

## ИССЛЕДОВАНИЕ *in vitro* НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ НОВОГО ОРИГИНАЛЬНОГО МИМЕТИКА ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ ЧЕЛОВЕКА ГК-2 (h)

Т. А. Антипова, С. В. Николаев, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин<sup>1</sup>

Миметик фактора роста нервов человека гексаметилендиамид бис(моносукцинил-глицил-лизина) ГК-2(h) обладает цитопротекторной активностью в концентрациях до  $10^{-13}$  М включительно на культуре иммортализованных нейронов гиппокампа мыши линии HT-22 при добавлении перекиси водорода и в концентрациях до  $10^{-8}$  М при добавлении глутаминовой кислоты. В концентрации до  $10^{-7}$  М дипептид защищает клетки феохромоцитомы крысы линии PC12 и до  $10^{-8}$  М — клетки нейробластомы человека линии SH-SY5Y от 6-гидроксидофамина.

**Ключевые слова:** низкомолекулярный миметик NGF человека — ГК-2 (h); нейропротекция; окислительный стресс; глутаматная токсичность; МФТП; 6-гидроксидофамин

### ВВЕДЕНИЕ

В литературе имеются многочисленные указания на то, что фактор роста нервов (NGF) вовлечен в патогенез нейродегенеративных заболеваний и перспективен для заместительной терапии [6, 11]. Однако внедрение в клиническую практику NGF затруднительно ввиду низкой биодоступности, плейотропности и ряда побочных эффектов [4]. В связи с этим предпринимаются попытки создания его низкомолекулярных пептидных и непептидных миметиков [5, 8]. В НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН был синтезирован димерный дипептидный миметик 4-й петли NGF крысы ГК-2 [3] и исследовано его нейропротекторное действие *in vitro* на моделях окислительного стресса, глутаматной токсичности и индуцированного 6-гидроксидофамином повреждения нейронов [1, 2]. Результаты исследований показали наличие у препарата нейропротекторной активности, проявляемой в наномолярных концентрациях и сходной с активностью самого NGF. Однако в связи с тем что аминокислотная последовательность 4-й петли NGF человека и крысы различается, применение ГК-2 крысы в терапии заболеваний человека может быть осложнено.

В связи с этим в НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН был синтезирован низкомолекулярный миметик 4-й петли NGF человека ГК-2 (h) [3]. Целью данной работы явилось выявление нейропротекторных свойств ГК-2 (h) в опытах на моделях окислительного стресса, глутаматной и 6-гидроксидофаминовой (6-ОНДА) токсичности с использованием культур клеток грызунов и человека.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пептидный миметик фактора роста нервов человека гексаметилендиамид бис(моносукцинил-глицил-лизина) ГК-2 (h) был синтезирован в отделе химии НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН. Бромид

3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) приобретен у фирмы Sigma.

Эксперименты проводили на культуре иммортализованных клеток гиппокампа мыши линии HT-22, на дофаминпозитивных клетках линии PC12 феохромоцитомы крысы и клетках нейробластомы человека линии SH-SY5Y.

Клетки линии HT-22 и PC12 рассеивали с плотностью 3,5 тыс. клеток в лунку в 96-луночные планшеты в среде DMEM (HyClone), содержащей 5 % телячьей эмбриональной сыворотки (FBS) (Invitrogen) и 2 mM L-глутамин (ICN). Клетки линии SH-SY5Y рассеивали с плотностью 10 тыс. клеток в лунку в 96-луночные планшеты в такой же среде, содержащей 15 % FBS. Все клетки инкубировали при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub> до образования монослоя.

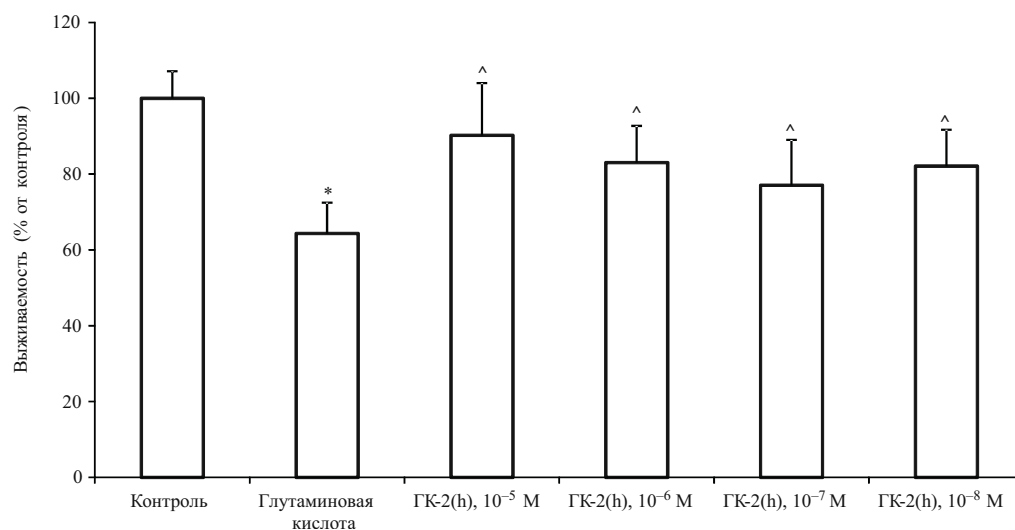
Для моделирования окислительного стресса использовали перекись водорода в конечной концентрации 1,5 mM [7]. Клетки HT-22 с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> инкубировали в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> 30 мин при 37 °С. Далее культуральную среду, содержащую H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, заменяли на стандартную и через 4 ч определяли жизнеспособность клеток.

Глутаматную токсичность моделировали путем внесения в культуральную среду глутаминовой кислоты (ICN) в конечной концентрации 5 mM. После инкубации в течение 24 ч при температуре 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub> среду меняли на нормальную и жизнеспособность клеток определяли через 24 ч [9, 12].

Для индукции 6-ОНДА повреждения в культуре клеток линии SH-SY5Y нейротоксин вносили в клеточную среду в конечной концентрации 100 mM и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С в 5 % CO<sub>2</sub>, жизнеспособность клеток определяли через следующие 24 ч [10].

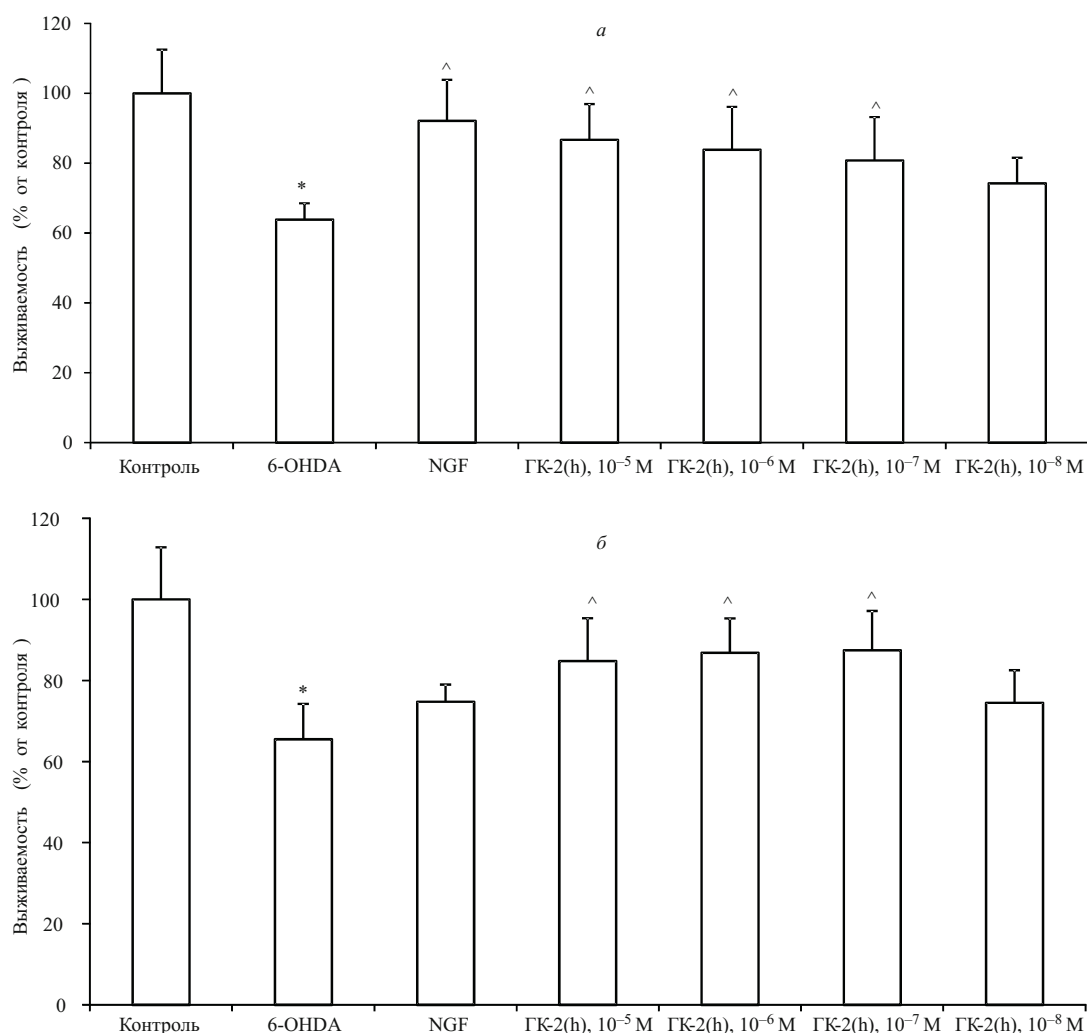
Пептид вносили за 24 ч до повреждения или сразу после отмывки перекиси водорода, глутаминовой кислоты или 6-ОНДА в конечных концентрациях  $10^{-5}$  М –  $10^{-14}$  М.

<sup>1</sup> ФГБУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.



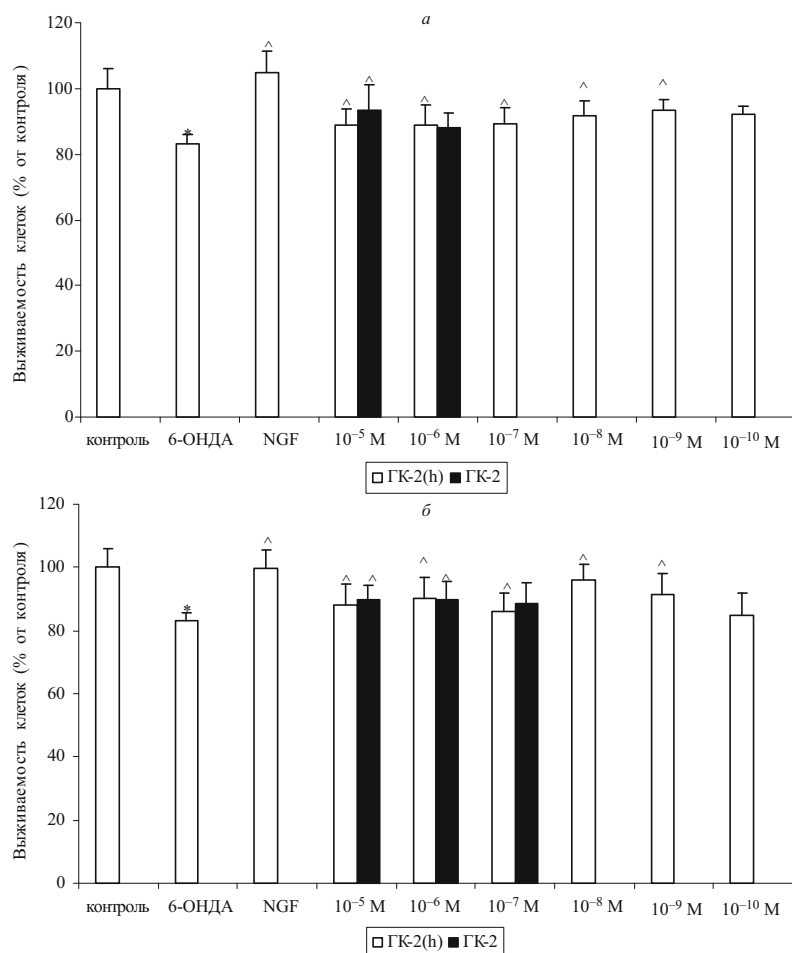
**Рис. 1.** Влияние GK-2(h) на жизнеспособность клеток линии HT-22 на модели глутаматной токсичности, результат МТТ-теста. Внесение GK-2(h) за 24 ч до повреждения.

Отличия достоверны: \* — от контроля,  $p < 0,05$ ; ^ — от показателей после инкубации с глутаминовой кислотой,  $p < 0,05$ .



**Рис. 2.** Влияние GK-2(h) на жизнеспособность клеток линии PC-12 при 6-гидроксидофамин-индуцированном повреждении. Внесение GK-2(h) за 24 ч до (а) и сразу после (б) отмывки повреждающего фактора (МТТ-тест).

Здесь и на рис. 3 отличия достоверны: \* — от контроля,  $p < 0,05$ ; ^ — от показателей после инкубации с 6-гидроксидофамином,  $p < 0,05$ .



**Рис. 3.** Влияние ГК-2(h) и ГК-2 на жизнеспособность клеток линии SH-SY5Y при 6-гидроксидофамин-индуцированном повреждении. Внесение ГК-2(h) и ГК-2 за 24 ч до повреждения ( $p < 0,05$ ) (а), внесение ГК-2(h) и ГК-2 после повреждения (МТТ-тест) (б).

Обозначения те же, что на рис. 2.

### Влияние различных концентраций ГК-2 (h) на жизнеспособность клеток линии НТ-22 на модели оксидативного стресса (МТТ-тест, $M \pm m$ )

Группа, $n = 12$	Выживаемость, % от контроля ( $p < 0,05$ )	
	За 24 ч до оксидативного стресса	После H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Контроль	100 ± 6,8	100 ± 6,9
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 1,5 мМ	67,0 ± 3,7*	67,9 ± 6,5*
NGF, 100 нг/мл (10 <sup>-9</sup> М)	84,0 ± 14,0 <sup>^</sup>	85,1 ± 13,2 <sup>^</sup>
ГК-2(h), 10 <sup>-5</sup> М	68,0 ± 5,1	77,4 ± 8,6
ГК-2(h), 10 <sup>-6</sup> М	81,5 ± 12,7 <sup>^</sup>	79,0 ± 9,3 <sup>^</sup>
ГК-2(h), 10 <sup>-7</sup> М	74,6 ± 7,2	82,2 ± 5,6 <sup>^</sup>
ГК-2(h), 10 <sup>-8</sup> М	87,5 ± 12,2 <sup>^</sup>	76,8 ± 8,3
ГК-2(h), 10 <sup>-9</sup> М	77,2 ± 7,6	86,7 ± 4,0 <sup>^</sup>
ГК-2(h), 10 <sup>-10</sup> М	85,1 ± 13,5	85,2 ± 8,1
ГК-2(h), 10 <sup>-11</sup> М	80,2 ± 7,7 <sup>^</sup>	92,8 ± 11,6 <sup>^</sup>
ГК-2(h), 10 <sup>-12</sup> М	78,3 ± 8,4	93,3 ± 14,2 <sup>^</sup>
ГК-2(h), 10 <sup>-13</sup> М	79,3 ± 6,0 <sup>^</sup>	
ГК-2(h), 10 <sup>-14</sup> М	72,0 ± 4,9	

**Примечание.** Отличия достоверны: \* — от контроля,  $p < 0,05$ ; ^ — от показателей после инкубации с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $p < 0,05$ .

Для определения жизнеспособности клеток использовали тест с МТТ (“Sigma”) [7]. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Multiscan EX (“Thermo”, Германия) при длине волны 600 нм.

Статистическую значимость различий между экспериментом и контролем определяли с использованием критерия Краскала-Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали, что ГК-2(h) обладает нейрорепротекторной активностью по отношению к повреждающим воздействиям, как на клетках грызунов, так и на клетках человека.

ГК-2 (h) защищает нейроны гиппокампа мыши линии НТ-22 от окислительного стресса, вызванного перекисью водорода. Эффект наблюдали при внесении ГК-2(h) концентрациях 10<sup>-6</sup> М – 10<sup>-13</sup> М сразу после повреждающего агента, а также и за 24 ч до него (таблица). Защитный эффект ГК-2 (h) в отношении глутаминовой кислоты проявлялся при внесении за 24 ч до

токсина в интервале концентраций  $10^{-5}$  М –  $10^{-8}$  М (рис. 1).

На дофаминпозитивных клетках феохромоцитомы крысы линии PC12 в условиях 6-ОНДА токсичности ГК-2 (h) проявлял нейропротекторное действие в концентрациях  $10^{-5}$  М –  $10^{-7}$  М в обеих схемах эксперимента (рис. 2).

Клетки нейробластомы человека линии SH-SY5Y ГК-2 (h) защищал от 6-ОНДА при внесении за 24 ч до токсина и после него в интервале концентраций от  $10^{-5}$  до  $10^{-9}$  М (рис. 3). Нами было показано, что миметик NGF крысы ГК-2 также обладает нейропротекторным действием на клетках человека SH-SY5Y (рис. 3). Отметим, что сходство нейротрофиноподобных эффектов *in vitro* на клетках животных миметиков, созданных на основе NGF человека и мыши, было описано в работе лаборатории Р. Леви-Монтальчини [5]. В наших опытах оказалось, что ГК-2 проявляет активность на клетках грызунов в наномолярных концентрациях, а на клетках человека — только в концентрации  $10^{-5}$  М.

На основании полученных данных можно сделать заключение о целесообразности дальнейших исследований ГК-2 (h) в опытах *in vitro* и *in vivo*.

## ВЫВОД

Миметик 4-й петли фактора роста нервов человека ГК-2 (h) в нано- и пикомолярной концентрациях обла-

дает нейропротекторной активностью на клеточных культурах грызунов и человека.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Антипова, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин, *Бюл. экпер. биол.*, **150**(11), 537 – 540 (2010).
2. Т. А. Гудашева, Т. А. Антипова, С. Б. Середенин, *Докл. РАН*, **434**(4), 549 – 552 (2010).
3. С. Б. Середенин, Т. А. Гудашева, Патент РФ № 2410392 (2010).
4. A. C. Altar, M. P. Vawter, S. D Ginsberg, *Neuropsychopharmacology*, **34**, 18 – 54 (2009).
5. A. M. Colangelo, M. R. Bianco, L. Vitagliano, et al., *J. Neurosci.*, **28**(11), 2698 – 2709 (2008).
6. D. Dawbarn, S. J. Allen, *Neuropathol Appl Neurobiol*, **29**(3), 211 – 230 (2003).
7. G. R. Jackson, E. L. Ezell, et al., *Brain Res.*, **592**(1), 239 – 248 (1992).
8. S. W. Jang, M. Okada, I. Sayeed, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **104**(41), 16329 – 16334 (2007).
9. J. F. R. Kerr, G. C. Gobe, C. M. Winterford, B. V. Harmon, *Methods Cell Biol*, **46**, 1 – 27 (1995).
10. K. Riveles, L. Z. Huang, M. Quik, *Neurotoxicology*, **29**(3), 421 – 427 (2008).
11. G. J. Siegel, N. B. Chauhan, *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **33**(2 – 3), 199 – 227 (2000).
12. S. Tan, M. Wood, P. Maher, *Neurochem.*, **71**(1), 95 – 105 (1998).

Поступила 25.09.13

## STUDYING *IN VITRO* NEUROPROTECTIVE PROPERTIES OF GK-2(h) – A NEW ORIGINAL MIMETIC OF HUMAN NERVE GROWTH FACTOR

T. A. Antipova, S. V. Nikolaev, T. A. Gudasheva, and S. B. Seredenin

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

Human nerve growth factor (NGF) mimetic hexamethylenediamide bis-(N-monosuccinyl-glycyl-L-lysine) (GK-2(h)) demonstrates protective activity on immortalized mouse hippocampal cell line HT22 in a concentration up to  $10^{-13}$  M against hydrogen peroxide toxicity and in concentration up to  $10^{-8}$  M against glutamate toxicity. GK-2(h) dipeptide protects rat PC-12 pheochromocytoma cells in a concentration up to  $10^{-7}$  M and protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells in a concentration up to  $10^{-8}$  M against 6-hydroxydopamine-induced damage.

**Keywords:** low-molecular-weight mimetic of human NGF (GK-2); neuroprotection; oxidative stress; glutamate toxicity; MPTP; 6-hydroxydopamine