

УДК 577.112.6:615.214.31

ПЕРВЫЙ ДИПЕПТИДНЫЙ МИМЕТИК НЕЙРОТРОФИНА-3: ДИЗАЙН И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

© 2022 г. Член-корреспондент РАН Т. А. Гудашева^{1,*}, Н. М. Сазонова¹, А. В. Тарасюк¹,
И. О. Логвинов¹, Т. А. Антипова¹, Д. М. Никифоров¹,
П. Ю. Поварнина¹, академик РАН С. Б. Середенин¹

Поступило 02.04.2022 г.
После доработки 04.05.2022 г.
Принято к публикации 04.05.2022 г.

На основе структуры экспонированного участка 4-й петли нейротрофина-3 создан его димерный дипептидный миметик, гексаметилендиамид *бис*-(*N*-моносукцинил-*L*-аспарагинил-*L*-аспарагина) (ГТС-301). Новое соединение сходно с полноразмерным нейротрофином, активировало рецепторы TrkC и TrkB. У ГТС-301 выявлена нейропротекторная активность в экспериментах на клетках гиппокампа мыши NT-22 в условиях окислительного стресса и глутаматной токсичности в концентрациях 10^{-12} и 10^{-8} М соответственно и антидепрессантоподобная активность в тесте вынужденного плавания на мышах при 7-дневном внутрибрюшинном введении в дозах 10–40 мг/кг.

Ключевые слова: нейротрофин-3, миметик, дипептид ГТС-301, Trk-рецепторы, нейропротекторная активность, антидепрессивная активность

DOI: 10.31857/S2686738922040059

Нейротрофин-3 (NT-3), наряду с фактором роста нервов (NGF) и мозговым нейротрофическим фактором (BDNF), играет важную роль в регуляции пролиферации, дифференцировки, миелинизации, поддержании жизнеспособности и фенотипической стабильности нейронов. В отличие от других нейротрофинов, NT-3 взаимодействует со всеми типами Trk рецепторов, активируя преимущественно TrkC, с меньшей аффинностью TrkB и с еще более низкой – TrkA [1]. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале NT-3 для лечения неврологических и психических нарушений, таких как церебральная ишемия, тревожные расстройства, шизофрения, депрессия и др. [2, 3]. В частности, антидепрессантоподобные эффекты NT-3 при введении в зубчатую извилину гиппокампа крыс выявлены в тестах выученной беспомощности и вынужденного плавания [4]. Однако разработка фармакологических препаратов на основе полноразмерных нейротрофинов ограничена в связи с их макромолекулярной белковой природой, плохим проникновением через гематоэнцефалический

барьер и низкой устойчивостью в биологических средах. Поэтому альтернативой является создание низкомолекулярных миметиков нейротрофинов.

Целью данной работы было создание фармакологически активного дипептидного миметика NT-3.

По сравнению с NGF и BDNF, число низкомолекулярных миметиков NT-3, известных к настоящему времени, невелико. Так, канадской группой исследователей под руководством Бёрджесса (K. Burgess) и Сарагови (U.H. Saragovi) получены моновалентные миметики-частичные агонисты NT-3 на основе гетероциклических бета-поворотных шаблонов, включающих в себя дипептидные последовательности из первичной структуры NT-3 [5, 6]. Ими же синтезирован ряд бивалентных миметиков NT-3, содержащих в своей структуре фрагменты боковых радикалов аминокислотных остатков (а.к.о.), входящих в состав β -изгибов NT-3 [7, 8]. Поворотная конформация в этих соединениях закреплена с помощью триазольного кольца. Эти миметики активировали TrkC и проявляли нейропротекторный эффект *in vitro* [6, 8].

Однако в доступной литературе мы не обнаружили данных о фармакологических эффектах низкомолекулярных миметиков NT-3 *in vivo*.

Ранее в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова в целях создания фармакологических средств, об-

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова”, Москва, Россия

*e-mail: tata-sosnovka@mail.ru

Таблица 1. Нейропротекторная активность ГТС-301 в экспериментах *in vitro* (клетки линии НТ-22)

Соединение	Концентрация, М	Оптическая плотность (единицы оптической плотности)	Активность, % от максимально возможного эффекта ¹
Модель окислительного стресса			
– (контроль)	–	0.194 ± 0.004	–
H ₂ O ₂	1.5 · 10 ⁻³	0.098 ± 0.009*	–
НТ-3	10 ⁻⁹ (100 нг/мл)	0.146 ± 0.014 [^]	50
ГТС-301	10 ⁻⁵	0.128 ± 0.008 [^]	31
	10 ⁻⁶	0.130 ± 0.007 [^]	33
	10 ⁻⁷	0.128 ± 0.009 [^]	31
	10 ⁻⁸	0.124 ± 0.005 [^]	27
	10 ⁻⁹	0.129 ± 0.008 [^]	32
	10 ⁻¹⁰	0.128 ± 0.003 [^]	31
	10 ⁻¹¹	0.123 ± 0.009 [^]	26
	10 ⁻¹²	0.120 ± 0.012 [^]	23
10 ⁻¹³	0.112 ± 0.010	15	
Модель глутаматной токсичности			
– (контроль)	–	0.197 ± 0.009	–
глутаминовая кислота	5 · 10 ⁻³	0.155 ± 0.012*	–
НТ-3	10 ⁻⁹ (100 нг/мл)	0.186 ± 0.006 [^]	74
ГТС-301	10 ⁻⁵	0.171 ± 0.005 [^]	38
	10 ⁻⁶	0.176 ± 0.010 [^]	50
	10 ⁻⁷	0.166 ± 0.006 [^]	26
	10 ⁻⁸	0.167 ± 0.006 [^]	29
	10 ⁻⁹	–	–

Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений (M±SD).

¹ Активность рассчитывалась по формуле $A(\%) = (D_{\text{эксп}} - D_{\text{ак}}) / (D_{\text{контр}} - D_{\text{ак}}) \times 100\%$, где $D_{\text{эксп}}$ – оптическое поглощение раствора в опыте, $D_{\text{ак}}$ – оптическое поглощение раствора активного контроля (с повреждением), $D_{\text{контр}}$ – оптическое поглощение в пассивном контроле (без повреждения).

Достоверность отличий * $p \leq 0.05$ – от контроля; [^] $p \leq 0.05$ – от повреждения (по критерию Краскела–Уоллиса с последующим тестом по Данну).

Нейропротекторную активность ГТС-301 определяли в условиях окислительного стресса и глутаматной токсичности на клетках гиппокампа мыши НТ-22 как описано ранее [11]. НТ-3 (100 нг/мл, 3.4 · 10⁻⁹ М) либо ГТС-301 (10⁻¹³–10⁻⁵ М) вносили в среду за 24 ч до повреждения. Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста.

На модели окислительного стресса ГТС-301 статистически значимо увеличивал жизнеспособность клеток в интервале концентраций 10⁻⁵–10⁻¹² М, при моделировании глутаматной токсичности – в диапазоне концентраций 10⁻⁵–10⁻⁸ М (табл. 1). В обоих опытах максимальный эффект ГТС-301 в 66–68% от наблюдаемого для НТ-3 зарегистрирован в концентрации 10⁻⁶ М.

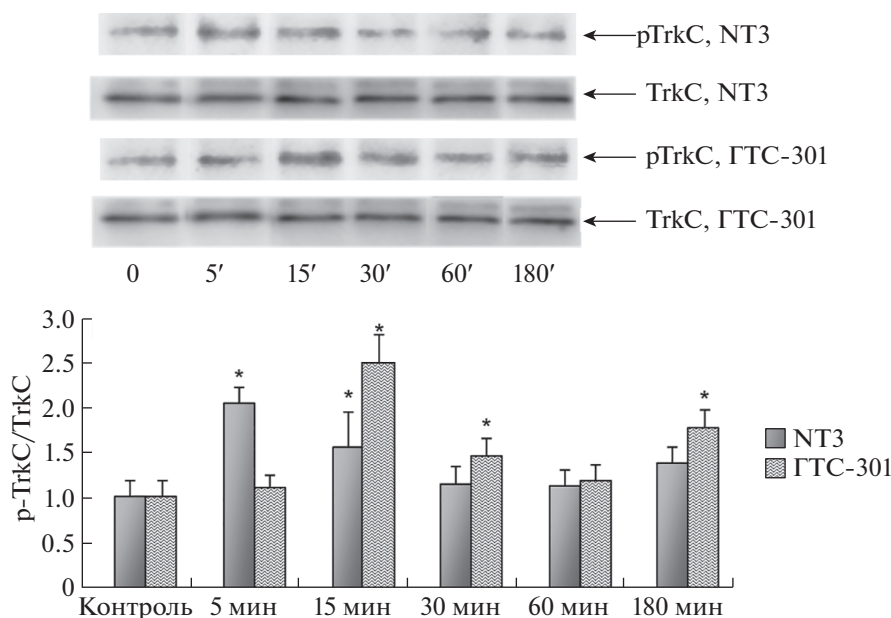


Рис. 2. Активация TrkC рецептора после внесения NT-3 100 (нг/мл) и ГТС-301 (10^{-6} М) в культуру клеток гиппокампа мыши линии НТ-22. На рис. 2, 3 и 4 представлены оригинальные вестерн-блоты и результаты их денситометрии. Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений ($M \pm SD$). Представленные данные являются средними значениями из трех независимых экспериментов. Достоверность отличий * $p \leq 0,05$ – от контроля (U -тест Манна–Уитни).

Способность ГТС-301 активировать разные Trk рецепторы изучена методом Вестерн-блот анализа на культуре клеток НТ-22 с использованием моноклональных антител к фосфорилированным формам pTrkA(Y490), pTrkB(Y515) и pTrkC(Y516). Выбор антител основан на литературных данных о механизмах активации постре-

цепторных сигнальных путей PI3K/АКТ и MEK/МАРК/ERK [12]. В качестве контроля использовали антитела к нефосфорилированным TrkA, TrkB и TrkC. Пробы лизировали через 5, 15, 30, 60 и 180 мин после внесения NT-3 (100 нг/мл) или ГТС-301 (10^{-6} М). Временные интервалы выбраны исходя из результатов экспериментов по

Таблица 2. Эффекты ГТС-301 и Амитриптилина на время иммобильности мышей в тесте вынужденного плавания

Группа ($n = 9-11$)	Время иммобильности, с	Время иммобильности, % от контрольной группы
Эксперимент 1		
Контроль	199.9 \pm 7.8	
ГТС-301 (0.5 мг/кг)	207.5 \pm 15.5	103
ГТС-301 (1.0 мг/кг)	179.5 \pm 9.8	90
ГТС-301 (5.0 мг/кг)	189.5 \pm 11.8	95
ГТС-301 (10.0 мг/кг)	155.5 \pm 9.6* ($p = 0.026$)	78*
Амитриптилин (10.0 мг/кг)	148.0 \pm 10.4** ($p = 0.001$)	74**
Эксперимент 2		
Контроль	213.6 \pm 10.9	
ГТС-301 (20.0 мг/кг)	159.3 \pm 12.7** ($p = 0.004$)	74**
ГТС-301 (40.0 мг/кг)	156.4 \pm 9.0** ($p = 0.003$)	73**
Амитриптилин (10.0 мг/кг)	155.6 \pm 10.7** ($p = 0.002$)	73**

Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. Статистическую оценку межгрупповых различий проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующими попарными межгрупповыми сравнениями с помощью теста Даннета. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

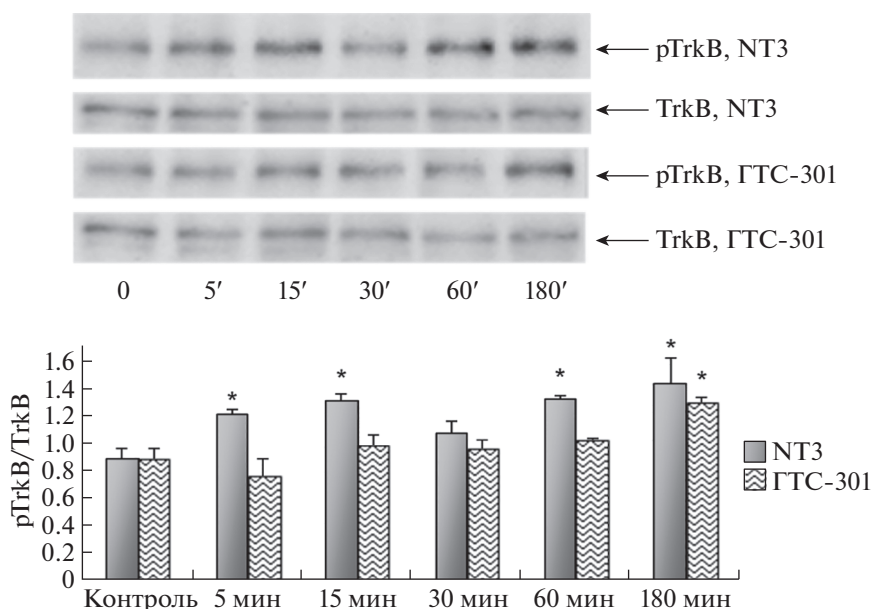


Рис. 3. Активация TrkB рецептора после внесения NT-3 (100 нг/мл) и ГТС-301 (10^{-6} М) в культуру клеток гиппокампа мыши линии NT-22.

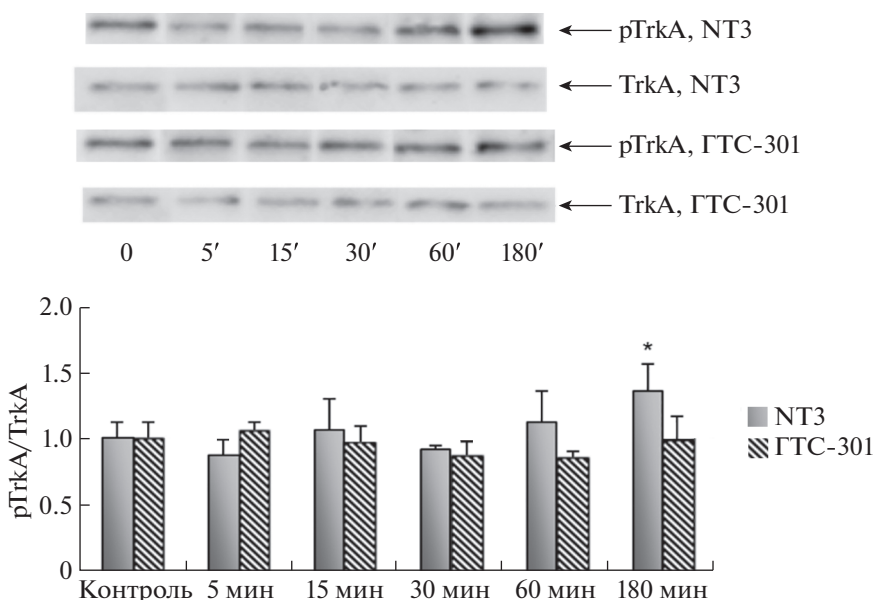


Рис. 4. Сравнение активации TrkA рецептора после внесения NT-3 (100 нг/мл) и ГТС-301 (10^{-6} М) в культуру клеток гиппокампа мыши линии NT-22.

фосфорилированию Trk дипептидными миметиками NGF и BDNF [13].

Активация TrkC, наиболее предпочтительного для NT-3, выявлена через 15, 30 и 180 мин инкубации с ГТС-301, и через 5 и 15 мин инкубации с NT-3, при этом через 15 мин наблюдали сходные эффекты миметика и полноразмерного нейротрофина (рис. 2).

Влияние ГТС-301 на TrkB было выявлено только в одной временной точке – через 180 мин, тогда как для NT-3 – через 5, 15, 60 и 180 мин после внесения. При этом выраженность активирующего влияния оказалась ниже, чем в случае TrkC рецепторов (рис. 3).

NT-3 активировал TrkA рецептор через 180 мин, а ГТС-301 в этих условиях был неэффективен (рис. 4).

Таким образом, ГТС-301 активирует более эффективно TrkC и, в меньшей степени, TrkB. Спектр активации Trk рецепторов миметиком ГТС-301 в целом повторяет таковой для полноразмерного NT-3. Полученная нами картина активации нейротрофином-3 тирозинкиназных рецепторов соответствует литературным данным [14].

Возможные антидепрессантоподобные эффекты ГТС-301 были изучены в тесте вынужденного плавания на мышах BALB/c. Тест проводили в модифицированной конфигурации с двумя посадками мышей в цилиндры с водой [15]. ГТС-301 в дозах 0.5–40 мг/кг вводили мышам субхронически (7 дней) внутрибрюшинно (в/б) в виде суспензии в растворе 1% Tween 80. В качестве положительного контроля использовали Амитриптилин (10 мг/кг, в/б, в физ. растворе). Контрольные мыши получали 1% раствор Tween 80. Спустя 24 ч после последнего введения препаратов проводили предварительную посадку мышей в цилиндры с водой на 10 мин, спустя еще 24 ч – 5-минутную тестовую посадку, в течение которой регистрировали время иммобильности.

Установлено, что в дозах 10–40 мг/кг ГТС-301 статистически значимо снижал время иммобильности мышей, что свидетельствует об антидепрессантоподобном эффекте дипептида (табл. 2). Выраженность эффекта ГТС-301 в дозах 20 и 40 мг/кг была такая же, как у классического антидепрессанта Амитриптилина.

Таким образом, сконструирован и синтезирован ГТС-301, димерный дипептидный миметик нейротрофина-3, активирующий преимущественно TrkC рецептор, проявляющий нейропротекторную активность в экспериментах *in vitro* в пиколярных концентрациях и обладающий антидепрессантоподобной активностью при системном введении. ГТС-301, помимо вероятной практической значимости, может служить молекулярным инструментом для изучения рецепторных взаимодействий, сопряжения активации TrkC рецептора с сигнальными путями и фармакологических эффектов как для полноразмерного NT-3, так и для малых молекул, имитирующих влияние этого нейротрофина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bothwell M.* NGF, BDNF, NT-3, and NT4. // *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2014. V. 220. P. 3–15.
2. *de Miranda A.S., de Barros JLVM, Teixeira A.L.* Is neurotrophin-3 (NT-3): a potential therapeutic target for depression and anxiety? // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2020. V.24. № 12. P. 1225–1238.
3. *Duricki D.A., Drndarski S., Bernanos M., et al.* Stroke Recovery in Rats after 24-Hour-Delayed Intramuscular Neurotrophin-3 Infusion. // *Annals of Neurology*. 2019. V. 85. № 1. P. 32–46.
4. *Shirayama Y., Chen A.C.-H., Nakagawa S., et al.* Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. // *J Neurosci*. 2002. V. 22. № 8. P. 3251–3261.
5. *Pattarawarapan M., Zaccaro M.C., Saragovi U.H., et al.* New templates for syntheses of ring-fused, C(10) beta-turn peptidomimetics leading to the first reported small-molecule mimic of neurotrophin-3. // *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002. V. 45. № 20. P. 4387–4390.
6. *Kempfle J.S., Duro M.V., Zhang A., et al.* A Novel Small Molecule Neurotrophin-3 Analogue Promotes Inner Ear Neurite Outgrowth and Synaptogenesis *In vitro*. // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2021. V. 15. P. 666706.
7. *Zaccaro M.C., Lee H.B., Pattarawarapan M., et al.* Selective small molecule peptidomimetic ligands of TrkC and TrkA receptors afford discrete or complete neurotrophic activities. // *Chemistry & Biology*. 2005. V. 12. № 9. P. 1015–1028.
8. *Chen D., Brahim F., Angell Y., et al.* Bivalent peptidomimetic ligands of TrkC are biased agonists and selectively induce neuritogenesis or potentiate neurotrophin-3 trophic signals. // *ACS Chemical Biology*. 2009. V. 18. № 4(9). P. 769–781.
9. *Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U., Seredenin S.B.* Novel Technologies for Dipeptide Drugs Design and their Implantation. // *Curr Pharm Des*. 2018. V. 24. № 26. P. 3020–3027.
10. *Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Tarasiuk A.V., Seredenin S.B.* Low-molecular mimetics of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor: Design and pharmacological properties. // *Med Res Rev*. 2021. V. 41. № 5. P. 2746–2774.
11. *Логвинов И.О., Антипова Т.А., Гудашева Т.А. и др.* Нейропротективные свойства дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 в экспериментах *in vitro*. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013. Т. 155, № 3. С. 319–322.
12. *Reichardt L.F.* Neurotrophin-regulated signalling pathways. // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2006. V. 361. № 1473. P. 1545–1564.
13. *Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Antipova T.A., Firsova Y.N., Konstantinopolsky M.A., Seredenin S.B.* Dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor Loop 4 and Loop 1 activate TRKA with different patterns of intracellular signal transduction. // *J. Biomed. Sci*. 2015. V. 8. № 22. P. 106.
14. *Ip N.Y., Stitt T.N., Tapley P., et al.* Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. // *Neuron*. 1993. V. 10. № 2. P. 137–149.
15. *Angoa-Pérez M., Kane M.J., Briggs D.I., et al.* Mice genetically depleted of brain serotonin do not display a depression-like behavioral phenotype. // *ACS Chemical Neuroscience*. 2014. V. 5. № 10. P. 908–919.

THE FIRST DIPEPTIDE MIMETIC OF NEUROTROFIN-3: DESIGN AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES

Corresponding Member of the RAS T. A. Gudasheva^a, N. M. Sazonova^{a, #}, F. V. Tarasiuk^a, I. O. Logvinov^a,
T. A. Antipova^a, D. M. Nikiforov^a, P. Yu. Povarnina^a, and Academician of the RAS S. B. Seredenin^a

^a *Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: tata-sosnovka@mail.ru*

The dimeric dipeptide mimetic, hexamethylenediamide bis-(N-monosuccinyl-L-asparaginyl-L-asparagine) (GTS-301) was created based on the structure of the exposed region of the neurotrophin-3 4th loop. The new compound as well as full-length neurotrophin, activated the TrkC and TrkB receptors. GTS-301 showed neuroprotective activity in experiments on HT-22 mouse hippocampal cells under conditions of oxidative stress and glutamate toxicity at concentrations of 10^{-12} and 10^{-8} M, respectively, and antidepressant-like activity in the forced swimming test on mice with 7-day intraperitoneal administration in doses 10-40 mg/kg.

Keywords: neurotrophin-3, mimetic, GTS-301 dipeptide, Trk receptors, neuroprotective activity, antidepressant activity