

DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-12-8-12

## НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ДИПЕПТИДНЫХ МИМЕТИКОВ BDNF, ПО-РАЗНОМУ АКТИВИРУЮЩИХ СОПРЯЖЕННЫЕ С TRKB ПУТИ ТРАНСДУКЦИИ СИГНАЛА, В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

П. Ю. Поварнина<sup>1</sup>

На модели ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс, изучена нейропротекторная активность димерных дипептидных миметиков BDNF, отличающихся по активации PI3K/AKT и MAPK/ERK сигнальных путей. Обнаружены наиболее выраженные нейропротекторные свойства у дипептидного миметика 4 петли BDNF, активирующего PI3K/AKT и MAPK/ERK (снижение объема ишемического повреждения на 66 %). Миметик 1 петли BDNF, активирующий PI3K/AKT, также обладает нейропротекторной активностью, но менее выраженной (снижение объема повреждения на 28 %). Миметик 2 петли BDNF, активирующий MAPK/ERK, не оказывал нейропротекторного эффекта.

**Ключевые слова:** BDNF; PI3K/AKT; MAPK/ERK; димерные миметики; нейропротекция; инсульт; окклюзия средней мозговой артерии; крысы.

### ВВЕДЕНИЕ

Мозговой нейротрофический фактор (Brain-Derived Neurotrophic Factor — BDNF) — один из наиболее хорошо изученных представителей семейства нейротрофинов с его высоким терапевтическим потенциалом при ряде заболеваний центральной нервной системы, в частности церебральной ишемии [8]. Помимо нейропротекторных свойств, BDNF обладает нейрорегенеративной активностью, стимулируя нейрогенез и синаптогенез [19]. На ряде экспериментальных моделей церебральной ишемии на грызунах было показано, что BDNF снижает объем инфаркта мозга и способствует значительному улучшению неврологического статуса [8]. Содержание BDNF в плазме крови у больных в острую фазу инсульта коррелирует со степенью восстановления неврологических функций [22]. Однако, BDNF имеет серьезные ограничения для применения в клинике, основными из которых являются неудовлетворительные фармакокинетические свойства и плеiotропность, предполагающая риск развития нежелательных побочных эффектов. В литературе активно обсуждается возможность создания низкомолекулярных миметиков нейротрофина, обладающих эффектами полноразмерного белка и лишенных его недостатков [6]. Разработка таких соединений ведется в ряде лабораторий [10, 12].

Молекулярные механизмы влияния нейротрофинов реализуются их взаимодействием с высокоаффинными нейротрофиновыми Trk рецепторами, сопряженными с известными путями трансдукции сигнала — PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC $\gamma$ . В НИИ фармакологии имени В. В. Закусова на основе оригинальной гипоте-

зы [1] о том, что фармакофорными являются наиболее экспонированные участки петлеобразных структур нейротрофинов, чаще всего центральные участки их бета-изгибов, созданы димерные дипептидные миметики отдельных петель BDNF, которые в опытах *in vitro* продемонстрировали возможность неодинаковой активации сигнальных путей: гептаметилендиамид бис(N-моносулцинил-L-метионил-L-серина) (ГСБ-214) — миметик 1 петли, гексаметилендиамид бис(N-гексаноил-L-серил-L-лизина) (ГТС-201) — миметик 2 петли и гексаметилендиамид бис(N-моносулцинил-L-серил-L-лизина) (ГСБ-106) — миметик 4 петли [1, 4, 11] (Патент РФ № 2410392, 2013; Патент США US 9, 683,014, 2017; Патент КНР CN 102365294, 2016; Патент ЕПВ EP 2397488, 2019 (Великобритания, Германия, Франция, Швейцария)). Показано, что синтезированные соединения активировавшие *in vitro* TrkB рецепторы, имели разные паттерны воздействия на PI3K/AKT и MAPK/ERK каскадов [11]. ГСБ-106 активировал, подобно полноразмерному нейротрофину, PI3K/AKT и MAPK/ERK [11]; ГСБ-214 (1 петля) — преимущественно PI3K/AKT [11], а ГСБ-201 (2 петля) — MAPK/ERK [4]. Все изученные миметики активировали PLC $\gamma$  — сигнальный каскад [2].

Таким образом, сконструированные миметики BDNF являются уникальными молекулярными инструментами для анализа вовлеченности отдельных сигнальных путей в физиологические эффекты, опосредуемые TrkB рецепторами, что одновременно определяет целесообразность выявления их потенциала для фармакотерапии ишемического инсульта.

Целью данной работы было сравнительное изучение нейропротекторной активности димерных дипептидных миметиков BDNF на модели ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс.

<sup>1</sup> ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были проведены на 35 беспородных крысах-самцах массой 250–300 г на момент начала эксперимента, полученных в филиале “Андреевка” ФГБУН “НЦБМТ” ФМБА. Животных содержали в условиях вивария при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному гранулированному корму и воде. Организация и проведение работ осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01 апреля 2016 года “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики”. Содержали животных в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)”, утвержденными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 августа 2014 г. № 51. Эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях). Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова”.

Ишемический инсульт моделировали внутрисосудистым перекрытием средней мозговой артерии (МСаО — middle cerebral artery occlusion), что воспроизводит обширный ишемический инсульт, и позволяет регистрировать область инфаркта в бассейне средней мозговой артерии [16]. Модель хорошо стала общепринятой в экспериментальных исследованиях [17]. Все хирургические манипуляции осуществляли с помощью титановых микрохирургических инструментов. Крыс наркотизировали 5 % раствором хлоралгидрата (350 мг/кг, внутривентриально — в/в). Выполняли срединный разрез в области шеи и выделяли с правой стороны шеи сонный треугольник, образованный сверху двубрюшной мышцей, латерально-грудиноключично-сосцевидной мышцей и медиально — грудино-подъязычной мышцей. В сонном треугольнике выделяли сонный сосудисто-нервный пучок, образованный общей сонной артерией и блуждающим нервом. Осторожно отделяли блуждающий нерв и накладывали микрохирургическую сосудистую титановую клипсу на общую сонную артерию на 1,5 см ниже ее бифуркации. Выделяли из спаек наружную и внутреннюю сонные артерии. На внешнюю сонную артерию накладывали хлопчатобумажную нить, плотно затягивали. На внутреннюю сонную артерию накладывали викриловую нить, затягивали неплотно, после чего перерезали внешнюю сонную артерию проксимальнее наложения нити. Гепаринизированную нейлоновую нить диаметром 0,25 мм вводили через культю внешней сонной артерии во внутреннюю сонную артерию



Рис. 1. Схема эксперимента.

на глубину 19–21 мм (до перекрытия средней мозговой артерии) и фиксировали микрососудистой клипсой. Перекрытие кровотока осуществляли в течение 60 мин, после чего нить извлекали из сосуда, восстанавливая кровоснабжение в бассейне средней мозговой артерии. После извлечения нити культю внешней сонной артерии закрывали коагуляцией электрокаутером до полной герметичности. Ложнооперированные животные подвергались тем же процедурам, за исключением перерезания сосудов и введения нити. Срединный разрез шеи зашивали хлопчатобумажными нитями и обрабатывали стрептоцидом.

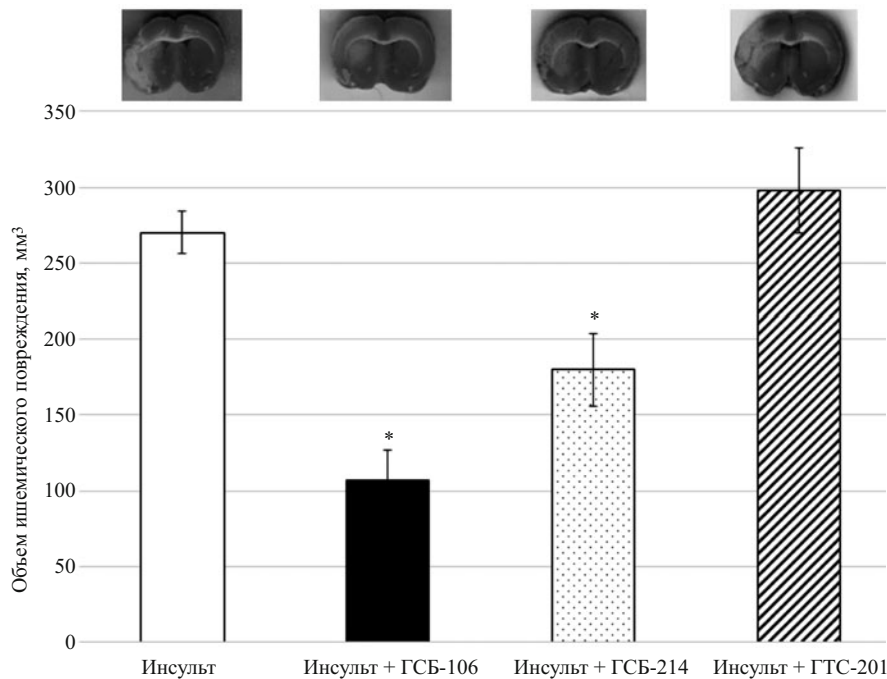
Оперированных крыс делили случайным образом на группы: животных, не получавших фармакологические вещества (ФВ) и животных, которым вводили в течение 7 дней ГСБ-106, ГСБ-214 или ГТС-201, разведенные в воде для инъекций. Дипептиды вводили в/б первый раз через 4 ч после операции и затем 1 раз в сутки. Ложнооперированные и оперированные животные без ФВ получали в том же режиме воду для инъекций. Экспериментальные группы состояли из 6–10 животных.

ГСБ-106 и ГСБ-214 вводили в дозе 0,1 мг/кг, в/б, ГТС-201 — в дозе 1,0 мг/кг, в/б. Дозы соединений выбраны исходя из результатов ранее проведенных исследований *in vitro* и *in vivo* [2–4]. На 3 и 6 сутки после операции оценивали неврологический дефицит. На 7 сутки животных декапитировали и определяли объем ишемического повреждения головного мозга.

Схема эксперимента приведена на рис. 1.

Неврологический дефицит оценивали в тесте стимуляции конечностей [14]. Оценивали ответы задних и передних конечностей на тактильную и проприоцептивную стимуляцию при 7 различных испытаниях для левой и правой стороны тела. Максимальное возможное суммарное количество баллов равно 14 для каждой стороны тела, что соответствует нормальному неврологическому статусу.

Объем ишемического повреждения регистрировали на 7-е сутки после операции анализом отсканированных изображений срезов мозга, окрашенных 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом (ТТХ) [7]. Для этого головной мозг извлекали, отмывали от крови в течение 1 мин в емкости с физиологическим раствором. Затем мозг замораживали при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 12 мин и с помощью специальной формы с пазами для



**Рис. 2.** Влияние миметиков 1 (ГСБ-214), 2 (ГСБ-201) и 4 (ГСБ-106) петель BDNF на объем инфаркта мозга при субхроническом (7 дней) введении (0,1 мг/кг, в/б) после моделирования ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс. Объем инфаркта мозга определяли с помощью морфометрии срезов, окрашенных ТТХ, на 7 сутки после операции. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. \*  $p < 0,05$  по сравнению с группой “инсульт” ( $U$ -тест Манна–Уитни).

точной резки и микротомных лезвий разрезали на 5 фронтальных срезов толщиной 1,7 мм. Срезы мозга помещали в чашку Петри с 2 % раствором ТТХ в фосфатно-солевом буфере и инкубировали в течение 15 мин при 37 °С. Затем срезы переворачивали и инкубировали еще 15 мин при 37 °С, после чего фиксировали в 10 % формалине в течение 30 мин. Затем срезы помещали на предметные стекла и сканировали с двух сторон с помощью планшетного сканера с разрешением 2400 dpi в режиме цветного изображения. Используя свободно распространяемую программу “Image J” (National Institute of Health, США), измеряли площадь инфаркта (неокрашенная область) и площадь всего среза.

Объем инфаркта определяли по формуле:

$$V = d \cdot \Sigma A_i / 2,$$

где  $\Sigma A_i$  — сумма площадей области повреждения на срезах мозга с каждой из сторон,  $d$  — толщина среза.

Статистическая обработка данных. Для оценки межгрупповых различий при сравнении двух групп использовали  $U$ -тест Манна – Уитни. Данные считались достоверными при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.

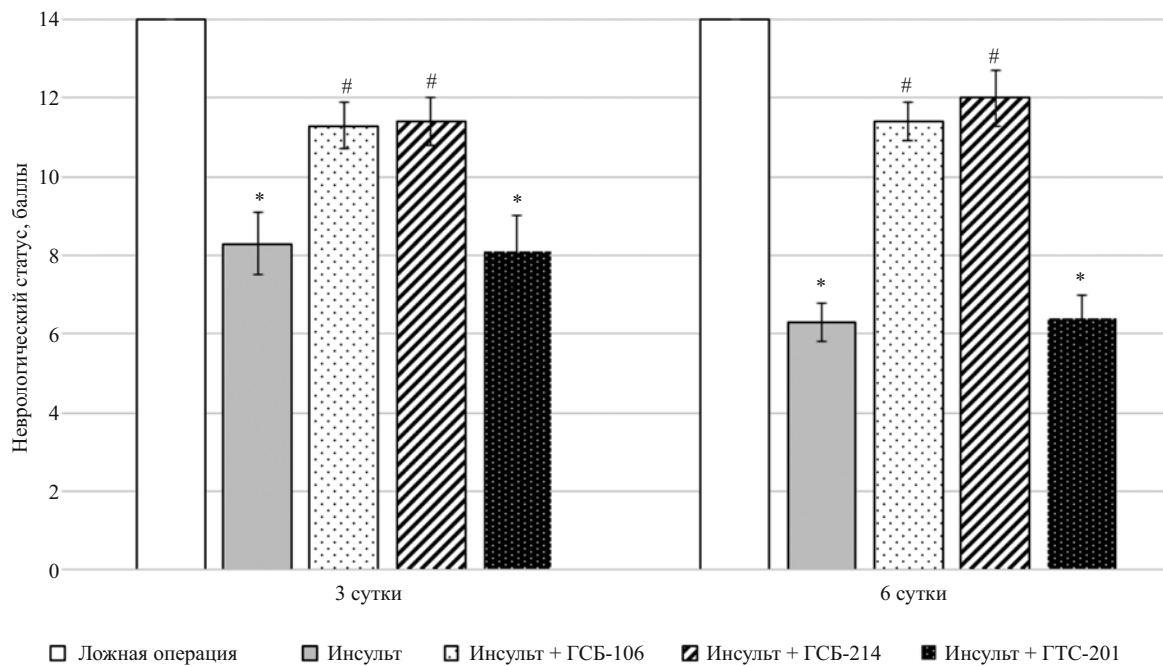
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У ишемизированных животных выявлена выраженная зона инфаркта в правом полушарии, захватывающая кору и полосатое тело, которая составляла в

среднем  $270 \pm 14$  мм<sup>3</sup>. Дипептиды ГСБ-106 и ГСБ-214 статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижали объем ишемического повреждения соответственно до  $107 \pm 14$  мм<sup>3</sup> (на 66 %) и  $180 \pm 14$  мм<sup>3</sup> (на 28 %) (рис. 2). ГТС-201 не вызывал снижения ишемического повреждения, даже несколько увеличивал его (до  $298 \pm 28$  мм<sup>3</sup>), хотя это увеличение не было статистически значимым (рис. 2).

В тесте стимулирования конечностей у ложнооперированных животных отсутствовал неврологический дефицит (14 баллов для каждой стороны тела на 3 и 6 сутки после операции). У ишемизированных животных наблюдался выраженный неврологический дефицит, что проявлялось в нарушении ответа на тактильную и проприоцептивную стимуляцию передней и задней левых конечностей (контралатеральных по отношению к повреждению) ( $8,3 \pm 0,8$  балла на 3 сутки и  $6,3 \pm 0,5$  балла на 6 сутки). По данному параметру ишемизированные животные статистически значимо ( $p < 0,05$ ) отличались от ложнооперированных в обеих точках измерения (рис. 3). ГСБ-106 и ГСБ-214 статистически значимо улучшали неврологический статус как на 3 (соответственно  $11,4 \pm 0,6$  и  $11,3 \pm 0,6$  баллов), так и на 6 сутки после операции (соответственно  $11,4 \pm 0,5$  и  $12,0 \pm 0,7$  баллов) (рис. 3). ГТС-201 не оказывал влияния на неврологический статус.

Таким образом, на модели ишемического инсульта у крыс нейропротекторную активность проявляли миметик 1 петли BDNF, активирующий PI3K/AKT, и ми-



**Рис. 3.** Влияние миметиков 1-й (ГСБ-214), 2-й (ГСБ-201) и 4-й (ГСБ-106) петель BDNF на неврологический статус крыс при субхроническом (7 дней) введении (0,1 мг/кг, в/б) после моделирования ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии. Неврологический статус оценивали в тесте стимулирования конечностей на 3-и и 6-е сутки после операции. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. \*  $p < 0,05$  по сравнению с группой “инсульт” (*U*-тест Манна-Уитни).

метик 4-й петли BDNF, активирующий PI3K/AKT и MAPK/ERK. Миметик 2-й петли, воздействующий на MAPK/ERK, был неактивен.

Хорошо известно, что PI3K/AKT сигнальный каскад ассоциирован с нейропротекцией [21], при этом роль MAPK/ERK каскада в выживаемости нейронов не однозначна. Согласно большинству литературных данных MAPK/ERK каскад также ассоциирован с нейропротекцией [21], однако показано, что данный каскад может опосредовать гибель нейронов в различных патологических условиях [15]. Более того, на ряде моделей церебральной ишемии выявлено, что ингибирование MAPK/ERK способствует уменьшению повреждения нервной ткани. Так, ингибитор MEK1 и MEK2 PD98059 снижал объем ишемического повреждения на 55 и 36 % соответственно через 22 и 72 ч после транзиторной окклюзии средней мозговой артерии у мышей при введении за 30 мин до моделирования ишемии [5]. Другой ингибитор MEK U0126 снижал на 40 % объем ишемического повреждения на модели транзиторной окклюзии средней мозговой артерии у мышей при введении за 10 мин до моделирования ишемии и более чем в 4 раза увеличивал выживаемость нейронов в зоне CA1 гиппокампа при введении за 10 мин до транзиторной окклюзии общих сонных артерий у песчанок [18]. Нейропротекторные и нейротоксические эффекты MAPK/ERK-сигналинга вероятно могут определяться разной динамикой активации [23]. В ряде работ показано, что при длительной активации MAPK/ERK повышается гибель клеток, в то

время как кратковременная активация каскада ассоциирована с протекторным действием. Так, на другой модели в экспериментах *ex vivo* кратковременная эстрадиол-индуцированная активация ERK в остеоцитах (фосфорилированные ERK определяются в цитоплазме в течение 30 мин, в ядре присутствуют в течение 2 ч) вызывала цитопротекторные эффекты; при этом длительная активация ERK в остеокластах (фосфорилированные ERK выявляются в цитоплазме и ядре в течение 24 ч) приводила к апоптозу [9]. Ингибирование длительной активации ERK устраняло токсическое влияние эстрадиола на остеокласты и наоборот, блокада экспорта ERK из ядра остеоцитов стимулировало апоптоз [9]. Важно, что в патологических условиях длительная активация MAPK/ERK может быть вызвана глутаматной эксайтотоксичностью, окислительным стрессом и другими патогенетическими факторами ишемического инсульта [13]. На модели церебральной ишемии у крыс с использованием ингибиторного анализа было установлено [23], что AKT подавляет активацию Raf-1/MAPK/ERK1/2 за счет фосфорилирования ингибирующего домена Raf-1. Следовательно, PI3K/AKT каскад способен регулировать переключение MAPK/ERK каскада с нейротоксических на нейропротекторные эффекты.

Согласно данным, полученным в настоящей работе, максимальная нейропротекторная активность миметиков BDNF в условиях экспериментального инсульта достигалась при одновременной активации MAPK/ERK и PI3K/AKT, что, по-видимому, в долж-

ной степени отражает физиологическое действие BDNF. Нейропротекторные эффекты достигались и при активации одного PI3K/AKT-пути, но были менее выраженными. Активация только MAPK/ERK миметиком 2 петли BDNF приводила к увеличению ишемического повреждения, хотя и статистически недостоверному. Последнее можно объяснить нейротоксическими эффектами активации MAPK/ERK в отсутствие ингибирующего эффекта PI3K/AKT. Интересно отметить, что проявление изученными дипептидными миметиками BDNF антидиабетической активности как *in vitro*, так и *in vivo* было сопряжено с активацией PI3K/AKT пути [20]. Миметик, влияющий только на MAPK/ERK, не обладал антидиабетическими свойствами [20].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что в условиях экспериментального ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс, максимальной активностью обладает дипептидный миметик 4 петли BDNF, активирующий PI3K/AKT и MAPK/ERK (снижение объема ишемического повреждения на 66 %,  $p \leq 0,05$ ). Активация PI3K/AKT миметиком 1 петли BDNF также обеспечивает нейропротекторную активность (снижение объема повреждения на 28 %,  $p \leq 0,05$ ). При активации MAPK/ERK миметиком 2 петли BDNF нейропротекторное действие отсутствует.

Работа была выполнена при поддержке РФФИ (проект № 18-015-00228).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Гудашева, А. В. Тарасюк, С. В. Помогайбои и др., *Био-орган. химия*, **38**(3), 280 – 290 (2012).
2. Т. А. Гудашева, И. О. Логвинов, С. В. Николаев, Т. А. Антипова и др., *Доклады Академии наук*, в печати (2020).
3. И. О. Логвинов, Т. А. Антипова, Т. А. Гудашева и др., *Бюл. эксперим. биол. мед.*, **155**(3), 319 – 322 (2013).

4. Н. М. Сазонова, А. В. Тарасюк, А. Н. Шумский и др., *Доклады Академии наук*, № 9, 14 – 21 (2018); doi: 10.30906/0023-1134-2018-52-9-14-21.
5. A. Alessandrini, S. Namura, M. A. Moskowitz, J. V. Bonventre, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**(22), 12866 – 12869 (1999); doi: 0.1073/pnas.96.22.12866.
6. A. E. Autry, L. M. Monteggia, *Pharmacol. Rev.*, **64**(2), 238 – 258(2012); doi: 10.1124/pr.111.005108.
7. B. Bederson, L. Pitts, S. Germano, et al., *Stroke*, **17**(6), 1304 – 1308(1986); doi: 10.1161/01.str.17.6.1304.
8. A. Chen, L.-J. Xiong, Y. Tong, M. Mao, *Biomed. Reports*, **1**(2), 167 – 176 (2013); doi: 10.3892/br.2012.48.
9. J. R. Chen, L. I. Plotkin, J. I. Aguirre, et al., *J. Biol. Chem.*, **280**(6), 4632 – 4638 (2005); doi: 10.1074/jbc.M411530200.
10. J. M. Fletcher, R. A. Hughes, *Bioorganic Med. Chem.*, **17**(7), 2695 – 2702 (2009); doi: 10.1016/j.bmc.2009.02.053.
11. T. A. Gudashева, S. B. Seredenin, *Mod. Approaches Drug Des.*, **2**(4), (2018); doi: 10.31031/MADD.2018.02.000541.
12. J. Han, J. Pollak, T. Yang, et al., *Stroke*, **43**(7), 1918 – 1924 (2012); doi: 10.1161/STROKEAHA.111.641878.
13. E. A. Irving, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **22**(6), 631 – 647 (2002); doi: 10.1097/00004647-200206000-00001.
14. J. Jolkkonen, K. Puurunen, S. Rantakomi, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **400**(2–3), 211 – 219 (2000); doi: 10.1016/s0014-2999(00)00409-x.
15. E. K. Kim, *Biochim. Biophys. Acta*, **1802**(4), 396 – 405 (2010); doi: 10.1016/j.bbadis.2009.12.009.
16. E. Z. Longa, P. R. Weinstein, S. Carlson, R. Cummins, *Stroke*, **20**(1), 84 – 91 (1989); doi: 10.1161/01.str.20.1.84.
17. L. D. McCullough, F. Liu, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2011**, 464701 – 464701 (2011); doi.org/10.1155/2011/464701.
18. S. Namura, K. Iihara, S. Takami, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **8**(20), 11569 – 11574 (2001); doi: 10.1073/pnas.181213498.
19. T. Numakawa, H. Odaka, N. Adachi, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**(11), 3650 (2018); doi: 10.3390/ijms19113650.
20. R. U. Ostrovskaya, S. S. Yagubova, T. A. Gudashева, S. B. Seredenin, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **164**(6), 734 – 737 (2018); doi: 10.1007/s10517-018-4069-y.
21. L. F. Reichardt, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **361**(1473), 1545 – 1564 (2006); doi: 10.1098/rstb.2006.1894.
22. T. M. Stanne, N. D. Aberg, S. Nilsson, et al., *Stroke*, **47**(7), 1943 – 1945 (2016); doi: 10.1161/STROKEAHA.115.012383.
23. J. Zhou, T. Du, B. Li, et al., *ASN Neuro*, **7**(5), (2015); doi: 10.1177/1759091415602463.

Поступила 04.06.20

## NEUROPROTECTIVE ACTIVITY OF DIPEPTIDE BDNF MIMETICS, WHICH DIFFERENTLY ACTIVATE TRKB-RELATED SIGNALING PATHWAYS UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ISCHEMIC STROKE

P. Yu. Povarnina

<sup>1</sup> V. V. Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

The neuroprotective activity of dimeric dipeptide BDNF mimetics, differing in the activation of PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling pathways, was studied on the model of ischemic stroke caused by transient occlusion of the middle cerebral artery in rats. The most pronounced neuroprotective properties were found in the dipeptide mimetic of BDNF loop 4 activating PI3K/AKT and MAPK/ERK (reduction of the volume of ischemic damage by 66%). The mimetic of BDNF loop 1 activating PI3K/AKT also exhibited neuroprotective activity, but it was less pronounced (decrease in damage by 28%). The mimetic of BDNF loop 2 activating MAPK/ERK did not show any neuroprotective effect.

**Keywords:** BDNF; PI3K/AKT; MAPK/ERK; dimeric mimetics; neuroprotection; ischemic stroke; middle cerebral artery occlusion.