

УДК 577.112.6:615.214.31

ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО МИМЕТИКА BDNF ДИПЕПТИДА ГСБ-106 С TRK РЕЦЕПТОРАМИ

© 2023 г. Т. А. Антипова¹, И. О. Логвинов¹, И. Е. Деев²,
П. Ю. Поварнина¹, член-корреспондент РАН Ю. В. Вахитова¹,
член-корреспондент РАН Т. А. Гудашева^{1*}, академик РАН С. Б. Середенин¹

Поступило 15.03.2023 г.
После доработки 03.04.2023 г.
Принято к публикации 03.04.2023 г.

С использованием клеток НТ-22, нокаутных по генам рецепторов TrkA или TrkB, установлена селективность взаимодействия низкомолекулярного миметика BDNF дипептида ГСБ-106 (гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина)) с TrkB рецепторами.

Ключевые слова: BDNF, низкомолекулярный миметик, дипептид, ГСБ-106, нокаутные клетки, НТ-22, TrkA, TrkB

DOI: 10.31857/S2686738923600218, **EDN:** JFIMHI

В литературе широко представлены данные о физиологической роли мозгового нейротрофического фактора (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) в регуляции ЦНС, также как и о нейропсихических заболеваниях, патогенез которых ассоциирован с дефицитом нейротрофина [1–5]. Очевидная гипотеза о заместительной терапии не может быть реализована ввиду быстрой биотрансформации полноразмерного BDNF, барьерных ограничений при его системном введении, а также риска развития нежелательных эффектов [6, 7]. Поэтому с начала 90-х годов ведется поиск фармакологически пригодных низкомолекулярных миметиков BDNF [8–12]. До настоящего времени, несмотря на ряд позитивных результатов доклинических исследований, ни один из миметиков-кандидатов не внедрен в клинику.

В рамках научных исследований, одобренных отделением физиологии Российской академии наук, в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова сконструирован и синтезирован дипептидный ми-

метик BDNF гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина), соединение ГСБ-106 [13]. На гиппокампальных клетках мыши линии НТ-22 установлено, что ГСБ-106 способствует фосфорилированию специфических для BDNF TrkB рецепторов, активации их основных пострецепторных каскадов PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC- γ 1 [14] и обладает защитным действием в диапазоне концентраций от 10^{-5} до 10^{-8} М при моделировании окислительного стресса [13]. В фармакокинетических исследованиях показано [15], что дипептид преодолевает гемато-энцефалический барьер. ГСБ-106 в дозах 0.1–1.0 мг/кг при системном введении в стандартных экспериментальных моделях проявил антидепрессантоподобную активность [13, 16, 17], которая, как доказано фармакологическим ингибиторным анализом, опосредована активацией TrkB и сопряженных путей трансдукции сигнала [16].

Соединение ГСБ-106 изучено в полном цикле доклинических исследований в качестве перспективного, первого в классе антидепрессанта с нейротрофинергическим механизмом действия.

Для дополнительного выяснения фармакодинамических механизмов ГСБ-106 необходимо установить селективность взаимодействия миметика BDNF с TrkB рецепторами, что явилось целью настоящей работы.

Исследование выполнено на нокаутных по генам trka и trkb клетках НТ-22 с регистрацией протекторного действия при моделировании окислительного стресса в качестве показателя фармако-

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

²Государственный Научный Центр Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

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

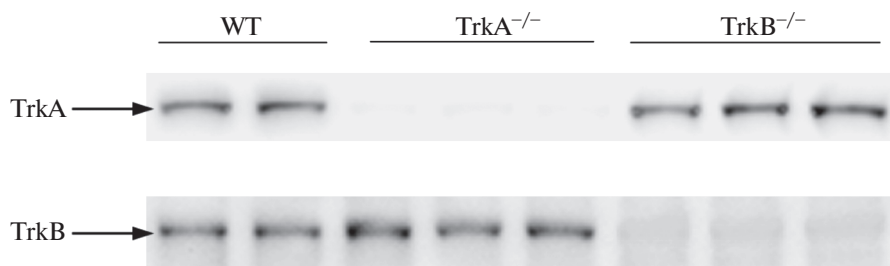


Рис. 1. Результаты оригинального Вестерн-блот анализа, подтверждающие отсутствие TrkA и TrkB экспрессии в TrkA^{-/-} и TrkB^{-/-} соответственно в клетках НТ-22. WT – клетки НТ-22 без мутаций по соответствующим генам.

логического эффекта. Нокаутные по TrkA или TrkB клетки на основе линии НТ-22 получены ранее [18]. Использована система редактирования генома CRISPR-Cas9 по протоколу, описанному в [19]. Плазмида pSpCas9(BB)-2A-Puro содержала последовательность, кодирующую нуклеазу Cas9. ДНК генов *Ntrk1* и *Ntrk2* в местах расщепления

нуклеазой Cas9 содержала сайт рестрикции *ScaI*, при делеции одного или нескольких нуклеотидов *ScaI* должен был исчезать. При этом было получено несколько нокаутных по TrkA или TrkB клеточных пулов. Для подтверждения делеции TrkA или TrkB из клеток выделяли ДНК, целевые участки генов *Ntrk1* и *Ntrk2* амплифицировали и отсутствие сайта *ScaI* подтверждали электрофоретически.

Отсутствие экспрессии TrkA и TrkB на уровне белка в клеточных пулах (TrkA^{-/-}) и (TrkB^{-/-}) было подтверждено с помощью Вестерн-блот анализа с использованием специфических антител против TrkA и TrkB (рис. 1).

Для определения наличия или отсутствия фармакологического эффекта ГСБ-106 выбрали наиболее чувствительные к окислительному стрессу клеточные пулы. Окислительный стресс моделировали путем внесения в среду культивирования клеток раствора перекиси водорода (H₂O₂) в конечной концентрации 1.5 мМ. Клетки с H₂O₂ инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C 30 мин. Далее среду заменяли на нормальную и через 4 ч определяли жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста [20]. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре “Multiscan EX” (Thermo, США) при длине волны 600 нм.

Для изучения зависимости защитного действия ГСБ-106 от наличия TrkA или TrkB рецепторов дипептид вносили в культуральную среду, содержащую нокаутные по одному из этих рецепторов клетки НТ-22, в конечных концентрациях 10⁻⁵–10⁻⁸ М [9] за 24 ч до повреждения клеток или сразу после отмывки H₂O₂. В качестве положительного контроля использовали NGF (100 нг/мл) (Sigma, США) или BDNF (50 нг/мл) (BD Bioscience, Великобритания).

Из рис. 2 видно, что при отсутствии TrkA рецепторов защитное действие как BDNF, так и его миметика ГСБ-106 сохранялось в обеих схемах эксперимента. Диапазон эффективных концентраций ГСБ-106 составил 10⁻⁵–10⁻⁷ М.

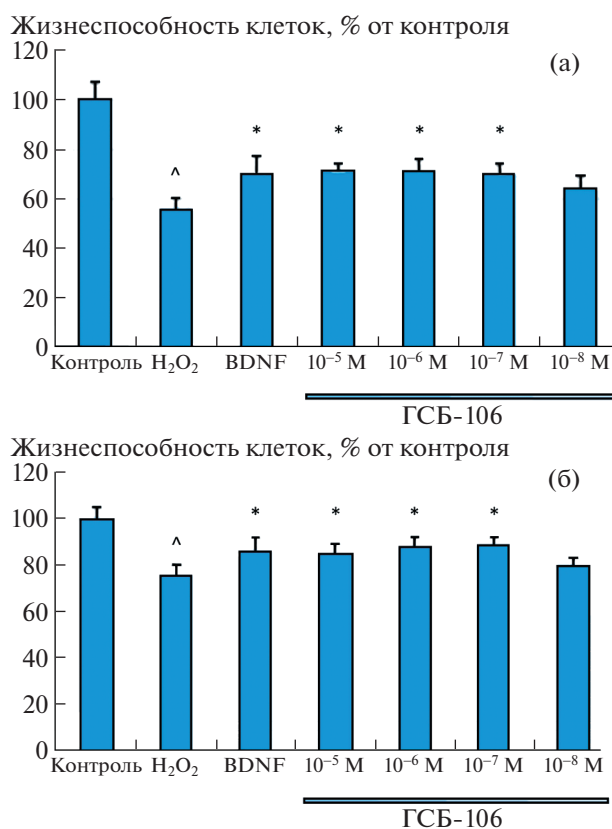


Рис. 2. Влияние различных концентраций ГСБ-106 на жизнеспособность нокаутных по TrkA рецептору клеток НТ-22 на модели окислительного стресса. (а) Внесение BDNF и ГСБ-106 за 24 ч до повреждения. (б) Внесение BDNF и ГСБ-106 сразу после повреждения. Результаты МТТ-теста. ^ – $p \leq 0.05$ по сравнению с интактным контролем, * – $p \leq 0.05$ по сравнению с активным контролем. Критерий Краскела–Уоллиса с последующим тестом по Данну.

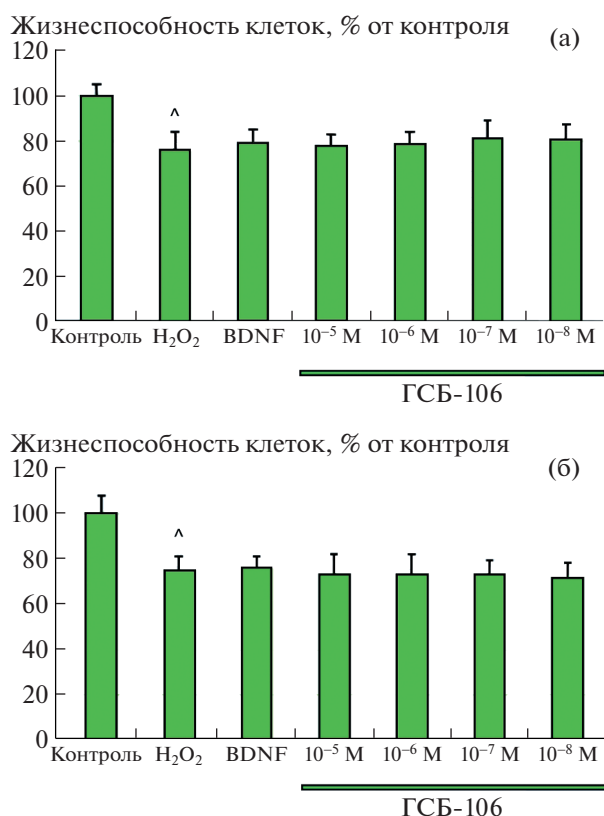


Рис. 3. Влияние различных концентраций ГСБ-106 на жизнеспособность нокаутных по TrkB рецептору клеток HT-22 на модели окислительного стресса. (а) Внесение BDNF и ГСБ-106 за 24 ч до повреждения. (б) Внесение BDNF и ГСБ-106 сразу после повреждения. Результаты МТТ-теста. ^ – $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем. Критерий Краскела–Уоллиса с последующим тестом по Данну.

При моделировании окислительного стресса на нокаутных по TrkB рецептору клетках HT-22 активность и BDNF, и его миметика ГСБ-106 отсутствовала (рис. 3).

Таким образом, с использованием клеток HT-22, нокаутных по генам рецепторов TrkA или TrkB, установлено, что эффекты низкомолекулярного миметика BDNF дипептида ГСБ-106 по изученному защитному действию на клетках в условиях окислительного стресса связаны с TrkB рецепторами.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gliwińska A., Czubińska-Łada J., Więckiewicz G., et al. The role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in diagnosis and treatment of epilepsy, de-

pression, schizophrenia, anorexia nervosa and Alzheimer's disease as highly drug-resistant diseases: a narrative review // Brain Sciences. 2023. V. 13. № 2. P. 163.

2. Alfonsetti M., d'Angelo M., Castelli V. Neurotrophic factor-based pharmacological approaches in neurological disorders // Neural Regen Res. 2023. V. 18. № 6. P. 1220–1228.

3. Colucci-D'Amato L., Speranza L., Volpicelli F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer // Int J Mol Sci. 2020. V. 21. № 20. P. 7777.

4. Camuso S., Canterini S. Brain-derived neurotrophic factor in main neurodegenerative diseases // Neural Regen Res. 2023. V. 18. № 3. P. 554–555.

5. Cavaleri D., Moretti F., Bartocetti A., et al. The role of BDNF in major depressive disorder, related clinical features, and antidepressant treatment: insight from meta-analyses // Neurosci Biobehav Rev. 2023. P. 105159.

6. Scharfman H.E., Goodman J.H., Sollas A.L., et al. Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor // Exp Neurol. 2002. V. 174. № 2. P. 201–214.

7. Pellemounter M.A., Cullen M.J., Wellman C.L. Characteristics of BDNF-induced weight loss // Exp Neurol. 1995. V. 131. № 2. P. 229–238.

8. Massa S.M., Yang T., Xie Y., et al. Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents // J Clin Invest. 2010. V. 120. № 5. P. 1774–1785.

9. Longo F.M., Massa S.M. Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: a strategy for the treatment of neurological disease // Nat Rev Drug Discov. 2013. V. 12. № 7. P. 507–525.

10. Fletcher J.L., Dill L.K., Wood R.J., et al. Acute treatment with TrkB agonist LM22A-4 confers neuroprotection and preserves myelin integrity in a mouse model of pediatric traumatic brain injury // Exp Neurol. 2021. V. 339. P. 113652.

11. Emili M., Guidi S., Uguagliati B., et al. Treatment with the flavonoid 7,8-Dihydroxyflavone: a promising strategy for a constellation of body and brain disorders // Crit Rev Food Sci Nutr. 2022. V. 62. № 1. P. 13–50.

12. Wang S., Yao H., Xu Y., et al. Therapeutic potential of a TrkB agonistic antibody for Alzheimer's disease // Theranostics. 2020. V. 10. № 15. P. 6854–6874.

13. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В., и др. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора // Биоорган. химия. 2012. Т. 38. № 3. С. 280–290.

14. Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Николаев С.В., и др. Дипептидные миметики отдельных петель NGF и BDNF активируют PLC- γ 1 // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2020. Т. 494. № 1. С. 486–490.

15. Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Лутвин А.А., и др. Фармакокинетика дипептидного миметика BDNF ГСБ-106 у крыс // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2019. № 1. С. 37–43.

16. Gudasheva T.A., Tallerova A.V., Mezhlumyan A.G., et al. Low-molecular weight BDNF mimetic, dimeric di-

- peptide GSB-106, reverses depressive symptoms in mouse chronic social defeat stress // *Biomolecules*. 2021. V. 11. № 2. P. 252.
17. *Vakhitova Y.V., Kalinina T.S., Zainullina L.F., et al.* Analysis of antidepressant-like effects and action mechanisms of GSB-106, a small molecule, affecting the TrkB signaling // *Int J Mol Sci*. 2021. V. 22. № 24. P. 13381.
 18. *Антипова Т.А., Деев И.Е., Гудашева Т.А., и др.* Доказательство селективности взаимодействия дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 с TrkA-рецептором с использованием нокаутных по генам *trka* и *trkb* клеток линии HT-22 // *Химико-Фармацевтический Журнал*. 2022. Т. 56. № 12. С. 18–22.
 19. *Ran F., Hsu P., Wright J. et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nat Protoc*. 2013. № 8. P. 2281–2308.
 20. *Jackson G.R., Werrbach-Perez K., Ezell E.L., et al.* Nerve growth factor effects on pyridine nucleotides after oxidant injury of rat pheochromocytoma cells // *Brain Res*. 1992. V. 592. № 1–2. P. 239–248.

PHARMACOGENETIC ANALYSIS OF THE INTERACTION OF THE LOW-MOLECULAR WEIGHT BDNF MIMETIC DIPEPTIDE GSB-106 WITH TRK RECEPTORS

T. A. Antipova^a, I. O. Logvinov^a, I. E. Deyev^b, P. Yu. Povarnina^a,

Corresponding Member of the RAS Yu. V. Vakhitova^a, Corresponding Member of the RAS T. A. Gudasheva^{a,#}, and Academician of the RAS S. B. Seredenin^a

^a*Federal State Budgetary Institution “Research Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation*

^b*State Scientific Center Federal State Budgetary Institution of Science “Shemyakin–Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry, Russian Academy of Sciences”, Moscow, Russian Federation*

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

Using TrkA or TrkB receptor gene knockout HT-22 cells showed the selectivity of the interaction of the low molecular weight dipeptide BDNF mimetic GSB-106 (hexamethylenediamide bis(N-monosuccinyl-L-seryl-L-lysine)) with TrkB receptors.

Keywords: BDNF, low molecular weight mimetic, dipeptide, GSB-106, knockout cells, HT-22, TrkA, TrkB