

ОПТИМАЛЬНАЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ДОЗА СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА НАЕЕ ПРИ МНОГОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ ЛИНИИ APP/PS1

С. А. Козин¹, Е. А. Лыскова², Р. Ю. Яковлев³, К. А. Мухина¹, А. Е. Соловьёва², Т. А. Шмиголь², А. А. Макаров¹, В. А. Митькевич^{1✉}

¹ Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

³ Общество с ограниченной ответственностью «Научный центр РТА», Москва Россия

Ранее в исследованной на животных модели болезни Альцгеймера была показана высокая эффективность использования синтетического пептида Ac-His-Ala-Glu-Glu-NH₂ (НАЕЕ) для подавления образования конгофильных амилоидных бляшек. Целью настоящей работы, выполненной в рамках доклинического исследования, было установить оптимальную терапевтическую дозу этого пептида при его использовании в качестве антиамилоидного средства в терапии данного заболевания. В качестве модельных животных были использованы трансгенные мыши линии APP/PS1, случайным образом распределенные по четырем экспериментальным группам и одной контрольной (по восемь самцов и восемь самок в каждой группе). Мышам из экспериментальных групп 1, 2, 3 и 4 дважды в неделю в течение девяти недель делали подкожные инъекции препаратов со следующими дозировками НАЕЕ: 0,18 мг/кг; 0,30 мг/кг; 1,50 мг/кг; 3,00 мг/кг. Мышам из контрольной группы вводили физиологический раствор. В гиппокампе всех животных окрашиванием красителем Конго красный определяли амилоидные бляшки. Анализ количества таких бляшек показал достоверное ($p < 0,001$) уменьшение их числа у мышей из экспериментальных групп (среднее число бляшек на один срез мозга составляло $7,5 \pm 2,1$, $3,2 \pm 0,9$, $3,1 \pm 0,6$ и $3,3 \pm 0,7$ для мышей из групп 1, 2, 3 и 4 соответственно) по сравнению с мышами из контрольной группы ($15,7 \pm 4,6$). Так как число бляшек в группах 2, 3 и 4 достоверно не изменялось, минимальная доза НАЕЕ, при которой наблюдается наименьшее число амилоидных бляшек у исследованных мышей, составляет 0,3 мг/кг, что приблизительно соответствует дозе 1,75 мг в пересчете на одного взрослого человека. Таким образом, экспериментально обосновано оптимальное значение терапевтической дозы НАЕЕ для клинических исследований.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, бета-амилоид, амилоидные бляшки, пептид НАЕЕ, доклинические испытания, трансгенные мыши линии APP/PS1, гистохимическое окрашивание, Конго красный, терапевтическая доза, болезнь-модифицирующая терапия

Финансирование: при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации, тема: Фармацевтическая разработка и доклинические исследования лекарственного средства пептидной структуры для лечения болезни Альцгеймера, 125022602911-9.

Благодарности: Е. В. Мячину, председателю кооператива «ВСЕ» (Москва, Россия), за предоставление лиофилизированного синтетического пептида НАЕЕ.

Вклад авторов: С. А. Козин — дизайн исследования, обзор литературы, подготовка рукописи; Е. А. Лыскова — экспериментальные исследования на мышах линии APP/PS1, проведение транскрипционной перфузии, гистохимический анализ; Р. Ю. Яковлев — входной анализ образцов синтетического пептида НАЕЕ; К. А. Мухина, А. Е. Соловьёва, Т. А. Шмиголь — экспериментальные исследования на мышах линии APP/PS1, приготовление срезов мозга, получение изображений на флуоресцентном микроскопе и анализ; А. А. Макаров, В. А. Митькевич — дизайн исследования, подготовка рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ИМБ им. В. А. Энгельгардта РАН (протокол № 3 от 11 сентября 2025 г.) и проведено в соответствии с правилами работы с лабораторными животными.

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Александрович Митькевич
ул. Вавилова, д. 32, г. Москва, 119991; mitkevich@eimb.ru

Статья получена: 09.12.2025 **Статья принята к печати:** 19.01.2026 **Опубликована онлайн:** 04.02.2026

DOI: 10.24075/vrgmu.2026.006

Авторские права: © 2026 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

OPTIMAL HAAE SYNTHETIC PEPTIDE THERAPEUTIC DOSE WITH REPEATED ADMINISTRATION TO APP/PS1 MICE

Kozin SA¹, Lysikova EA², Yakovlev RYu³, Mukhina KA¹, Soloveva AE², Shmigol TA², Makarov AA¹, Mitkevich VA^{1✉}

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Scientific Centre RTA LLC, Moscow, Russia

High efficacy of the synthetic Ac-His-Ala-Glu-Glu-NH₂ (HAAE) peptide in suppression of the congophilic amyloid plaque formation was earlier shown in the animal model of Alzheimer's disease. The study conducted as part of the pre-clinical trial aimed to determine the optimal therapeutic dose of this peptide when used as an anti-amyloid agent for treatment of this disorder. The APP/PS1 transgenic mice randomized into four experimental groups and one control group (eight males and eight females per group) were used as model animals. Mice of experimental groups 1, 2, 3, and 4 twice a week throughout eight weeks received subcutaneous injections of drugs with the following HAAE dosage: 0.18 mg/kg, 0.30 mg/kg, 1.50 mg/kg, 3.00 mg/kg. Mice of the control group were administered saline. The Congo red stain was used to determine amyloid plaques in the hippocampus of all animals. Quantification of such plaques showed a significant ($p < 0.001$) decrease in the number of plaques in mice of experimental groups (the average plaque number per brain slice was 7.5 ± 2.1 , 3.2 ± 0.9 , 3.1 ± 0.6 , and 3.3 ± 0.7 in mice of groups 1, 2, 3, and 4, respectively) compared to control mice (15.7 ± 4.6). Since the number of plaques in groups 2, 3, and 4 did not change significantly, the minimal HAAE dose, with which the lowest number of amyloid plaques is observed in the studied mice, is 0.3 mg/kg. This is roughly equivalent to the dose of 1.75 mg in terms of one adult human. Thus, the optimal therapeutic HAAE dose for clinical trials has been experimentally substantiated.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid-beta, amyloid plaques, HAAE peptide, preclinical trials, APP/PS1 transgenic mice, histochemical staining, Congo red, therapeutic dose, disease-modifying therapy

Funding: the study was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation, topic: Pharmaceutical Development and Preclinical Trials of the Peptide Drug for Treatment of Alzheimer's Disease, 125022602911-9.

Acknowledgements: the authors would like to express their gratitude to E.V. Myachin, Chairman of the VSE Cooperative (Moscow, Russia), for providing the HAAE lyophilized synthetic peptide.

Author contribution: Kozin SA — study design, literature review, manuscript writing; Lysikova EA — experimental research involving APP/PS1 mice, проведение транскрипционной перфузии, гистохимический анализ; Yakovlev RYu — analysis of the input HAAE synthetic peptide samples; Mukhina KA, Soloveva AE, Shmigol TA — experimental research involving APP/PS1 mice, preparation of brain slices, fluorescence microscopy image acquisition and analysis; Makarov AA, Mitkevich VA — study design, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS (protocol No. 3 dated 11 September 2025) and conducted in accordance with guidelines for working with laboratory animals.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir A. Mitkevich
Vavilova, 32, Moscow, 119991; mitkevich@eimb.ru

Received: 09.12.2025 **Accepted:** 19.01.2026 **Published online:** 04.02.2026

DOI: 10.24075/brsmu.2026.006

Copyright: © 2026 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Болезнь Альцгеймера (БА) является самым распространенным нейродегенеративным заболеванием и самой частой причиной деменции у пожилых людей во всем мире [1]. Согласно статистическим данным, число пациентов с БА в России составляет 1,5–2 млн человек [2].

Одним из основных патоморфологических признаков БА является наличие в головном мозге внеклеточных фибриллярных агрегатов, или амилоидных бляшек, которые при окрашивании красителем Конго красным дают характерный сигнал [3]. Главными компонентами амилоидных бляшек являются агрегированные формы бета-амилоида (A β) [4]. Бета-амилоид представляет собой короткий полипептид (длиной 37–43 аминокислотных остатков), который в виде мономеров присутствует в крови и спинномозговой жидкости человека в низких наномолярных концентрациях [5]. Однако при патогенезе БА в головном мозге начинает по неизвестным причинам развиваться церебральный амилоидоз, т. е. инициируется патологический процесс, при котором мономерные молекулы A β превращаются сначала в растворимые олигомеры, а затем накапливаются в виде амилоидных бляшек в различных отделах мозга, но особенно — в гиппокампе [6]. Образование первых амилоидных бляшек в тканях мозга происходит за 10–20 лет до начала клинических проявлений БА, но именно агрегация A β инициирует дальнейшие патологические процессы БА, включая гиперфосфорилирование белка тау и нейродегенерацию [4]. Соответственно, поиск лекарственных кандидатов, нацеленных на разрушение амилоидных бляшек и/или предотвращение их образования, является ведущей стратегией при разработке болезнь-модифицирующей терапии БА [7].

В настоящее время в США официально зарегистрированы три моноклональных антитела к A β — адуканумаб, леканемаб и донанемаб [8–10] — для начала лечения на ранней стадии БА, включающей пациентов с легкими когнитивными нарушениями и легкой деменцией вследствие болезни Альцгеймера с диагностическим подтверждением на основе A β с помощью позитронно-эмиссионной томографии амилоида или биомаркеров спинномозговой жидкости. Эти новые методы лечения, изменяющие течение заболевания, действуют путем снижения уровня амилоидных бляшек в головном мозге и демонстрируют клинические преимущества антиамилоидной терапии [11].

Тем не менее, вследствие опасных побочных эффектов антител [12] продолжаются разработки лекарственных кандидатов из класса низкомолекулярных соединений, а также пептидов и пептидомиметиков в качестве молекулярных агентов, которые нацелены на специфическое связывание с различными участками аминокислотной последовательности A β [13].

В качестве потенциального антиамилоидного средства для болезнь-модифицирующей терапии БА был разработан синтетический пептид Ac-His-Ala-Glu-Glu-NH₂ (HAEE) (PubChem CID: 56971578) [14], который эффективно проходит из крови сквозь гематоэнцефалический барьер в ткани головного мозга [15]. Лекарственной мишенью для HAEE является участок 11-Glu-Val-His-His-14 (EVNH) A β , с которым HAEE образует межмолекулярный комплекс, стабилизированный ион-комплементарными взаимодействиями (обзор в [16]). Фрагмент EVNH был выбран в качестве лекарственной мишени потому, что представляет собой молекулярную детерминанту A β , которая обладает жесткой конформацией основной

полипептидной цепи и контролирует связывание A β с никотиновым ацетилхолиновым рецептором подтипа α 4 β 2, а также все цинк-зависимые взаимодействия A β [17, 18]. С учетом критической роли вышеупомянутых взаимодействий в патогенезе БА, ожидалось, что блокирование участка EVNH пептидом HAEE должно подавлять образование амилоидных бляшек *in vivo*. Действительно, в пилотных экспериментах с использованием в моделях БА трансгенных животных (мыши линии APP/PS1 и нематоды линии CL2120) была установлена высокая анти-амилоидная эффективность применения HAEE (обзор в [18]).

Таким образом, механизм анти-амилоидного действия HAEE основан на разрушении цинк-зависимых межмолекулярных интерфейсов в олигомерах и агрегатах бета-амилоида, а также в комплексах бета-амилоида с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами подтипа α 4 β 2 за счет избирательного связывания HAEE с аминокислотным участком 11-Glu-Val-His-His-14 бета-амилоида, что приводит к уменьшению количества агрегатов бета-амилоида в организме модельных животных.

В рамках проведения доклинических испытаний препарата HAEE в качестве потенциального анти-амилоидного средства для лечения БА целью настоящей работы было определить оптимальную терапевтическую дозу HAEE для эффективного ингибирования образования амилоидных бляшек в гиппокампе трансгенных мышей линии APP/PS1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные

Для проведения экспериментов использовали трансгенных мышей сублинии APP^{swe}/PS1^{dE9}/Blg [19]. Данная сублиния получена путем скрещивания трансгенных мышей линии B6;C3- Tg(APP^{swe},PSEN1^{dE9})85Dbo/Mmjax (#034829-JAX, JAX, Maine, USA), также известной под названием APP/PS1, с линейными мышами дикого типа C57Bl6J сублинии C57Bl6J/ChG (Институт физиологически активных веществ, Черноголовка, Россия). Трансгенные мыши линии APP/PS1 являются признанными модельными животными БА [18]. У таких животных, начиная с 4–6-месячного возраста, проявляются характерные когнитивные признаки патологии, подобной БА, и имеется значительное количество конгофильных амилоидных бляшек в специфических отделах мозга, включая гиппокамп и кортекс [20]. Экспериментальных животных содержали в беспатогенном виварии (Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта, Москва, Россия) в условиях, включающих стандартный рацион питания, свободный доступ к корму и воде, 12-часовой световой день, температуру окружающей среды от +22 до +24 °C и относительную влажность воздуха 50–65%. Процедуры разведения и контрольного генотипирования племенных животных проводили, как описано ранее [19].

Экспериментальные группы животных

Всего для экспериментов в настоящем исследовании было использовано 40 самцов и 40 самок мышей трансгенной линии APP/PS1. Животные были распределены случайным образом по пяти группам, каждая из которых включала 8 самцов и 8 самок (таблица). Возраст каждого животного на момент первой инъекции и эвтаназии составлял 5 и 7 месяцев соответственно. Мышам из группы 1 (контроль)

Таблица. Подавление образования конгофильных амилоидных бляшек в областях CA1, CA2, CA3 и зубчатой извилине гиппокампа трансгенных мышей линии APP/PS1 под действием многократных подкожных инъекций препаратов синтетического пептида Ac-His-Ala-Glu-Glu-NH₂ (HAEE), приготовленных в 125 мкл физиологического раствора и различающихся дозой вводимого пептида

Трансгенные мыши линии APP/PS1				Инъекция (препарат HAEE приготовлен в 125 мкл физиологического раствора)	Срезы мозга	Число конгофильных амилоидных бляшек (КАБ) на одном срезе мозга	Статистическая значимость
Группа	Число животных	Возраст при первой инъекции (месяцы)	Возраст при эвтаназии (месяцы)	Доза (мг/кг) вводимого синтетического пептида HAEE / общее число инъекций	Общее количество	В областях CA1, CA2, CA3 и зубчатой извилине гиппокампа (среднее ± SEM)	Относительно контроля (группа № 1)
№ 1, контроль	16	5	7	0 / 17	160	15,7 ± 4,6	–
№ 2	16	5	7	0,18 / 17	160	7,5 ± 2,1	$p < 0,001$
№ 3	16	5	7	0,30 / 17	160	3,2 ± 0,9	$p < 0,001$
№ 4	16	5	7	1,50 / 17	160	3,1 ± 0,6	$p < 0,001$
№ 5	16	5	7	3,00 / 17	160	3,3 ± 0,7	$p < 0,001$

вводили подкожно изотонический 0,9%-й раствор хлорида натрия (физиологический раствор). Мышам из групп 2–5 вводили раствор синтетического пептида HAEE в дозах 0,18 мг/кг, 0,30 мг/кг, 1,50 мг/кг и 3,00 мг/кг соответственно. Процедура эвтаназии была применена к семимесячным мышам.

Реагенты

Все химические вещества и растворители, использованные в данном исследовании, имели класс чистоты для ВЭЖХ или выше и были приобретены у компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури, США), если не указано иное. Лекарственный препарат «Тетрапептид Ac-His-Ala-Glu-Glu-NH₂, раствор для подкожного введения», 3,5 мг/мл (ПАО «Фармсинтез», Россия). Структура пептида HAEE была подтверждена с помощью спектроскопии ЯМР и тандемной масс-спектрометрии.

Приготовление препаратов синтетического HAEE для проведения инъекций

Препарат HAEE из исходной концентрации 3,5 мг/мл разбавляли стерильным изотоническим 0,9%-м раствором хлорида натрия до получения рабочей концентрации пептида, которая обеспечивала желаемую дозу препарата HAEE (например, 0,30 мг/кг) в 125 мкл объема разбавленного раствора. Для всех исследованных в настоящей работе дозировок HAEE общий объем одного инъекционного образца составлял 150 мкл, при этом каждому животному вводили 125 мкл этого образца.

Введение исследуемых препаратов экспериментальным животным

Трансгенным мышам из пяти экспериментальных групп исследуемые препараты (физиологический раствор или образцы с различными дозами пептида HAEE) вводили дважды в неделю в течение 9 недель путем подкожных инъекций соответствующих препаратов согласно существующим требованиям и подходам к дозированию лекарственных средств лабораторным животным [21]. Периодичность и общее количество инъекций, проведенных в течение всего срока исследования мышам из экспериментальных групп, а также сведения о дозировках HAEE в инъекционных образцах для каждой такой группы представлены в таблице.

Приготовление гистологических препаратов срезов головного мозга

Транскардиальную перфузию 4%-м раствором параформальдегида в фосфатно-солевом буфере проводили животным после терминальной анестезии наркосом Avertin (Sigma Aldrich, Германия). Диссектированный мозг фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида в фосфатно-солевом буфере 12–16 ч. Дегидратацию тканей проводили в растворах этилового спирта с увеличивающейся концентрацией: 75% — 1 ч, три смены 95% по 5 мин, 100% — 15 мин, 100% — 45 мин, этанол-хлороформ (1 : 1) — 30 мин, хлороформ — 1 ч, хлороформ — 12–16 ч. Пропитку препаратов мозга парафином проводили при 60 °С в трех последовательных сменах парафина по 1 ч инкубации в каждом. Заливку тканей в парафиновые блоки осуществляли на приборе Leica EG1160 (Leica Microsystems, Германия). Серийные срезы головного мозга толщиной 8 мкм получали на микротоме Leica RM2265 (Leica Microsystems, Германия) и монтировали на предметные стекла с полилизинным покрытием. Депарафинизацию срезов проводили в ксилоле — две смены по 10 мин, регидратировали в этиловых спиртах: 100% — 5 мин, 90% — 5 мин, 75% — 5 мин, вода — 10 мин, окрашивали спиртовым 0,5%-м раствором красителя Конго красного — 5 мин, дифференцировали в 0,2%-м растворе КОН в 80%-м этиловом спирте, промывали препараты в деионизованной воде 10 мин. Для монтирования покровных стекол использовали среду Immu-Mount (Thermo Scientific).

Гистохимическое выявление конгофильных амилоидных бляшек в областях CA1, CA2, CA3 и зубчатой извилине гиппокампа

Для количественного определения конгофильных амилоидных бляшек в гиппокампе были использованы полученные срезы, охватывающие область мозга от 0,48 до 1,92 мм относительно средней линии в латеральных стереотаксических координатах [22]. Анализировали каждый 15-й срез, что давало 10 срезов на животное. Благодаря способности красителя Конго красный формировать флуоресцирующий комплекс с амилоидными фибриллами в составе амилоидных бляшек, детекцию конгофильных амилоидных бляшек проводили на конфокальном микроскопе LSM880 (Carl Zeiss, Германия) методом мозаичного сканирования отдельных

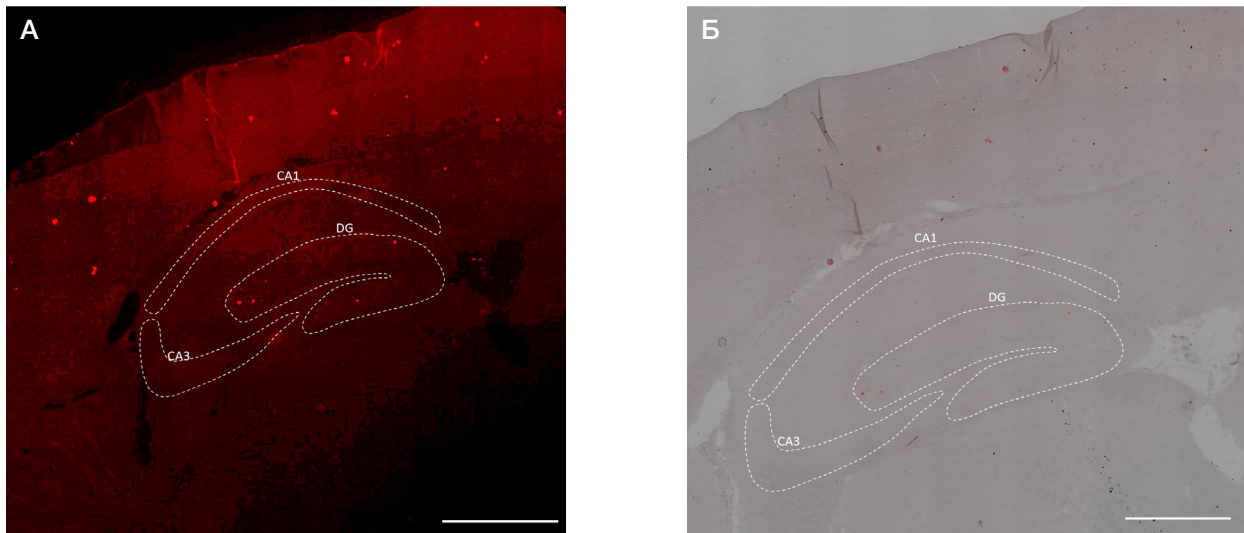


Рис. Конгофильные амилоидные бляшки на типичном срезе головного мозга интактной трансгенной мыши линии APP/PS1 в возрасте пять месяцев. **А.** Флуоресцентный сигнал после окрашивания красителем Конго красный. **Б.** Совмещенное изображение при флуоресценции Конго красного и в проходящем свете. Пунктирной линией обозначены зоны CA1, CA3 и DG (зубчатая извилина). Шкала — 500 мкм

областей гиппокампа при увеличении 10× в диапазоне спектра с пиком возбуждения 596 нм и эмиссией при 620 нм (рис. 1А). Для идентификации анатомических структур мозга полученное флуоресцентное изображение комбинировали с изображением в проходящем свете (рис. 1Б). Подсчитывали вручную все видимые конгофильные амилоидные бляшки любых размеров. Для каждой группы мышей рассчитывали средние значения и стандартное отклонение количества конгофильных амилоидных бляшек на один срез (таблица).

Статистические методы анализа данных

Данные были представлены как средние значения не менее трех независимых подсчетов числа амилоидных бляшек ± стандартная ошибка среднего (SEM). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. Для попарного сравнения исследуемых групп использовали критерий Манна–Уитни. Уровень значимости составил 99,9% ($p < 0,001$). Статистический анализ проводили с использованием программы STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рисунке представлено типичное изображение окрашенного красителем Конго красным среза мозга интактных пятимесячных трансгенных мышей линии APP/PS1. Конгофильные амилоидные бляшки (КАБ), визуализированные в мозге подопытных семимесячных животных из всех пяти экспериментальных групп после проведения инъекций, были схожи по локализации и распределению размеров в паренхиме мозга. Однако количественная оценка амилоидных бляшек выявила существенные различия между группами.

Данные о числе КАБ в областях CA1, CA2, CA3 и зубчатой извилине гиппокампа семимесячных трансгенных мышей линии APP/PS1 из экспериментальных групп 1–5 представлены в таблице. У контрольных животных из группы 1, которых не подвергали действию пептида НАЕЕ, число КАБ составляет $15,7 \pm 4,6$, что соответствует литературным данным для интактных трансгенных мышей линии APP/PS1 в семимесячном возрасте [23, 24].

У мышей из группы 2, которым многократно вводили начальную дозу НАЕЕ (0,18 мг/кг), число КАБ было равно $7,5 \pm 2,1$, т. е. по сравнению с контрольными мышами оно уменьшилось примерно в 2 раза. У мышей из группы 3, которые получали НАЕЕ в дозе 0,30 мг/кг, количество амилоидных бляшек существенно (более чем в 2 раза) уменьшилось по сравнению с мышами из группы 2 и было почти в 5 раз меньше, чем у контрольных животных. Дальнейшее увеличение дозы НАЕЕ в 5 и в 10 раз относительно дозы 0,30 мг/кг не приводило к изменению числа КАБ у животных из групп 4 и 5 по сравнению с мышами из группы 3.

Таким образом, в настоящем исследовании впервые определено, что доза 0,30 мг/кг является оптимальной для подавления образования КАБ у трансгенных мышей обоих полов линии APP/PS1 при многократном подкожном введении синтетического пептида НАЕЕ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании приведены и анализируются экспериментальные результаты о количествах конгофильных амилоидных бляшек на срезах выделенных областей мозга трансгенных мышей, т. е. амилоидных бляшек, выявленных только окрашиванием красителем Конго красным. Это классический метод визуализации именно фибриллярных амилоидных бляшек, которые являются главным нейроморфологическим признаком амилоидоза при патогенезе болезни Альцгеймера, он не учитывает возможное наличие в тканях мозга растворимых агрегатов и олигомеров бета-амилоида.

Способность пептида НАЕЕ подавлять образование амилоидных бляшек в трансгенных мышах линии APP/PS1, которые широко используют в качестве «животной» модели БА (обзор в [18]), уже была показана в ряде публикаций. Впервые такая способность была продемонстрирована в 2015 г. [24] на примере ограниченной выборки животных обоих полов ($n = 6$ и $n = 7$ в контрольной группе и в экспериментальной группе соответственно). Подопытным животным проводили внутривенные инъекции пептида НАЕЕ в дозе 1,13 мг/кг дважды в месяц в течение пяти месяцев, начиная с двухмесячного возраста (всего было сделано девять инъекций каждому животному).

Как следствие, у семимесячных трансгенных мышей под действием пептида НАЕЕ наблюдалось снижение числа конгофильных амилоидных бляшек в областях СА1, СА2, СА3 и зубчатой извилине гиппокампа на 60% по сравнению с контрольными животными. Далее, самцам трансгенных мышей линии APP/PS1 проводили внутривенные инъекции в дозе 0,05 мг/кг ежемесячно в течение пяти месяцев, начиная с двухмесячного возраста (всего было сделано шесть инъекций каждому животному) [25]. В гиппокампе восьмимесячных мышей, которым вводили препараты НАЕЕ, число конгофильных амилоидных бляшек ($24,7 \pm 3,4$ на одном срезе) оказалось на 22% меньше по сравнению с контрольными животными ($31,7 \pm 4,9$ на одном срезе). Наконец, недавно было показано, что как внутрибрюшинные, так и интраназальные инъекции синтетического НАЕЕ в дозе 50 мг/кг самцам трансгенных мышей линии APP/PS1 каждые 48 ч на протяжении полутора месяцев, начиная с шестимесячного возраста, приводили к уменьшению амилоидной нагрузки в тканях мозга у инъекцированных животных по сравнению с контрольными мышами. Эту нагрузку оценивали по площади видимой поверхности амилоидных бляшек в гиппокампе, и она уменьшалась в 4,7 и в 3,5 раза для внутрибрюшинного и интраназального путей введения соответственно [26].

Таким образом, эффективность применения синтетического НАЕЕ для подавления образования амилоидных бляшек в гиппокампе трансгенных мышей линии APP/PS1 ранее была показана как на самцах, так и на самках при внутривенном, внутрибрюшинном и интраназальном способах введения. Воздействие на мышей посредством НАЕЕ начинали как с возраста двух месяцев, когда у данных животных еще нет амилоидных включений в мозге, так и с шестимесячного возраста, когда в гиппокампе присутствует не менее пяти конгофильных амилоидных бляшек [23], а период введения изменялся от полутора до пяти месяцев, и интервалы между инъекциями составляли от двух до 30 суток.

В вышеупомянутых исследованиях дозы также варьировались в широком диапазоне от 0,05 до 50 мг/кг при различной частоте введения. Все эти различия в экспериментальных процедурах не позволяли сделать вывод о том, какая из использованных доз — 0,05 мг/кг, 1,13 мг/кг или 50,00 мг/кг — наиболее подходит в качестве терапевтической дозы для клинических испытаний. Очевидно, что доза 50,00 мг/кг является безопасной, но избыточна. В то же время доза 0,05 мг/кг кажется не такой эффективной, как 1,13 мг/кг.

Несмотря на вариативность вышеприведенных экспериментальных протоколов, представляется полностью обоснованным использование данных об изменении количества конгофильных амилоидных бляшек в областях СА1, СА2, СА3 и зубчатой извилине гиппокампа трансгенных мышей линии APP/PS1, подсчитанных по методике, описанной ранее [24], в качестве надежного критерия оценки антиамилоидной эффективности пептида НАЕЕ.

Известно, что в возрасте до семи месяцев нет существенных половых различий в развитии церебрального амилоидоза у трансгенных мышей линии APP/PS1 [27], поэтому в настоящей работе подкожные инъекции начинали делать пятимесячным животным обоих полов, а изъятие мозга для гистохимического анализа проводилось у семимесячных мышей. Инъекции делали дважды в неделю на протяжении девяти недель. Для тестирования были выбраны следующие четыре дозы синтетического

НАЕЕ: 0,18 мг/кг; 0,30 мг/кг; 1,50 мг/кг; 3,00 мг/кг. В результате тестирования было установлено, что под действием НАЕЕ число КАБ у инъекцированных мышей по сравнению с контрольными животными существенно снижалось при всех исследованных дозах. Однако число КАБ было примерно одинаковым при использовании доз 0,30 мг/кг, 1,50 мг/кг и 3,00 мг/кг. Факт, что повышение дозы 0,30 мг/кг и в пять, и в десять раз не вызывало усиления терапевтического эффекта (т. е. не вызывало уменьшения числа КАБ), свидетельствует о том, что при прочих равных экспериментальных условиях (период и частота инъекций, а также возраст мышей на момент начала инъекций) доза 0,30 мг/кг является необходимой и достаточной для оптимального подавления образования амилоидных бляшек в исследованной на животных модели БА. Доза 0,30 мг/кг приблизительно соответствует дозе 1,75 мг в пересчете на одного взрослого человека.

Известно, что у пятимесячных трансгенных мышей линии APP/PS1 амилоидные бляшки образуются в течение 24 ч [28], после чего эти бляшки находятся в динамическом равновесии с растворимыми олигомерами А β , и некоторые из таких олигомеров вследствие своих структурно-функциональных особенностей инициируют возникновение новых амилоидных бляшек [29]. Недавно на модельных животных было установлено, что механизм антиамилоидного действия НАЕЕ основан на способности этого пептида эффективно проходить из крови сквозь гематоэнцефалический барьер в ткани мозга и связываться с молекулами А β , которые присутствуют как в виде растворимых мономеров и олигомеров, так и в составе нерастворимых амилоидных бляшек, что обеспечивает быстрый вывод избыточных молекул А β из головного мозга [18, 30].

Полученные в настоящей работе данные о том, что повышение дозы свыше 0,30 мг/кг не приводит к усилению антиамилоидных эффектов пептида НАЕЕ, указывают на ограниченное количество лекарственных мишеней для НАЕЕ, т. е. данной дозы достаточно, чтобы молекулы НАЕЕ эффективно «счищали» с поверхности нейронов уже образовавшиеся амилоидные бляшки и препятствовали образованию растворимых олигомеров А β .

Выводы

Настоящее исследование позволило установить значение 0,30 мг/кг в качестве оптимальной терапевтической дозы синтетического пептида Ac-His-Ala-Glu-Glu-NH₂ (НАЕЕ) для эффективного подавления церебрального амилоидоза у мышей обоих полов трансгенной линии APP/PS1. Мышей данной линии широко применяют во всем мире как модельных животных при изучении патогенеза болезни Альцгеймера, поэтому научные результаты, полученные с использованием этой модели, рассматривают в качестве высоконадежных для трансляции в медицинскую практику. Таким образом, результаты исследования предоставляют научное обоснование применения многократных подкожных инъекций синтетического пептида НАЕЕ, приготовленного в 0,5 мл физиологического раствора в дозе 1,75 мг, для проведения клинических испытаний первой фазы. Безусловно, эффективность пептида НАЕЕ в качестве антиамилоидного средства для болезнь-модифицирующей терапии БА может быть доказана только в дальнейших клинических испытаниях, и полученные результаты — необходимый элемент для их успешного проведения.

Литература

- Livingston G, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The Lancet*. 2020; 396 (10248): 413–46.
- Михайлова Н. М. Организация внебольничной геронтопсихиатрической помощи при деменции и когнитивном снижении. Часть 1: Демографические сдвиги, создание клиники памяти и Альцгеймеровских центров. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2017; 117 (6): 111–19.
- Jagust W, et al. “Alzheimer's disease” is neither “Alzheimer's clinical syndrome” nor “dementia”. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*. 2019; 15 (1): 153–7.
- Hampel H, et al. The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Molecular Psychiatry*. 2021; 26 (10): 5481–03.
- Roher AE, et al. Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2009; 5 (1): 18–29.
- Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. 2019; 179 (2): 312–39.
- Cummings JL, et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2025. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*. 2025; 11 (2): e70098.
- Budd Haeberlein S, et al. Two Randomized Phase 3 Studies of Aducanumab in Early Alzheimer's Disease. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*. 2022; 9 (2): 197–210.
- Mintun MA, et al. Donanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2021; 384 (18): 1691–704.
- van Dyck CH, et al. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2023; 388 (1): 9–21.
- Hardy J, Mummery C. An anti-amyloid therapy works for Alzheimer's disease: why has it taken so long and what is next? *Brain*. 2023; 146 (4): 1240–2.
- Kepp KP, et al. The amyloid cascade hypothesis: an updated critical review. *Brain*. 2023; 146 (10): 3969–90.
- Wang C, et al. Advances in Alzheimer's Disease-Associated A β Therapy Based on Peptide. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24 (17): 13110.
- Козин С. А., и др. Пептид Ac-His-Ala-Glu-Glu-NH₂ и его производные, предназначенные для восстановления дефицита эндогенного компонента крови человека. Патент РФ №2826728. Официальный бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности (Роспатент) №26–2024, 11/09/2024–20/09/2024, 2024.
- Иванова А. В., et al. Сравнительная фармакокинетика и биораспределение пептидов HAEE и HASS. *Вестник РГМУ*. 2025 (4): 50–56.
- Козин С. А. Роль взаимодействий цинка и бета-амилоида в патогенезе болезни Альцгеймера. *Успехи биологической химии*. 2023; 63: 149–74.
- Никольский К. С., и др. Исследование интерфейса связывания бета-амилоида с кандидатным маркером нейродегенеративных заболеваний. *Математическая биология и биоинформатика*. 2025; 20 (1): 212–35.
- Kozin SA, et al. Switching On/Off Amyloid Plaque Formation in Transgenic Animal Models of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25 (1): 72.
- Лысикова Е. А., и др. Линия трансгенных мышей APP^{swe}/PS1^{dE9}/Blg для моделирования церебрального амилоидоза при болезни Альцгеймера. *Молекулярная биология*. 2023; 57 (1): 85–94.
- Jankowsky JL, et al. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng*. 2001; 17 (6): 157–65.
- Рыбакова А. В., и др. Существующие требования и подходы к дозированию лекарственных средств лабораторным животным. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018; 8 (4): 207–17.
- Paxinos G, Franklin KBJ. *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th ed. Elsevier Academic Press, 2013.
- Garcia-Alloza M, et al., Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiology of Disease*. 2006; 24 (3): 516–24.
- Tsvetkov PO, et al. Peripherally Applied Synthetic Tetrapeptides HAEE and RADD Slow Down the Development of Cerebral β -Amyloidosis in A β PP/PS1 Transgenic Mice. *J Alzheimers Dis*. 2015; 46 (4): 849–53.
- Козин С. А. Цинковый комплекс пептида HAEE для лечения нейродегенеративных заболеваний. Патент РФ №2784319. Официальный бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности (Роспатент) № 33–2022, 21/11/2022–27/11/2022, 2022.
- Patrakhonov E. Effectiveness of the tetrapeptide HAEE: an innovative approach to Alzheimer's treatment in experimentation. *Research Results in Pharmacology*. 2024; 10 (4): 107–11.
- Kuzubova E, et al. Sex-Dependent Phenotypic and Histomorphometric Biomarkers in the APP^{swe}/PS1^{dE9}/Blg Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Brain Sciences*. 2025; 15 (11): 1237.
- Meyer-Luehmann M, et al. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2008; 451 (7179): 720–4.
- Nirmalraj PN, Bhattacharya S, Thompson D. Accelerated Alzheimer's A β -42 secondary nucleation chronologically visualized on fibril surfaces. *Science Advances*. 2024; 10 (43): eadp5059.
- Mukhina KA, et al. The Tetrapeptide HAEE Promotes Amyloid-Beta Clearance from the Brain. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025; 26 (23): 11591.

References

- Livingston G, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The Lancet*. 2020; 396 (10248): 413–46.
- Mihajlova NM. Organizaciya vnebol'nicnoj gerontopsihiatricheskoj pomoshchi pri demencii i kognitivnom snizhenii. CHast' 1: Demograficheskie sdvigi, sozdanie kliniki pamyati i Al'cgejmerovskih centrov. *ZHurnal nevrologii i psihiatrii im. S. S. Korsakova*. 2017; 117 (6): 111–19. Russian.
- Jagust W, et al. “Alzheimer's disease” is neither “Alzheimer's clinical syndrome” nor “dementia”. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*. 2019; 15 (1): 153–7.
- Hampel H, et al. The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Molecular Psychiatry*. 2021; 26 (10): 5481–03.
- Roher AE, et al. Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2009; 5 (1): 18–29.
- Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. 2019; 179 (2): 312–39.
- Cummings JL, et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2025. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*. 2025; 11 (2): e70098.
- Budd Haeberlein S, et al. Two Randomized Phase 3 Studies of Aducanumab in Early Alzheimer's Disease. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*. 2022; 9 (2): 197–210.
- Mintun MA, et al. Donanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2021; 384 (18): 1691–704.
- van Dyck CH, et al. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2023; 388 (1): 9–21.
- Hardy J, Mummery C. An anti-amyloid therapy works for Alzheimer's disease: why has it taken so long and what is next? *Brain*. 2023; 146 (4): 1240–2.
- Kepp KP, et al. The amyloid cascade hypothesis: an updated critical review. *Brain*. 2023; 146 (10): 3969–90.
- Wang C, et al. Advances in Alzheimer's Disease-Associated A β Therapy Based on Peptide. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24 (17): 13110.

14. Kozin SA, i dr. Peptid Ac-His-Ala-Glu-Glu-NH₂ i ego proizvodnye, prednaznachennye dlya vosstanovleniya deficita endogenogo komponenta krovi cheloveka. Patent RF №2826728. Oficial'nyj byulleten' Federal'noj sluzhby po intellektual'noj sobstvennosti (Rospatent) №26–2024, 11/09/2024–20/09/2024, 2024. Russian.
15. Ivanova AV, et al. Comparative pharmacokinetics and biodistribution of HAEE and HASS peptides. *Bulletin of RSMU*. 2025 (4): 45–50.
16. Kozin SA. Rol' vzaimodejstvija cinka i beta-amiloida v patogeneze bolezni Al'cgejmery. *Uspekhi biologicheskoy himii*. 2023; 63: 149–74. Russian.
17. Nikolskij KS, i dr. Issledovanie interfejsa svyazyvaniya beta-amiloida s kandidatnym markerom nejrodegenerativnyh zabolevanij. *Matematicheskaya biologiya i bioinformatika*. 2025; 20 (1): 212–35. Russian.
18. Kozin SA, et al. Switching On/Off Amyloid Plaque Formation in Transgenic Animal Models of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25 (1): 72.
19. Lysikova EA, i dr. Liniya transgenykh myshej APP^{swe}/PS1^{dE9}/Blg dlya modelirovaniya cerebral'nogo amiloidoza pri bolezni Al'cgejmery. *Molekulyarnaya biologiya*. 2023; 57 (1): 85–94. Russian.
20. Jankowsky JL, et al. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng*. 2001; 17 (6): 157–65.
21. Rybakova AV, i dr. Sushchestvuyushchie trebovaniya i podhody k dozirovaniyu lekarstvennykh sredstv laboratornym zivotnym. *Vedomosti Nauchnogo centra ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya*. 2018; 8 (4): 207–17. Russian.
22. Paxinos G, Franklin KBJ. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 4th ed. Elsevier Academic Press, 2013.
23. Garcia-Alloza M, et al., Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiology of Disease*. 2006; 24 (3): 516–24.
24. Tsvetkov PO, et al. Peripherally Applied Synthetic Tetrapeptides HAEE and RADD Slow Down the Development of Cerebral β -Amyloidosis in A β PP/PS1 Transgenic Mice. *J Alzheimers Dis*. 2015; 46 (4): 849–53.
25. Kozin SA. Cinkovyj kompleks peptida HAEE dlya lecheniya nejrodegenerativnyh zabolevanij. Patent RF №2784319. Oficial'nyj byulleten' Federal'noj sluzhby po intellektual'noj sobstvennosti (Rospatent), № 33–2022, 21/11/2022–27/11/2022, 2022. Russian.
26. Patrakhanov E. Effectiveness of the tetrapeptide HAEE: an innovative approach to Alzheimer's treatment in experimentation. *Research Results in Pharmacology*. 2024; 10 (4): 107–11.
27. Kuzubova E, et al. Sex-Dependent Phenotypic and Histomorphometric Biomarkers in the APP^{swe}/PS1^{dE9}/Blg Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Brain Sciences*. 2025; 15 (11): 1237.
28. Meyer-Luehmann M, et al. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2008; 451 (7179): 720–4.
29. Nirmalraj PN, Bhattacharya S, Thompson D. Accelerated Alzheimer's A β -42 secondary nucleation chronologically visualized on fibril surfaces. *Science Advances*. 2024; 10 (43): eadp5059.
30. Mukhina KA, et al. The Tetrapeptide HAEE Promotes Amyloid-Beta Clearance from the Brain. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025; 26 (23): 11591.