначение тофизопама совместно с Pro-Leu вело к существенной модификации эффектов дипептида ($P < 0,05$, рисунок 2, А, Б), что согласуется с данными о способности Pro-Leu предотвращать когнитивные нарушения в тесте угашения исследовательско-ориентировочной реакции, вызванные введением ПТЗ (блокатора ионофора ГАМК_A-рецептора) крысам Wistar [Кравченко Е.В., 2009].



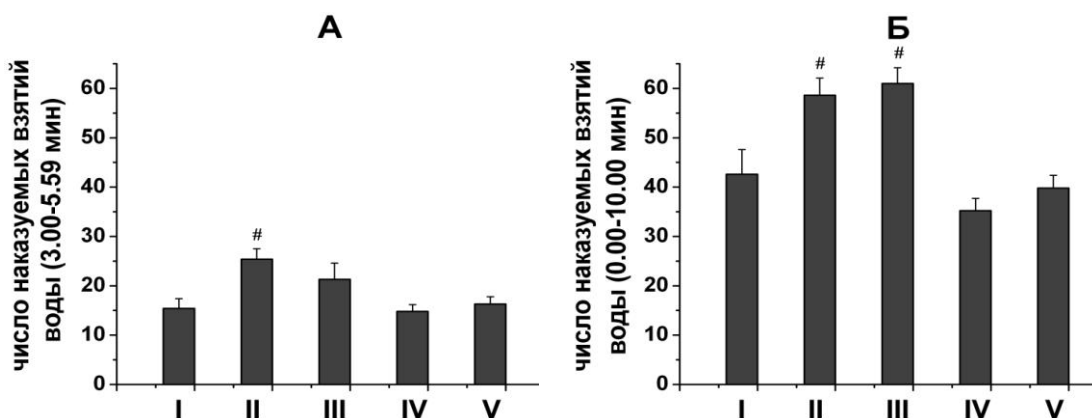
I – контроль (растворитель + растворитель), II – Pro–Leu (0,5 мг/кг) + растворитель, III – Pro–Leu (0,5 мг/кг) + тофизопам (1 мг/кг); С 1, С 2, С 3 и С 4 – 1-й, 2-й, 3-й и 4-й сеансы тестирования; различия статистически значимы по сравнению: # – с контролем ($P < 0,05$, критерий Данна); ^x – с исходным уровнем ($P < 0,05$, критерий Даннета); ^ψ – с группой II ($P < 0,05$, критерий Данна)

Рисунок 2 – Влияние Pro–Leu (в/б) и его комбинации с тофизопамом (в/б) на результативность (А) и эффективность (Б) выполнения НДК у мышей BALB/c

Изучение спектра нейрофармакологической активности и побочного нейротропного действия пролинсодержащих дипептидов и трипептида. Проводили оценку возможного анксиолитического, противосудорожного, противогипоксического и миорелаксантного действия Pro–Leu. Учитывая, что спектр нейрофармакологических эффектов и побочное действие ноопепта и Pro–Leu–Gly описаны Ostrovskaya R.U. (2006, 2007) и Kastin A.J. (2010), изучали способность ноопепта модифицировать противосудорожные эффекты вальпроевой кислоты, а также вероятность развития синдрома отмены после субхронического назначения Pro–Leu–Gly (с помощью методики АСР).

В методике конфликтной ситуации по Vogel Pro–Leu (1 мг/кг, в/ж, 4-кратно) и в меньшей степени церебролизин (в/б), но не персен-форте (в/ж) оказывали анксиолитическое действие, статистически значимо увеличивая число наказуемых ответов в сравнении с контролем за периоды 3.00–5.59 мин (Pro–Leu) и 0.00–10.00 мин (Pro–Leu, церебролизин) – рисунок 3, А, Б.

В методике предпочтения места мыши BALB/c контрольной группы существенно больше времени проводили в «безопасных» боковых (А+F) и «промежуточных» зонах (В+Е), избегая центральные зоны (С+D) – $P < 0,05$. Введение Pro–Leu (в/ж, 6-кратно) нивелировало различия продолжительности пребывания мышей в «избегаемых» и «предпочитаемых» зонах (С+D в сравнении с В+Е – в дозе 0,5 мг/кг, С+D в сравнении с В+Е и А+F – в дозе 1 мг/кг) – $P > 0,05$. Церебролизин нивелировал различия продолжительности нахождения только в центральных и боковых, но не «промежуточных» зонах.



I – контроль (растворитель), II – Pro-Leu (1 мг/кг), III – церебролизин (430,4 мг/кг), IV – персен-форте (30 мг/кг), V – персен-форте (70 мг/кг); # – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($P < 0,05$, критерий Данна)

Рисунок 3 – Влияние Pro-Leu (в/ж), церебролизина (в/б) и персен-форте (в/ж) на тревожность крыс Wistar в методике конфликтной ситуации по Vogel (по критерию число наказуемых взятий воды за интервалы 3.00–5.59 мин – А, 0.00–10.00 мин – Б)

На фоне введения Pro-Leu (0,1; 0,5; 1; 10 мг/кг, в/ж, 6-кратно) не отмечено статистически значимых изменений $A_{общ}$, $D_{пройд}$, что указывает на отсутствие у дипептида активирующих или седативных свойств. В методике оценки поведения в темной/светлой камере не выявлено существенного влияния Pro-Leu на УТ неполовозрелых и половозрелых крыс Wistar.

На модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме Pro-Leu (0,5; 10 мг/кг, в/ж, 4-кратно), как и церебролизин (430,4 мг/кг, в/б, 4-кратно), существенно не влиял на ЛП утраты позы у мышей ICR. В тесте МЭШ у Pro-Leu (0,5; 1 мг/кг, в/ж, 1-кратно) не выявлено противосудорожной активности.

Модификация ноопептом противосудорожных эффектов вальпроевой кислоты. Введение ПТЗ (74 мг/кг, п/к, 1-кратно) вызывало клонико-тонические судороги (4 балла и выше) у всех мышей и летальный исход у половины животных. ВК (200 мг/кг, в/ж, 1-кратно) существенно увеличивала ЛП_{СП} по сравнению с контролем. Применение ноопепта (0,5 мг/кг, в/б, 35-кратно) статистически значимо усиливало противосудорожное действие ВК: в сравнении с контролем повысилась $D_{защ}$, снизились общее число судорожных приступов (3 балла и выше) и смертность.

В тестах бокового положения, подтягивания на перекладине, удерживания на перевернутой сетчатой платформе и вращающегося стержня на фоне введения мышам BALB/c Pro-Leu (0,1; 0,5; 1; 10 мг/кг, в/ж, 12–13-кратно) не выявлено нарушений координации движений, изменений мышечного тонуса, а также нарушения рефлекса переворачивания, что указывает на возможность его использования в период активной деятельности.

Прекращение введения Pro-Leu-Gly (0,01 мг/кг, в/б, 24-кратно) не сопровождалось развитием синдрома отмены у крыс Wistar в методике АСР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Впервые показано, что пролинсодержащие дипептиды пролил-лейцин, лизил-пролина гидрохлорид, лейцил-пролина гидрохлорид, вводимые внутрибрюшинно в дозах 0,01–0,5 мг/кг, статистически значимо влияют на когнитивные функции аутбредных крыс Wistar в тесте условного рефлекса пассивного избегания [2–7, 16, 17]. Наиболее выраженной ноотропной активностью в ряду дипептидных производных пролина обладает пролил-лейцин, который увеличивает латентный период перехода в темный отсек на 87,9 % (0,5 мг/кг) по отношению к контролю и в 2,2–4,8 раза по отношению к исходному уровню (0,01; 0,1 и 0,5 мг/кг), а также повышает время пребывания в светлом отсеке на 54,1–72,7 % (0,1 и 0,5 мг/кг) в сравнении с контролем [3, 5]. В отличие от исследованных дипептидов пролинсодержащий трипептид пролил-лейцил-глицина амид характеризуется амнестическим эффектом в интервале доз 0,01–0,1 мг/кг [4, 17].

2. Установлено, что ноотропное действие пролил-лейцина проявляется облегчением всех фаз процессинга памяти, включая ввод и первичную обработку информации (0,1 и 0,5 мг/кг), консолидацию (0,1 и 0,5 мг/кг) и извлечение (0,1 мг/кг) энграммы памяти у крыс Wistar в тесте выработки условного рефлекса пассивного избегания (с аверсивным электроболевым подкреплением) в условиях внутрижелудочного применения [9]. Показаны преимущества пролил-лейцина перед препаратом сравнения церебролизином: эффективность в условиях внутрижелудочного введения, более высокая активность (0,1 мг/кг против 430,4 мг/кг соответственно) и позитивное действие в отношении всех фаз процессинга памяти [9].

Ноотропные свойства пролил-лейцина подтверждены на инбредных мышцах BALB/c с врожденными нарушениями когнитивных функций. У мышей этой линии в условиях применения позитивного (пищевого) подкрепления дипептид в дозе 0,5 мг/кг достоверно повышает эффективность обучения на разных этапах (на 27,7–70,0 % в сравнении с контролем) инструментальному навыку доставания корма с использованием тонких манипуляторных движений [11].

3. Проліл-лейцин, наряду с выраженным ноотропным действием, в условиях внутрижелудочного введения (0,5 и 1 мг/кг) обладает анксиолитическими свойствами [8, 12, 13]. Дипептид оказывает противотревожное действие у крыс Wistar в тесте конфликтной ситуации по Vogel [8, 12], а также уменьшает тигмотаксис (снижает время пребывания у стенок камеры) в условиях «стресса новизны» в методике предпочтения места у инбредных мышей BALB/c (с врожденными сонаправленными нарушениями поведения и функционирования нейротрансмиттерных систем, в том числе с генетически обусловленной реакцией страха и сниженной бензодиазепиновой рецепцией) [8, 13].

У пролил-лейцина не выявлено побочного нейротропного действия [3, 5, 9, 13, 14]. Расширенное исследование пролил-лейцина (0,1–10 мг/кг, внутрижелу-

дочно) с использованием набора нейрофармакологических тестов показало, что, в отличие от классических анксиолитиков, дипептид характеризуется отсутствием седативного (в методике предпочтения места) [13] и миорелаксантажного действия (в тестах бокового положения, подтягивания на перекладине, удерживания на перевернутой сетчатой платформе, вращающегося стержня) [14]. Пролил-лейцин при внутрижелудочном введении не активирует двигательную активность грызунов (в методике предпочтения места, 0,1–10 мг/кг) [13], не обладает противогипоксическими (в условиях нормобарической гипоксии с гиперкапнией, 0,5 и 10 мг/кг) и противосудорожными свойствами (в тесте максимального электрошока, 0,5 и 1 мг/кг) [14]. Особенностью пролинсодержащего дипептида N-фенилацетил-L-пролил-глицина этиловый эфир (ноопепт, внутривентрикулярно, 0,5 мг/кг) является способность усиливать действие вальпроевой кислоты в отношении судорог, вызванных введением пентилентетразола [1, 10]. Пролил-лейцил-глицина амид (внутрибрюшинно, 0,01 мг/кг) не вызывает развития синдрома отмены у крыс в методике акустической стартл-реакции [15].

4. Впервые проведенное целенаправленное нейрофармакологическое исследование пролил-лейцина в качестве биологически активного вещества выявило наличие у дипептида выраженных ноотропных и анксиолитических свойств, сочетающихся с отсутствием побочных активирующих, седативных или миорелаксантажных эффектов, что составляет важное отличие изученного вещества от классических средств ноотропного и анксиолитического типа действия.

Рекомендации по практическому использованию результатов

Выявлены новые соединения с мнемотропной активностью: пролинсодержащие дипептиды пролил-лейцин, лизил-пролина гидрохлорид, трипептид пролил-лейцил-глицина амид (изобретения зарегистрированы в Государственном реестре изобретений под № 16819 [16], № 17222 [17]), а также лейцил-пролина гидрохлорид (получено уведомление о положительном результате предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента на изобретение № а 20120471 от 28.03.2012).

Результаты диссертационной работы, касающиеся изучения специфической и нейрофармакологической активности субстанции L-пролиллейцина, включены в отчет по теме «Разработать лекарственное средство для лечения синдрома дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) на основе нейротропного пептида и освоить его производство в ГП «Академфарм» ИФБ НАН Беларуси» ГНТП «Фармацевтические субстанции и лекарственные средства»; с участием соискателя (ответственный исполнитель) выполнены фармакологические исследования субстанции лекарственного средства (акт внедрения результатов диссертационной работы от 21.06.2013 г.).

Результаты проведенных исследований в перспективе могут быть использованы в качестве научного фундамента для разработки новых лекарственных средств с мнемотропной направленностью действия.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах

1. Оригинальный ноотропный и нейропротекторный препарат ноопепт усиливает противосудорожную активность вальпроата у мышей / Е.В. Кравченко, **И.В. Понтелеева**, С.С. Трофимов, В.И. Лапа, Р.У. Островская, Т.А. Воронина // Эксперим. и клин. фармакология. – 2009. – Т. 72, № 6. – С. 15–17.
2. Кравченко, Е.В. Олигопептид ИФБ-31 улучшает выработку условной реакции пассивного избегания у крыс Wistar / Е.В. Кравченко, **И.В. Понтелеева** // Эпизоотология, иммунология, фармакология, санитария. – 2011. – № 1. – С. 54–58.
3. Кравченко, Е.В. Влияние пролинсодержащего дипептида на выработку и воспроизведение УРПИ у крыс Wistar / Е.В. Кравченко, **И.В. Понтелеева** // Эпизоотология, иммунология, фармакология, санитария. – 2011. – № 2. – С. 77–80.
4. Кравченко, Е.В. Влияние трипептида Pro–Leu–Gly–NH₂ на воспроизведение условной реакции пассивного избегания у крыс Wistar / Е.В. Кравченко, **И.В. Понтелеева** // Новости медико-биологических наук. – 2011. – Т. 3, № 2. – С. 153–157.
5. Влияние дипептида ИФБ-30 на обучаемость в тесте УРПИ крыс Wistar на разных стадиях онтогенеза / Е.В. Кравченко, **И.В. Понтелеева**, В.А. Книжников, З.И. Куваева // Новости медико-биологических наук. – 2012. – Т. 6, № 3. – С. 86–90.
6. Кравченко, Е.В. Влияние фактора сезонности на способность лабораторных крыс к выработке условнорефлекторного навыка и на мнемотропные эффекты дипептида Leu–Pro hydrochloride / Е.В. Кравченко, **И.В. Понтелеева** // Эпизоотология, иммунология, фармакология, санитария. – 2012. – № 3. – С. 44–50.
7. Кравченко, Е.В. Влияние дипептида Leu–Pro hydrochloride на выработку условной реакции пассивного избегания у половозрелых и неполовозрелых крыс Wistar / Е.В. Кравченко, **И.В. Понтелеева** // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2012. – № 4. – С. 16–20.
8. Понтелеева, И.В. Анксиолитические эффекты дипептида ИФБ-30 с ноотропными свойствами / **И.В. Понтелеева**, Е.В. Кравченко // Новости медико-биологических наук. – 2012. – Т. 6, № 4. – С. 190–196.
9. Влияние пролинсодержащего дипептида на фазы процессинга памяти / Е.В. Кравченко, **И.В. Понтелеева**, З.И. Куваева, В.А. Книжников, Л.А. Попова // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2013. – № 1. – С. 52–57.

Материалы конференций

10. Кравченко, Е.В. Перспективы применения олигопептидов в составе комплексной терапии эпилепсии / Е.В. Кравченко, **И.В. Понтелеева** // Молекулярная и биохимическая фармакология: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 80-летию Нац. акад. наук Беларуси, Гродно, 25–26 сентября, 2008 г. / Гос. учреждение «Науч.-произв. центр «Ин-т фармакологии и биохимии Нац. акад. наук Беларуси»; редкол.: П.С. Пронько (отв. ред.) [и др.]. – Гродно: ГрГУ им. Я. Купалы, 2008. – С. 48–50.

11. Кравченко, Е.В. Влияние ИФБ-30 на выработку навыка доставания корма у инбредных мышей BALB/c / Е.В. Кравченко, **И.В. Понтелеева** // Экспериментальная и клиническая фармакология: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 29–30 сентября 2011 г. / Гос. учреждение «Науч.-произв. центр «Ин-т фармакологии и биохимии Нац. акад. наук Беларуси»; редкол.: П.С. Пронько (отв. ред.) – Гродно: ГрГМУ, 2011. – С. 109–113.

12. Влияние дипептида ИФБ-30 на поведение крыс Wistar в тесте конфликтной ситуации по Vogel / Е.В. Кравченко, **И.В. Понтелеева**, В.А. Книжников, З.И. Куваева // Актуальные вопросы диагностики, терапии и реабилитации психических и поведенческих расстройств: материалы Междунар. конф., посвящен. 50-летию кафедры психиатрии и наркологии, Гродно, 15 июня 2012 г. / Гос. учреждение «Гродненский государственный медицинский университет»; редкол.: В.А. Карпюк (отв. ред.), В.А. Снежицкий, В.В. Воробьев, В.В. Зинчук. – ГрГМУ, 2012. – С. 156–158.

13. Влияние ИФБ-30 на поведение мышей BALB/c в условиях слабого «стресса новизны» в аппарате «ОРТО-МАХ» (Contextual place preference box) / Е.В. Кравченко, **И.В. Понтелеева**, В.А. Книжников, З.И. Куваева // Химия, структура и функция биомолекул: сб. материалов IV Междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения академика А.А. Ахрема, Минск, 17–19 октября 2012 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси. – Минск, 2012. – С. 175–176.

14. Кравченко, Е.В. Оценка гипнosedативного, миорелаксантного, противосудорожного и противогипоксического действия дипептида ИФБ-30 / Е.В. Кравченко, **И.В. Понтелеева** // Белорусские лекарства: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 22–23 ноября 2012 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси; редкол.: С.А. Усанов, П.Т. Петров. – Минск, 2012. – С. 115–119.

15. Понтелеева, И.В. Влияние отмены длительного введения трипептида Pro-Leu-Gly-NH₂ и тофизопама на акустическую стартл-реакцию у крыс Wistar / **И.В. Понтелеева** // Белорусские лекарства: материалы Междунар. научно-практ. конф., Минск, 22–23 ноября 2012 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси; редкол.: С.А. Усанов, П.Т. Петров. – Минск, 2012. – С. 188–195.

Патенты

16. Фармацевтическая композиция с ноотропной активностью: пат. 16819 Респ. Беларусь, МПК7 А 61К 38/05, А 61Р 25/00 / Д.И. Романовский, Е.В. Кравченко, **И.В. Понтелеева**, Л.В. Максимова; заявитель Институт биоорганической химии НАН Беларуси. – № а 20110184; заявл. 14.02.2011; опубл. 28.02.2013 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2013. – № 1. – С. 61.

17. Фармацевтическая композиция с мнемотропной активностью: пат. 17222 Респ. Беларусь, МПК7 А 61К 38/06, А 61Р 25/00 / Д.И. Романовский, Е.В. Кравченко, **И.В. Понтелеева**; заявитель Институт биоорганической химии НАН Беларуси. – № а 20110468; заявл. 13.04.2011; опубл. 30.06.2013 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2013. – № 3. – С. 65–66.

РЭЗІЮМЭ

Панцялеева Ірына Васільеўна

Мнематропныя эфекты ды- і трыпептыдаў, якія змяшчаюць пралін, ва ўмовах асацыятыўнага навучання

Ключавыя словы: асацыятыўнае навучанне, дыпептыды, трыпептыды, наатропы, нейратропнае дзеянне, пацукі Wistar, мышы ICR, мышы BALB/c.

Мэта даследавання: эксперыментальнае абгрунтаванне перспектыўнасці выкарыстання новых ды- і трыпептыдаў, якія змяшчаюць у сабе пралін, у якасці наатропных сродкаў.

Метады даследавання: тэст умоўнага рэфлексу пасіўнага пазбягання (УРПП), метадыка навучання навыку даставання корму (НДК) з ужываннем тонкіх маніпуляторных рухаў, метадыка канфліктнай сітуацыі па Vogel, метадыка ацэнкі паводзінаў у цёмнай/светлай камеры, метадыка перавагі месца, мадэль нармабарычнай гіпаксіі з гіперкапніей, тэст максімальнага электрашоку, тэст сутараг, выкліканых увядзеннем пенцілентэтразола, тэсты бакавога становішча, падцягвання на перакладзіне, утрымання на перагорнутай сеткаватай платформе, вярчальнага стрыжня, акустычная стартл-рэакцыя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Выяўлены новыя дыпептыды, якія змяшчаюць у сабе пралін і маюць выразнае дзеянне ў адносінах да асацыятыўнага навучання. Упершыню паказана здольнасць пралін-лейцына ва ўмовах унутрыстраўнікавага ўвядзення палягчаць навучанне УРПП у пацукоў Wistar на стадыях увода і першаснай апрацоўкі інфармацыі, кансалідацыі і вымання энграмы памяці, а таксама пры ўнутрыбрушынным увядзенні – паляпшаць навучанне НДК у інбрэдных мышэй BALB/c. Выяўлена анксіалітычнае дзеянне пралін-лейцына (унутрыстраўнікава) у метадыцы канфліктнай сітуацыі па Vogel.

Рэкамендацыі па выкарыстанні. Вынікі даследаванняў дыпептыдаў пралін-лейцын, лейцыл-праліна гідрахларыд, лізіл-праліна гідрахларыд, трыпептыда пралін-лейцыл-гліцына амід могуць з'явіцца навуковым падмуркам для распрацоўкі новых лекавых сродкаў з мнематропной скіраванасцю дзеяння.

Галіна прымянення: псіхафармакалогія, клінічная фармакалогія.

РЕЗЮМЕ

Понтелеева Ирина Васильевна

Мнемотропные эффекты пролинсодержащих ди- и трипептидов в условиях ассоциативного обучения

Ключевые слова: ассоциативное обучение, дипептиды, трипептиды, ноотропы, нейротропное действие, крысы Wistar, мыши ICR, мыши BALB/c.

Цель работы: экспериментальное обоснование перспективности использования новых пролинсодержащих ди- и трипептидов в качестве ноотропных средств.

Методы исследования: тест условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ), методика обучения навыку доставания корма (НДК) с использованием тонких манипуляторных движений, методика конфликтной ситуации по Vogel, методика оценки поведения в темной/светлой камере, методика предпочтения места, модель нормобарической гипоксии с гиперкапнией, тест максимального электрошока, модель судорог, вызванных введением пентилентетразола, тесты бокового положения, подтягивания на перекладине, удерживания на перевернутой сетчатой платформе, вращающегося стержня, акустическая стартл-реакция.

Полученные результаты и их новизна. Выявлены новые пролинсодержащие дипептиды, обладающие выраженным действием в отношении ассоциативного обучения. Впервые показана способность пролил-лейцина в условиях внутрижелудочного введения облегчать обучение в тесте УРПИ у крыс Wistar на стадиях ввода и первичной обработки информации, консолидации и извлечения энграммы памяти, а также при внутрибрюшинном введении – улучшать обучение НДК у инбредных мышей BALB/c. Выявлено анксиолитическое действие пролил-лейцина (внутрижелудочно) в методике конфликтной ситуации по Vogel.

Рекомендации по использованию. Результаты исследований дипептидов пролил-лейцин, лейцил-пролина гидрохлорид, лизил-пролина гидрохлорид, трипептида пролил-лейцил-глицина амид могут явиться научным фундаментом для разработки новых лекарственных средств с мнемотропной направленностью действия.

Область применения: психофармакология, клиническая фармакология.

SUMMARY

Pantsialeveva Iryna Vasilievna **Mnemotropic effects of proline containing di- and tripeptides** **in terms of associative learning**

Keywords: associative learning, dipeptides, tripeptides, nootropics, neurotropic action, Wistar rats, ICR mice, BALB/c mice.

The objectives: experimental substantiation of the prospects of using new proline containing di- and tripeptides as nootropics.

Methods of research: passive avoidance task, skilled reaching test, Vogel conflict test, light/dark transition test, place preference test, normobaric hypoxia-hypercapnia model, maximal electroshock seizure test, pentylenetetrazole-induced seizure test, righting reflex task, horizontal wire test, four limb hang test, rotating rod task, acoustic startle reflex test.

Obtained results and their novelty. The new proline containing dipeptides that have marked effect on associative learning are revealed. For the first time the research showed the ability of prolyl-leucine to facilitate the learning in passive avoidance task at the stages of fixation, consolidation and retrieval of memory engrams (intragastrically) and to enhance skilled reaching in inbred BALB/c mice (intraperitoneally). The study revealed anxiolytic action of prolyl-leucine (intragastrically) in Vogel conflict test.

Application recommendations. Results of research of dipeptide prolyl-leucine, leucyl-proline hydrochloride, lisyl-proline hydrochloride, the tripeptide prolyl-leucyl-glycine amide may be the scientific foundation for the development of new drugs with mnemotropic action.

Field of application: psychopharmacology, clinical pharmacology.

Подписано в печать 17.11.14. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Снегурочка».
Ризография. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 1,39. Уч.-изд. л. 1,4. Тираж 60 экз. Заказ 605.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.

Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.