

Оценка эффектов новых пептидных соединений у экспериментальных животных с токсическими моделями болезни Альцгеймера

А.В. Ставровская, Н.Г. Ямщикова, А.С. Ольшанский, Г.А. Бабкин, С.Н. Иллариошкин

ФГБНУ «Научный центр неврологии» (Москва); ООО «Лактокор» (Москва)

Разработка новых подходов к лечению болезни Альцгеймера (БА) остается актуальной проблемой современной неврологии в связи с ее высокой распространенностью в популяции и тяжелой необратимой инвалидизацией, которой она сопровождается. Нами на двух взаимодополняющих моделях БА у крыс (с введением β -амилоида в ядра Мейнерта и с введением стрептозоцина в желудочки мозга) исследованы эффекты новых пептидных соединений – β -казоморфина-7 и колострина. Введение пептидов осуществляли интраназально в течение 10 дней после развития симптомов БА, индуцированного нейротоксинами. Введение β -казоморфина-7 и колострина оказало сходное действие на поведение и когнитивные функции крыс как с β -амилоидной, так и со стрептозоциновой моделью БА: наблюдалось статистически значимое усиление двигательной активности и ориентировочных реакций, а также улучшение когнитивных функций животных. Колострин оказывал более выраженный положительный эффект на поведение крыс с индуцированной БА, тогда как β -казоморфин-7 действовал и на ложнопериоперированных и на модельных животных, что свидетельствует об общем нейротропном потенциале данного пептида. Предложенные экспериментальные подходы расширяют возможности изучения новых биологически активных веществ, направленных на профилактику и лечение нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, β -амилоид, стрептозоцин, нейропротекция, пептиды, β -казоморфин-7, колостринин.

Нейродегенеративные заболевания – стратегическая проблема современной неврологии, находящая в центре внимания исследователей всего мира [8]. К нейродегенеративным заболеваниям, имеющим большую социальную значимость в силу своего широкого распространения и тяжести течения, относится болезнь Альцгеймера (БА). Она развивается преимущественно в пожилом возрасте, приводит к прогрессирующему когнитивному снижению и изменениям личности и является ведущей причиной деменции в современном обществе [2, 3, 9]. Гистологически БА характеризуется распространенными изменениями головного мозга, первоначально появляющимися в гиппокампе, базальном ядре Мейнерта и связанных с ними отделах ЦНС, при этом наиболее характерными маркерами заболевания являются многочисленные бляшки в паренхиме мозга, содержащие патологический белок β -амилоид ($A\beta$), и тау-позитивные нейрофибриллярные клубки в дегенерирующих нейронах [12, 32]. Факторами развивающегося при БА «амилоидного каскада» являются микроглиальные воспалительные реакции, активация перекисного липида, дезинтеграция микротрубочек и всей транспортной системы нейрона [2]. Начиная с самой ранней «преддементной» стадии БА, в мозге развивается корковый холинергический дефицит, связанный с ранним вовлечением холинергических проекций из ядра Мейнерта, а также наблюдается ряд других нейротрансмиттерных нарушений, затрагивающих глутаматергическую, норадренергическую и иные системы [4, 9, 17]. Гипотеза о роли $A\beta$ и тау-белка в возникновении и развитии БА получила развитие в многочисленных экспериментальных исследованиях [14, 18, 24, 30, 31].

Моделирование БА осуществляется чаще всего путем введения $A\beta$ в ядра Мейнерта или в желудочки мозга. Многие исследования показали, что различные фрагменты $A\beta$, такие как $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{42}$ и $A\beta_{25-35}$, вызывают ухудшение обучения и памяти у мышей и крыс [11, 22, 23, 26]. Так, введение $A\beta_{25-35}$ в базальные ядра Мейнерта вызывает дегенеративные изменения нейронов во фронтальной коре и гиппокампе, которые начинают появляться через 1 нед, развиваются на протяжении 4 нед и проявляются различными формами когнитивного дефицита [16].

Интересная модель БА основана на внутрижелудочковом введении стрептозоцина – токсина, избирательно повреждающего β -клетки поджелудочной железы [27]. Стрептозоцин – вещество токсичное для бета-клеток поджелудочной железы. Использование этого вещества основывается на том, что в постмортальных образцах мозга при БА было выявлено снижение экспрессии генов инсулина и инсулиноподобного фактора роста (insulin-like growth factor, IGF), а также их рецепторов [7]. Показано, что введение стрептозоцина в мозг, приводящее к подавлению инсулиновых и IGF-сигнальных механизмов и окислительному стрессу, достаточно для инициации нейродегенерации альцгеймеровского типа, включая гибель нейронов, глиоз, повышенную иммунореактивность по фосфорилированному тау-белку, $A\beta$, p53, убиквитину [21]. Такое воздействие приводило к изменению экспрессии в мозге большого числа нейрональных и глиальных генов, сходному с изменениями при БА, а также к локальной разбалансировке системы инсулин/IGF/инсулиновые рецепторы, что позволило

сформулировать понятие о спорадической БА как о «диабете 3-го (мозгового) типа» [15, 21]. Стрептозоцин при внутрибрюшинном введении не проникает через гемато-энцефалический барьер, поэтому для моделирования БА осуществляют его внутрижелудочковое введение, которое позволяет воспроизводить большой комплекс биохимических изменений, наблюдаемых на разных стадиях нейродегенеративного процесса в веществе мозга при БА [12, 28]. Это сопровождается у крыс развитием выраженного амнестического эффекта [6].

Указанные модели БА активно используются для тестирования эффектов новых нейропротекторных соединений – потенциальных лекарственных препаратов [19, 20]. К числу таких соединений относятся *казоморфины*.

Казоморфины – короткоцепочечные пептиды, которые образуются в процессе пищеварения из белка, содержащегося в молоке – казеина. Характерным признаком казоморфинов является их опиоидный эффект [29]. Наиболее значимые с биологической точки зрения казоморфины являются продуктом переваривания β -казеина, при этом образуются β -казоморфины с различным количеством аминокислот. Так, β -казоморфин-7 – экзогенный опиоидный гептапептид Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile – проявляет в эксперименте адаптогенную и анксиолитическую активность [1]. Ежедневные однократные инъекции данного пептида белым крысам (на 21–34-й дни после рождения) приводили к достоверному уменьшению тревожности и улучшению исследовательской активности экспериментальных животных, причем эти изменения сохранялись до возраста 56 дней [5]. Таким образом, для системного вводимого β -казоморфина-7 доказана принципиальная возможность продолжительного влияния на поведение детенышей млекопитающих и, соответственно, на процессы созревания мозга в раннем постнатальном периоде.

Еще одним перспективным при нейродегенеративных заболеваниях препаратом, уже доказавшим свое благоприятное действие на примере БА, является колостринин – пептидный комплекс, получаемый при фильтрации молозива [10]. В экспериментальных исследованиях он может рассматриваться как удачный препарат сравнения по отношению к новым соединениям.

В настоящей работе на экспериментальных моделях БА у крыс исследовались эффекты пептидных препаратов β -казоморфина-7 и одного из компонентов колостринина – нанопептида Val-Glu-Ser-Tyr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro (далее по тексту для упрощения он обозначается общим названием исходного пептидного комплекса – колостринин).

Материалы и методы

Работа была выполнена на крысах-самцах линии Wistar в возрасте 3–4 мес ($n=120$). Животные содержались в виварии отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН при свободном доступе к пище и воде и естественном чередовании суточной освещенности. Содержание животных и проведение экспериментов осуществляли в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

В работе были использованы две экспериментальные модели БА – β -амилоидная и стрептозоциновая.

Для создания первой модели животным вводили 2 мкг $A\beta_{25-35}$ в 5 мкл бидистиллированной воды билатерально в ядра Мейнерта ($n=60$). Предварительно раствор $A\beta_{25-35}$ (Sigma, США) выдерживали в течение четырех дней при температуре 37°C для агрегации пептида. Для проведения хирургической операции крысы были анестезированы внутрибрюшинным введением нембутала 30 мг/кг и бензодиазепина 5 мг/кг и помещены на раму двойного лабораторного стереотаксического манипулятора фирмы Stoelting Co. (США). Для стереотаксического введения $A\beta_{25-35}$ были использованы следующие координаты [25]: AP=-1,4; V=7,4; L=2,7. Ложнооперированным крысам вводили растворитель в том же объеме.

Для получения у крыс стрептозоцин-индуцированной экспериментальной деменции альцгеймеровского типа животным билатерально вводили стрептозоцин в дозе 3 мг/кг массы тела в 5 мкл физиологического раствора в боковые желудочки мозга ($n=60$). Для стереотаксического введения были использованы следующие координаты [25]: AP=-0,6; V=1,5; L=4,0. Инъекции стрептозоцина осуществляли вручную с помощью микрошприца Hamilton со скоростью 1 мкл/мин. Ложнооперированным крысам вводили растворитель в том же объеме.

Через 2 нед после введения $A\beta_{25-35}$ либо стрептозоцина животным осуществляли интраназальное введение β -казоморфина-7 и колостринина в дозе 0,1 мг/кг ежедневно на протяжении 10 дней. Пептидные препараты были получены и предоставлены для исследования сотрудниками ООО «Лактокор». Для оценки эффекта пептидных препаратов животные были разделены на 5 групп по 12 особей в каждой группе: 1) ложнооперированные крысы, которым интраназально вводили β -казоморфин-7; 2) ложнооперированные крысы, которым интраназально вводили колостринин; 3) крысы с введением моделирующего агента ($A\beta_{25-35}$ либо стрептозоцин) и интраназальным введением дистиллированной воды; 4) крысы с введением моделирующего агента и интраназальным введением β -казоморфина-7; 5) крысы с введением моделирующего агента и интраназальным введением колостринина.

С целью изучения изменения двигательной активности, памяти и эмоционального состояния животных на фоне введения препаратов проводили тестирование их поведения в «открытом поле» (ОП) и приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ), а также изучали изменения воспроизведения условных реакций пассивного избегания (УРПИ) и последствия болевой стимуляции на двигательную активность крыс. Кроме этого, в начале (началом эксперимента считали первый день интраназального введения препаратов) и в конце эксперимента (после последнего помещения в ПКЛ) у животных определяли вес с целью выявления эффекта терапии на метаболизм животных. При проведении теста в ОП в течение 3 мин определяли горизонтальную и вертикальную двигательную активность; при этом учитывали общее количество пересеченных квадратов, а также протяженность пройденной дистанции и число стоек. Воспроизведение пассивных оборонительных реакций оценивали по величине латентного периода перехода крыс из ярко освещенного отсека камеры в темный отсек, в котором животные получали электрическое раздражение. Тестирование таких реакций проводили через 1, 3, 7 и 14 сут после предъявления электрического раздражения. Для оценки пространственной памяти крыс использовался крестообразный лабиринт. Время, затраченное животным, для перехода с конца открытого ру-



рис. 1: Схема эксперимента.

кава ПКЛ в один из закрытых рукавов, было обозначено как исходное время задержки, латентный период (ЛП). Крысам разрешали исследовать лабиринт в течение 30 с после записи ЛП, затем возвращали в домашнюю клетку. Тестирование ЛП проводили на 11-й и 12-й дни эксперимента (1-е предъявление) и 29-й и 30-й дни (2-е предъявление) [10].

Фиксирование и анализ поведенческих экспериментов проводили с помощью системы видео наблюдения за поведением животных Apy-maze. Общая схема эксперимента представлена на рис. 1.

Данные обрабатывали в программе Statistica, используя тест Вилкоксона для сравнения связанных выборок и дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным тестом Fisher LSD для сравнения между группами. В случае отклонения от нормального распределения применяли тест Kraskell-Wallis ANOVA. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследование двигательной активности крыс в ОП проводилось в первый (предъявление 1) и последний дни интра-

назального введения лекарств (предъявление 2); таким образом, интервал между предъявлениями составлял 10 дней. Данный поведенческий параметр измерялся двумя способами: в одном случае фиксировалось любое передвижение по ОП, в т.ч. повороты туловища и топтание в одном и том же квадрате (пройденная дистанция в метрах), во втором случае – число пересеченных квадратов.

Двигательная активность животных на модели с $A\beta_{25-35}$

Тестирование животных с $A\beta$ -индуцированной БА показало, что введение β -казоморфина-7 ложнооперированным животным (группа 1) вызвало увеличение горизонтальной двигательной активности на уровне устойчивой тенденции (рис. 2А), а введение модельным животным (группа 4) привело к ее достоверному увеличению по сравнению с первым предъявлением (рис. 2Б). У животных группы 2 по окончании введения колострина было обнаружено снижение двигательной активности. Такое изменение величины пройденной дистанции было достоверным не только по сравнению с первым тестированием, но и по сравнению с группой 1 (рис. 2А) и группой 5 (модельные животные, получавшие колостринин) (рис. 2В). Введение β -амилоида в ядра Мейнерта мозга крыс вызывало уменьшение пройденной дистанции в ОП (рис. 2Г), тогда как введение пептидных препаратов противодействовало такому эффекту. Количество перемещений животных групп 4 и 5 в ОП значительно увеличивалось, и такое изменение было достоверным у обеих групп по сравнению с группой 3 (модельной группой, получавшей интраназальную дистиллированную воду) (рис. 2Г).

Схожие изменения двигательной активности наблюдались при фиксировании числа пересеченных квадратов (рис. 3).

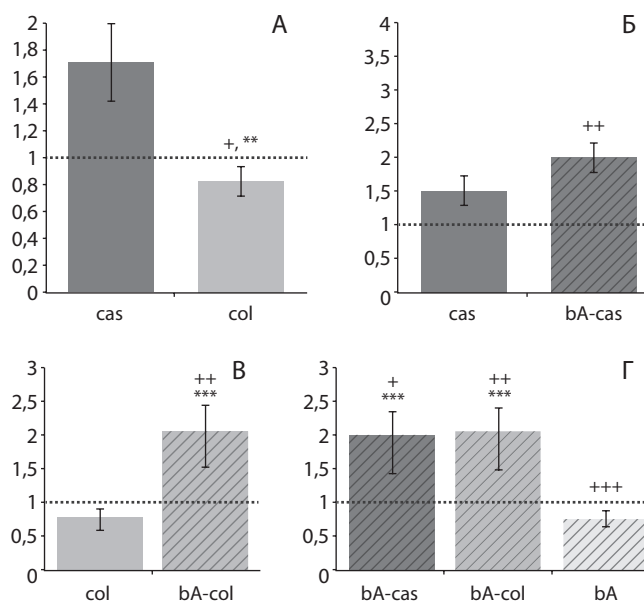


рис. 2: Изменение двигательной активности крыс в ОП (пройденная дистанция) в модели с $A\beta_{25-35}$.

Условная величина пройденной дистанции при первом тестировании обозначена на графике пунктирной линией. cas – крысы группы 1, col – крысы группы 2, bA – крысы группы 3, bA-cas – крысы группы 4, bA-col – крысы группы 5. Различия достоверны по сравнению с первым предъявлением при $p < 0,1$ (+), $p < 0,05$ (++) , $p < 0,01$ (+++); различия достоверны при сравнении между группами при $p < 0,1$ (*), $p < 0,05$ (**), $p < 0,01$ (***) .

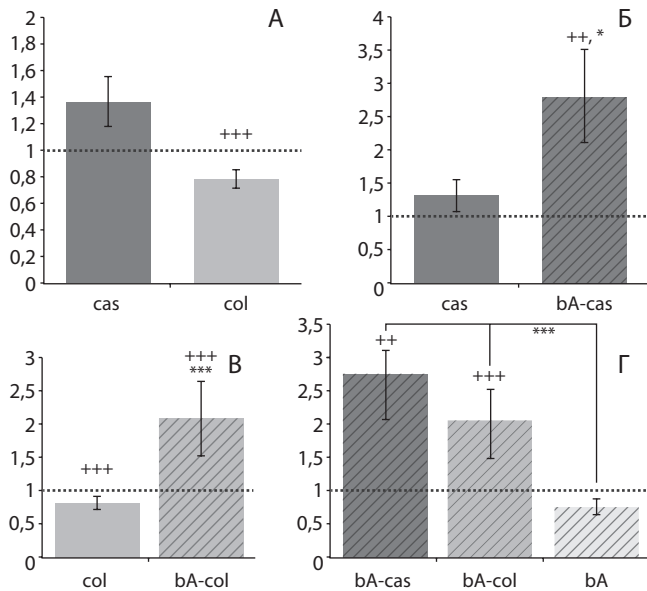


рис. 3: Изменение горизонтальной двигательной активности крыс в ОП (число пересеченных квадратов) в модели с $A\beta_{25-35}$. Условная величина числа пересеченных квадратов при первом тестировании обозначена на графике пунктирной линией. Остальные обозначения – как на рис. 2.

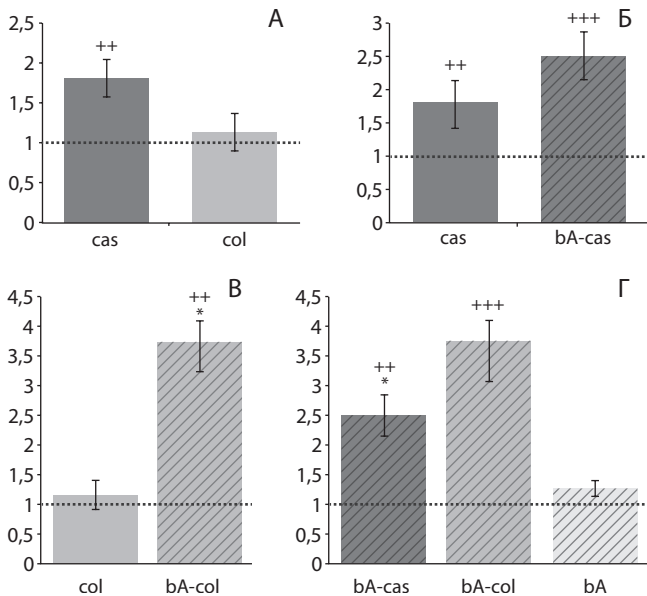


рис. 4: Изменение вертикальной двигательной активности в ОП в модели с $A\beta_{25-35}$. Условная величина числа стоек при первом тестировании обозначена на графике пунктирной линией. Остальные обозначения – как на рис. 2.

При анализе изменений данного показателя описанные выше закономерности проявились более отчетливо.

Также было показано, что к 10-му дню введения пептидов у крыс усилилось ориентировочное поведение. Это выразилось в достоверном увеличении числа стоек у крыс групп 1 и 4 (получавших β -казоморфин-7) (рис. 4А и Б). Введение колостринина ложноперирированным животным (группа 2) не повлияло на их вертикальную двигательную активность в ОП, но резко повысило число стоек у модельных

животных (группа 5), что привело к достоверным различиям таких изменений между данными группами (рис. 4В). Введение β -амилоида в ядра Мейнерта мозга крыс не вызвало значимых изменений изучаемого поведенческого показателя (рис. 4Г), но при этом введение пептидных препаратов модельным животным увеличивало число стоек в группах 4 и 5 и приводило к достоверным различиям в изменении этой величины при сравнении обеих групп с группой 3 (рис. 4Г).

Двигательная активность животных на модели со стрептозоцином

На модели БА, индуцированной стрептозоцином, введение β -казоморфина-7 ложноперирированным животным группы 1 вызвало достоверное увеличение величины горизонтальной двигательной активности и по сравнению с первым тестированием в ОП, и по сравнению с группой крыс 2 (рис. 5А). Введение препарата модельным животным (группа 4) привело к достоверному увеличению двигательной активности как по сравнению с первым предъявлением, так и по сравнению с группой ложноперирированных крыс (группа 1) (рис. 5Б). У животных группы 2 введение колостринина не вызвало заметных изменений горизонтальной двигательной активности (рис. 5В). Также не было обнаружено значимых изменений величины пройденной дистанции в ОП в результате введения стрептозоцина в боковые желудочки мозга крыс (рис. 5Г). Введение пептидных препаратов приводило к тому, что количество перемещений в ОП у животных в группах 4 и 5 значительно увеличивалось, и такое изменение было достоверным у обеих групп по сравнению с группой 3 (модельной группой, получавшей интраназально дистиллированную воду) (рис. 5Г). Схожие изменения двигательной активности наблюдались

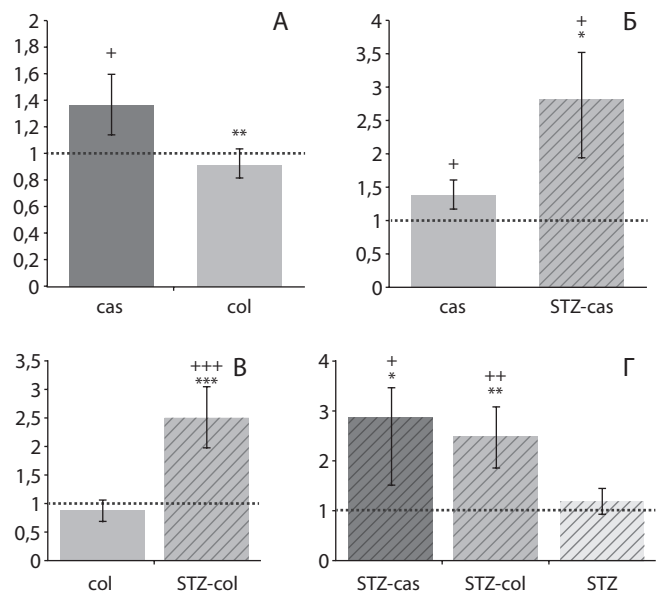


рис. 5: Изменение горизонтальной двигательной активности крыс в ОП (пройденная дистанция) в модели со стрептозоцином. Условная величина пройденной дистанции при первом тестировании обозначена на графике пунктирной линией. cas – крысы группы 1, col – крысы группы 2; STZ – крысы группы 3, STZ-cas – крысы группы 4, STZ-col – крысы группы 5. Различия достоверны по сравнению с первым предъявлением при $p \leq 0,1$ (+), $p \leq 0,05$ (++) , $p \leq 0,01$ (+++); различия достоверны при сравнении между группами при $p \leq 0,1$ (*), $p \leq 0,05$ (**), $p \leq 0,01$ (***) .

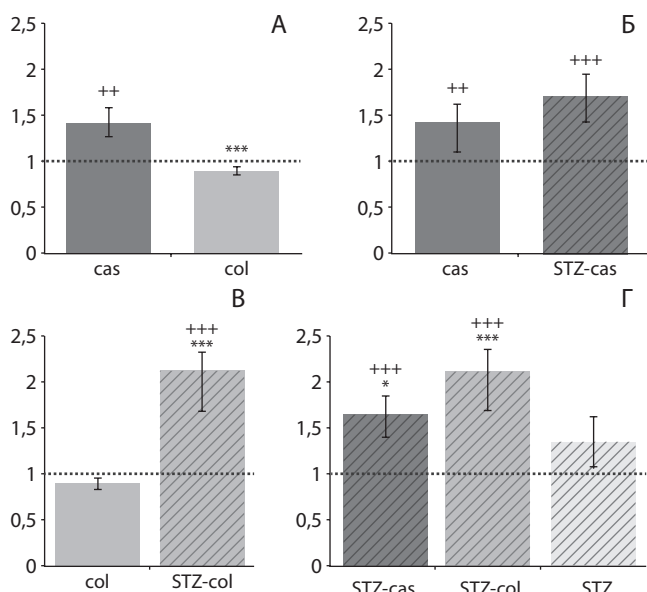


рис. 6: Изменение горизонтальной двигательной активности крыс в ОП (число пересеченных квадратов) в модели со стрептозоцином. Условная величина числа пересеченных квадратов при первом тестировании обозначена на графике пунктирной линией. Остальные обозначения – как на рис. 5.

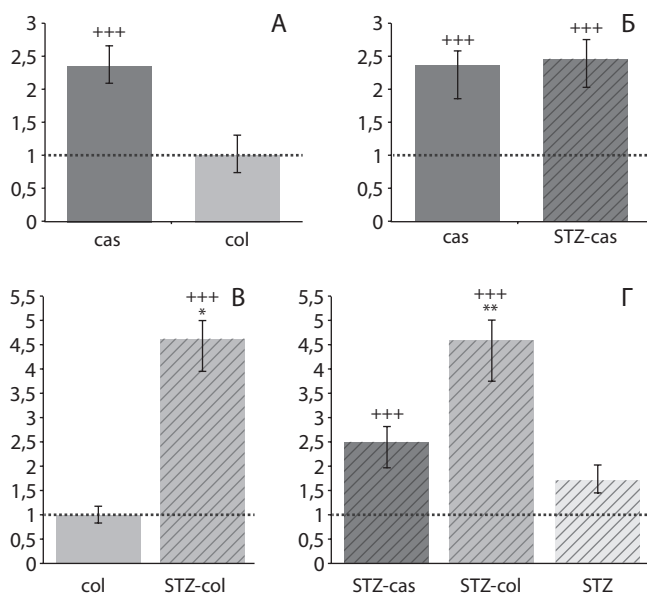


рис. 7: Изменение вертикальной двигательной активности в ОП в модели со стрептозоцином. Условная величина числа стоек при первом тестировании обозначена на графике пунктирной линией. Остальные обозначения – как на рис. 5.

при фиксировании числа пересеченных квадратов (рис. 6 А–Г), различие состояло лишь в отсутствии достоверных различий изменения числа пересеченных квадратов между животными групп 1 и 4 (рис. 6Б).

Нами показано, что к 10-му дню введения пептидов у крыс усилилось ориентировочное поведение. Это выразилось в достоверном увеличении числа стоек у крыс групп 1 и 4 (получавших β-казоморфин-7) (рис. 7А и Б). Введение колостринина ложнооперированному животному (группа 2) не

повлияло на их вертикальную двигательную активность в ОП, но резко повысило число стоек у модельных животных (группа 5), что привело к достоверным различиям таких изменений между данными группами (рис. 7В). Введение стрептозоцина в боковые желудочки мозга крыс не вызвало значимых изменений изучаемого поведенческого показателя (рис. 7Г). Введение пептидных препаратов модельным животным увеличивало число стоек в группах 4 и 5 и приводило к достоверным различиям в изменении этой величины при сравнении группы 3 с группой 5, но не с группой 4 (рис. 7Г).

В данной экспериментальной группе животных дополнительно проводилось еще одно тестирование двигательной активности в ОП после второго предъявления теста ПКЛ (33-й день). Третье тестирование носило выборочный характер, его целью было выяснение уровня двигательной активности в ОП у модельных животных с выраженными нарушениями поведения в ПКЛ. Результаты этого тестирования показали, что у животных со стрептозоциновой моделью двигательная активность в ОП практически отсутствует, тогда как ложнооперированные животные демонстрировали достаточно высокий уровень двигательной активности. Можно предположить, что эффект введения β-казоморфина-7 и колостринина не сохранялся через 20 сут после отмены препаратов. Резкое снижение двигательной активности обусловлено, по-видимому, развитием нейродегенеративного процесса в мозге экспериментальных животных.

Тестирование в приподнятом крестообразном лабиринте

На 11-й и 12-й дни (первое предъявление) и 29-й и 30-й дни эксперимента (второе предъявление) был проведен тест в ПКЛ. Тестирование животных с Аβ-индуцированной БА показало, что у ложнооперированных животных группы 1 величина ЛП захода в закрытый рукав достоверно не изменялась на второй день помещения в лабиринт ни в первом, ни во втором предъявлении. Однако у ложнооперированных животных группы 2 величина ЛП на второй день при первом предъявлении достоверно уменьшилась (рис. 8 слева). У крыс с Аβ-индуцированной БА групп

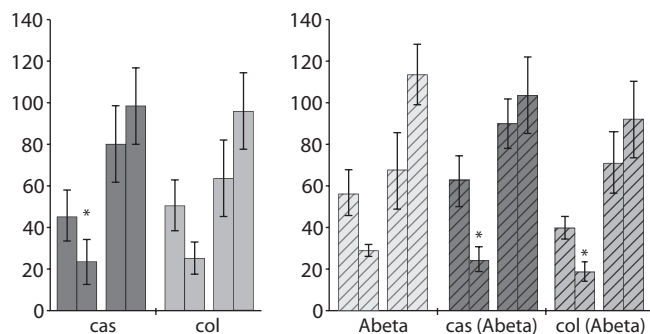


рис. 8: Изменение величины латентного периода захода в темный рукав лабиринта в модели с Аβ₂₅₋₃₅.

По оси ординат: время в секундах. По оси абсцисс: слева – ложнооперированные животные, справа – животные с Аβ-моделью БА. cas – крысы группы 1, col – крысы группы 2, Abeta – крысы группы 3, cas(Abeta) – крысы группы 4, col(Abeta) – крысы группы 5. Среди столбиков одного вида каждый первый столбик – первый день 1-го предъявления, каждый второй – второй день 1-го предъявления, каждый третий – первый день 2-го предъявления, каждый четвертый – второй день 2-го предъявления. * – различия достоверны по сравнению с первым днем, $p < 0,05$.

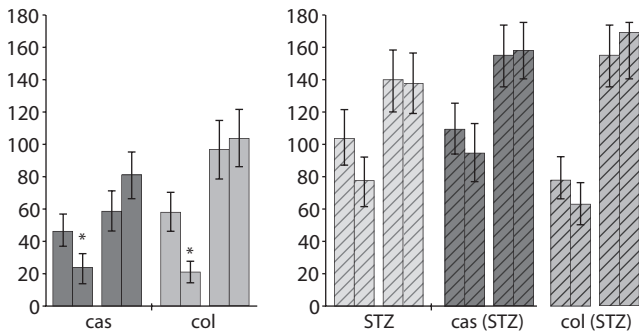


рис. 9: Изменение величины латентного периода захода в темный рукав лабиринта в модели со стрептозоцином.

По оси ординат: время в секундах. По оси абсцисс: слева – ложнооперированные животные, справа – животные со стрептозоциновой моделью БА. cas – крысы группы 1, col – крысы группы 2; STZ – крысы группы 3, cas(STZ) – крысы группы 4, col(STZ) – крысы группы 5. Остальные обозначения – как на рис. 8.

4 и 5 также наблюдалось достоверное понижение величины ЛП во второй день 1-го предъявления (рис. 8 справа) При этом у крыс всех групп наблюдалось увеличение ЛП при сравнении предъявлений на уровне устойчивой тенденции.

Таким образом, при 1-м тестировании времени перехода введение β-казоморфина-7 крысам опытной группы приводило к достоверному уменьшению ЛП на второй день, что говорит о высокой степени сохранения пространственной памяти; введение колострина вызвало такой же эффект и у крыс опытной группы, и у ложнооперированных животных. Следует отметить, что такое действие пептидных препаратов наблюдалось через 10 дней после начала интраназального введения и не сохранялось при тестировании пространственной памяти у животных через 30 дней после начала введения.

Тестирование пространственной памяти в ПКЛ у животных со стрептозоцин-индуцированной БА показало, что у ложнооперированных крыс групп 1 и 2 ЛП на второй день помещения в ПКЛ была достоверно ниже по сравнению с первым днем (рис. 9 слева). У крыс в группах 3', 4' и 5' изменений величины ЛП во второй день не наблюдалось (рис. 8 справа). При повторном тестировании величина ЛП увеличилась во всех группах.

Таким образом, на основании полученных данных можно предположить, что введение β-казоморфина-7 и колострина не нарушило пространственную память у ложнооперированных крыс, однако введение данных препаратов крысам со стрептозоциновой моделью БА не смогло нивелировать токсический эффект стрептозоцина. При этом можно полагать, что на такой модели введение колострина оказало больший эффект, чем введение β-казоморфина-7, поскольку величины ЛП первого предъявления у этих животных были сравнимы с величинами ЛП первого предъявления у крыс группы 2. Увеличение ЛП вплоть до максимальных значений во втором предъявлении у крыс опытных групп, по-видимому, связано с прогрессирующим развитием нейродегенерации на фоне действия стрептозоцина. Эффект введения пептидных препаратов не сохранялся до 33-го дня.

Условный рефлекс пассивного избегания

Тестирование УРПИ у крыс с Аβ-индуцированной БА показало, что ложнооперированные крысы 1-й и 2-й групп после нанесения неизбежного болевого раздражения

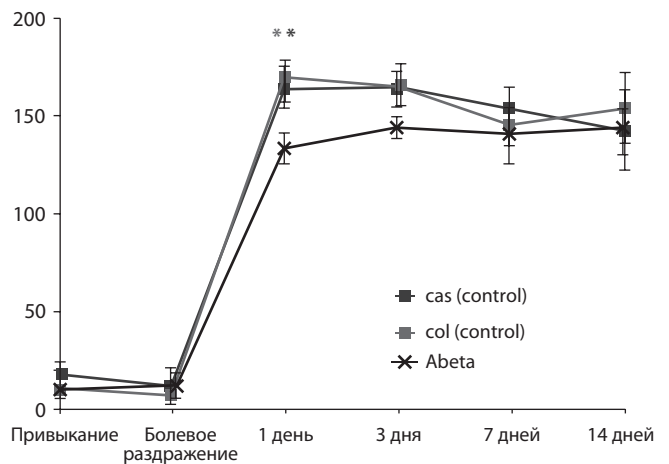
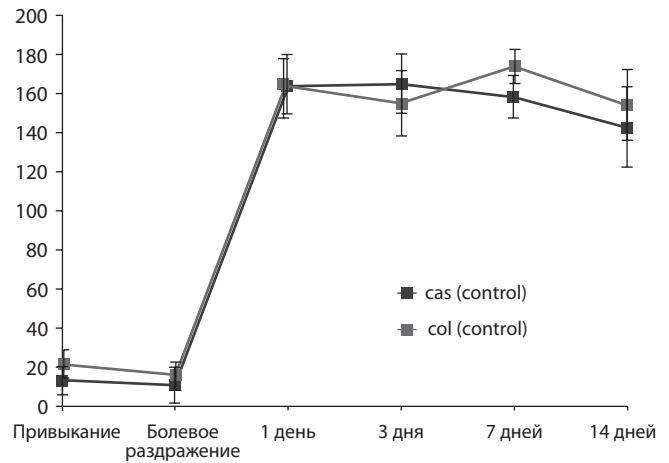


рис. 10: Величина ЛП перехода в темный отсек камеры при воспроизведении реакций УРПИ в модели с Аβ₂₅₋₃₅.

По оси ординат: время в секундах; по оси абсцисс – дни эксперимента. Слева – ложнооперированные животные, справа – животные с Аβ-моделью БА. Abeta cas(contr) – крысы группы 1, col(contr) – крысы группы 2; Abeta – крысы группы 3, cas(Abeta) – крысы группы 4, colo(Abeta) – крысы группы 5; цветные звездочки – различия достоверны по сравнению соответствующих по цвету групп с группой 3 при p<0,05.

либо вовсе не заходили в темный отсек камеры, либо заходили с большим латентным периодом (рис. 10 вверху). Крысы опытных групп также заходили в темный отсек с большими латентными периодами, однако у крыс группы 3 величина латентного периода была достоверно ниже через одни сутки после болевого воздействия (рис. 10 внизу).

Можно заключить, что введение β-казоморфина-7 и колострина привело к выраженному усилению реакций пассивного избегания у крыс как опытной группы, так и у ложнооперированных животных. Величина ЛП имела высокие значения во все дни тестирования, что может свидетельствовать об улучшении когнитивных функций у этих групп крыс.

При тестировании УРПИ у крыс со стрептозоциновой моделью БА оказалось, что у ложнооперированных крыс групп 1 и 2 величина ЛП перехода в темный отсек была очень высокой во все дни тестирования (рис. 11 слева). Введение стрептозоцина нарушало воспроизведение реакций пассивного избегания. Это выражалось в уменьшении

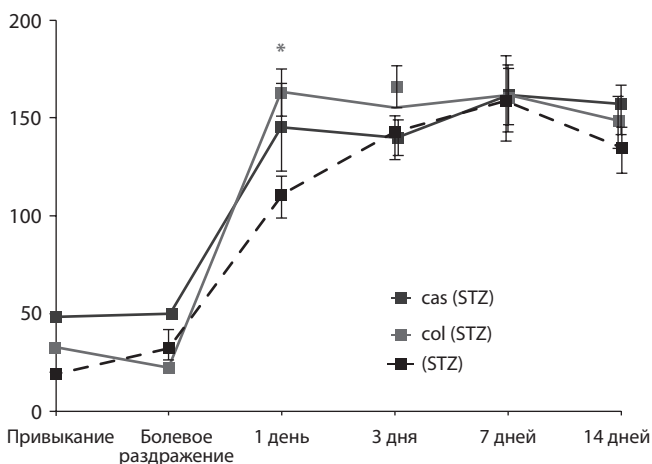
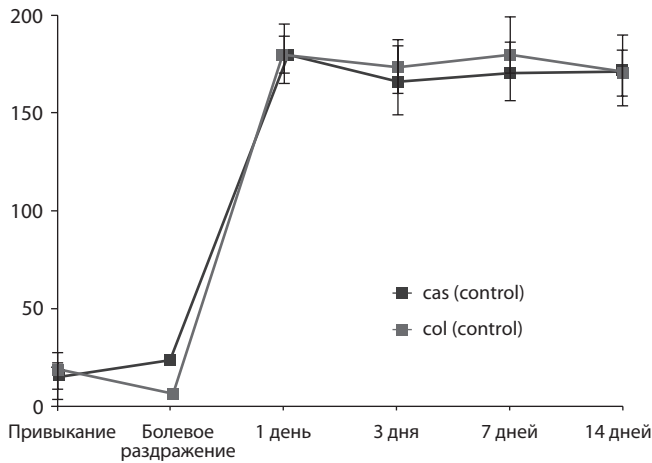


рис. 11: Величина ЛП перехода в темный отсек камеры при воспроизведении реакции УРПИ в модели со стрептозоцином.

По оси ординат – время в секундах; по оси абсцисс – дни эксперимента. Слева – ложнопериованные животные, справа – животные со стрептозоциновой моделью БА. cas(contr) – крысы группы 1, col(contr) – крысы группы 2, STZ – крысы группы 3, cas(STZ) – крысы группы 4, col(STZ) – крысы группы 5; цветные звездочки – различия достоверны по сравнению соответствующих по цвету групп с группой 3 при $p \leq 0,05$.

ЛП перехода крыс из освещенного отсека в темный, где крысы накануне получали болевое электрическое раздражение (рис. 11 сверху). Крысы опытных групп 4 и 5 заходили в темный отсек с большим ЛП на протяжении всех дней тестирования, однако достоверные различия в его величине наблюдались только у крыс групп 3 и 5 (рис. 11 справа). На рис. 12 отражено количество крыс, заходящих в темный отсек камеры, в процентах к общему количеству животных в группе. Можно видеть, что при тестировании через сутки и через 3 суток этот показатель сходен у крыс групп 3 и 4, а также у ложнопериованных крыс и крыс группы 5.

Результаты показывают, что введение β -казоморфина-7 и колострина как ложнопериованным животным, так и животным со стрептозоциновой моделью БА ведет к усилению условных реакций пассивного избегания. При этом введение колострина крысам с такой моделью вызвало, по-видимому, улучшение когнитивных функций, что выразилось не только в достоверном увеличении ЛП перехода в темный отсек камеры, но и в сближении поведения крыс данной группы с поведением ложнопериованных животных.

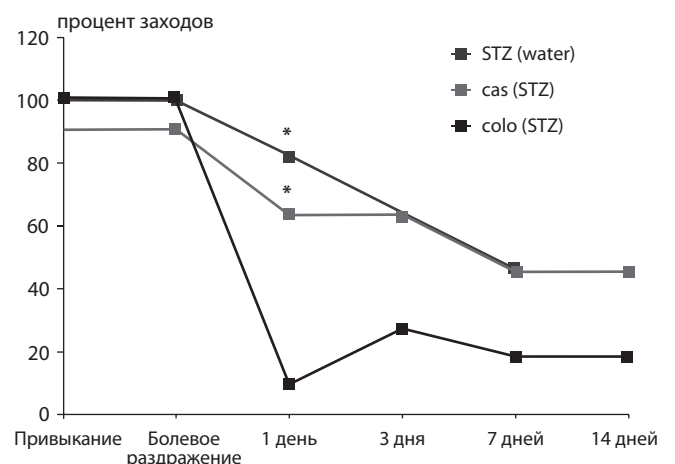
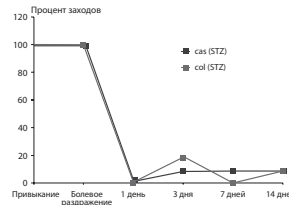


рис. 12: Доля животных, заходящих в темный отсек камеры УРПИ. По оси ординат – количество животных (в процентах) от общего количества крыс в группе. По оси абсцисс – дни эксперимента. Остальные обозначения – как на рис. 11.

На фоне проводимых экспериментов увеличение веса зафиксировано у крыс всех групп. При этом среди крыс с $A\beta$ -индуцированной БА у ложнопериованных животных увеличение веса составило около 9% от первого замера в обеих группах и было статистически значимым, тогда как среди крыс опытных групп животные группы 5 показали наименьшую прибавку веса. Среди животных со стрептозоциновой моделью БА, напротив, у ложнопериованных крыс увеличение веса было значительно меньшим, чем у крыс опытной группы. Можно предположить, что значительное увеличение веса у крыс со стрептозоциновой моделью БА связано с развитием диабета III типа, тогда как введение тестируемых пептидов таким животным препятствует излишнему набору веса.

Таким образом, введение β -казоморфина-7 и колострина оказало сходные эффекты на поведение и когнитивные функции крыс как с $A\beta$ -индуцированной, так и со стрептозоциновой моделью БА. Можно полагать, что данные пептидные препараты оказывает активирующее действие на двигательную активность животных, усиливают ориентировочные реакции, а также улучшают когнитивные функции у ложнопериованных крыс и у крыс опытной группы. Поскольку пептиды из состава колострина уже являются известными анти-альцгеймеровскими соеди-

нениями [10], показанные нами сопоставимые эффекты β -казоморфина-7 говорят о его серьезном потенциале для терапии БА. Это касается как различных видов двигательной активности таких животных, так и их когнитивных функций. Следует отметить, что колостринин действует преимущественно на модельных животных, тогда как β -казоморфин-7 — и на ложнопериоперированных, и на модельных. Вероятно, эффект β -казоморфина-7 менее специфичен и связан с общим нейротропным действием пептида, что может иметь важное значение и при тестировании на моделях других социально значимых заболеваний ЦНС.

Дальнейший подбор режимов введения и дозы препаратов, по-видимому, может привести к увеличению длительности их эффектов.

Предложенные экспериментальные подходы расширяют возможности изучения новых биологически активных веществ, направленных на профилактику и лечение нейродегенеративных заболеваний. Совокупность выявленных в настоящей работе эффектов пептидных соединений в экспериментальных моделях БА свидетельствует о целесообразности их изучения в клинической практике.

Список литературы

1. Дубынин В.А., Каменский А.А. Бета-казоморфины и их роль в регуляции поведения. М.: КМК, 2010.
2. Иллариошкин С.Н. Конформационные болезни мозга. М.: Янус-К, 2003.
3. Иллариошкин С.Н. Возрастные расстройства памяти и внимания: механизмы развития и возможности нейротрансмиттерной терапии. Неврол. журн. 2007; 2: 34–40.
4. Иллариошкин С.Н. Ранние (додементные) формы когнитивных расстройств. Consilium Med. 2007; 2: 107–111.
5. Маклакова А.С., Дубынин В.А., Левицкая Н.Г. и др. Поведенческие эффекты бета-казоморфина-7 и его дез-Туг аналогов. Бюл. эксперим. биол. мед. 1993; 8: 155–158.
6. Островская Р.У., Цапина А.П., Вахитова Ю.В. и др. Эффективность ноотропного и нейропротективного дипептида ноопепт на стрептозоциновой модели болезни Альцгеймера у крыс. Эксперим. и клинич. фармакол. 2009.
7. Ставровская А.В., Конорова И.Л., Иллариошкин С.Н. и др. Технологии моделирования заболеваний нервной системы. В кн.: Неврология XXI века: диагностические, лечебные и исследовательские технологии. Руководство для врачей. В 3-х т. (под ред. М.А. Пирадова, С.Н. Иллариошкина, М.М. Танащян). Т. III. Современные исследовательские технологии в экспериментальной неврологии. М.: АТМО, 2015: 73–133.
8. Сулина З.А., Иллариошкин С.Н., Пирадов М.А. Неврология и нейронауки — прогноз развития. Анн. клин. и эксперим. неврол. 2007; 1: 5–9.
9. Яхно Н.Н., Захаров В.В., Локшина А.Б. и др. Деменции. Руководство для врачей. М.: МЕДпресс-информ, 2010.
10. Януш М., Лисовски Ю., Дубовска-Инглот А. Колостринин и его применение. Патент РФ № 2217152 от 27.11.2003.
11. Chen S.-Y., Wright J.W., Barres C.D. The neurochemical and behavioral effects of β -amyloid peptide (25-35). Brain Res. 1996; 720: 54–60.
12. Chen Y., Liang Z., Blanchard J. et al. A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: Similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). Mol. Neurobiol. 2013; 47: 711–725.
13. Citron M. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. Nat. Rev. Neurosci. 2004; 5: 677–685.
14. Demetrius L., Magistretti P., Pellerin L. Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis and the inverse Warburg test. Front. Physiol. 2015; 5: 2–20.
15. Freude S., Schilbach K., Schubert M. The role of IGF-1 receptor and insulin receptor signaling for the pathogenesis of Alzheimer's disease: from model organisms to human disease. Curr. Alzheimer Res. 2009; 6: 213–223.
16. Giovannelli L., Casamenti F., Scali C. et al. Differential effects of amyloid peptides beta-(1-40) and beta-(25-35) injections into the rat nucleus basalis. Neuroscience. 1995; 66: 781–792.
17. Gotz J., Lars M.I. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. Neuroscience. 2008; 9: 532–544.
18. Iqbal K., Bolognin S., Wang X. et al. Animal models of the sporadic form of Alzheimer's disease: focus on the disease and not just the lesions. J. Alzheimers dis. 2013; 37: 469–474.
19. Ishrat T., Khan M.B., Hoda M.N., Yousuf S. Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. Behav. Brain Res. 2006; 171: 9–16.
20. Javed H., Khan M.M., Ahmad A., Vaibhav K. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. Neuroscience. 2012; 210: 340–352.
21. Lester-Coll N., Rivera E.J., Soscia S.J. et al. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. 2006; 9: 13–33.
22. Maurice T., Lockhart B., Privat A. Amnesia induced by centrally administered β -amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. Brain Res. 1996; 706: 181–193.
23. Maurice T., Su T.-P., Privat A. Sigma (σ 1) receptor agonists and neurosteroids attenuates β 25-35 amyloid-peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism. Neuroscience. 1998; 83: 413–428.
24. McDonald M.P., Dahl E.E., Overmier J.B. Effects of exogenous β -amyloid peptide on retention for spatial learning. Behav. Neural Biol. 1994; 62: 60–67.
25. Paxinos G., Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th edition. Academic Press, 1998.
26. Pepeu G., Giovannelli L., Casamenti F. et al. Amyloid β -peptides injection into the cholinergic nuclei: morphological, neurochemical and behavioural effects. Prog. Brain Res. 1996; 109: 273–282.
27. Prickaerts J., Fahrig T., Blokland A. Cognitive performance and biochemical markers in septum hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis. Behav. Brain Res. 1999; 102: 73–88.
28. Salkovic-Petrisic M., Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. J. Neural Transm. 2007 (Suppl.): 217–233.
29. Sienkiewicz-Szlapkaa E., Jarmolowska B., Krawczuka S. et al. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. Int. Dairy J. 2009; 19: 258–263.
30. Van Dam D., De Deyn P.-P. Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. Br. J. Pharmacol. 2011; 164: 1285–1300.
31. Yamada K., Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. Pharmacology & Therapeutics. 2000; 88: 93–163.
32. Yamaguchi H., Sugihara S., Ogawa A. et al. Diffuse plaques associated with astroglial amyloid beta protein, possibly showing a disappearing stage of senile plaques. Acta Neuropathol. 1998; 95: 217–222.

Evaluation of the effects of new peptide compounds in experimental animals with a toxic model of Alzheimer's disease

A.V. Stavrovskaya, N.G. Yamshchikova, A.S. Of'shanskiy, G.A. Babkin, S.N. Illarioshkin

Research Center of Neurology (Moscow); LLC Laktokor (Moscow)

Keywords: Alzheimer's disease, β -amyloid, streptozocin, neuroprotection, peptides, β -casomorphin-7, colostrinin.

Development of new approaches to the treatment of Alzheimer's disease (AD) is an actual problem of modern neurology owing to high prevalence of AD in the population and severe irreversible disability resulting from this disease. We investigated the effects of new peptide compounds, β -casomorphin-7 and colostrinin, in two complementary AD models in rats (with injection of β -amyloid into the nucleus basalis of Meynert and injection of streptozocin in the ventricles of the brain). Peptides were injected intranasally within 10 days after the onset of AD symptoms induced by neurotoxins. Injection of β -casomorphin-7 and colostrinin had similar effect on the behavior and cognitive

function of rats with both amyloid and streptozocin AD model: there was statistically significant increase in locomotor activity and orienting responses, as well as improvement of animals' cognitive functions. Colostrinin had stronger positive effect on the behavior of rats with induced AD, whereas β -casomorphin-7 had an effect on both sham-operated and model animals, which is indicative of the general neurotropic potential of this peptide. The proposed experimental approaches improve the capabilities of investigation of novel biologically active compounds aimed at prevention and treatment of neurodegenerative diseases.

Контактный адрес: Иллариошкин Сергей Николаевич – докт. мед. наук, проф., зам. директора по научной работе, рук. отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН. Москва 125367, Волоколамское ш., 80. E-mail: snillario@gmail.com;

Ставровская А.В. – зав. лаб. эксперим. патологии нервной системы отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН;

Ямщикова Н.Г. – вед. науч. сотр. лаб. эксперим. патологии нервной системы отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН;

Ольшанский А.С. – науч. сотр. лаб. эксперим. патологии нервной системы отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН;

Бабкин Г.А. – директор по науке ООО «Лактокор».