НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-11-3-7

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АНКСИОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МИМЕТИКОВ 1-Й, 2-Й И 4-Й ПЕТЕЛЬ МОЗГОВОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА

Л. Г. Колик, А. В. Надорова, Е. М. Григоревских, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин[1]

Изучены анксиолитические свойства димерных дипептидных миметиков 1-й (ГСБ-214), 2-й (ГТС-201) и 4-й (ГСБ-106) петель мозгового нейротрофического фактора (BDNF), взаимодействующих с TrkB-рецепторами и по-разному активирующих пострецепторные сигнальные пути. Впервые в тесте "Приподнятый крестообразный лабиринт" выявлены анксиолитические свойства соединений ГСБ-106 и ГТС-201 в диапазоне доз 0,1 – 5 мг/кг (внутрибрюшинно) при однократном введении и показана зависимость эффекта от дозы у мышей-самцов CD-1. Активация MAPK/ERK1/2 и PI3K/AKT путей определяет наиболее выраженный анксиолитический эффект ГСБ-106 в дозе 1 мг/кг, по сравнению с умеренным действием ГТС-201, преимущественно активирующим MAPK/ERK1/2 путь и отсутствием эффекта у ГСБ-214, влияющего на PI3K/AKT путь. Таким образом, проявление анксиолитической активности миметиков BDNF связано с активацией ERK1/2 и AKT сигнальных путей.

Ключевые слова: мозговой нейротрофический фактор; миметики BDNF; анксиолитическое действие; мыши.

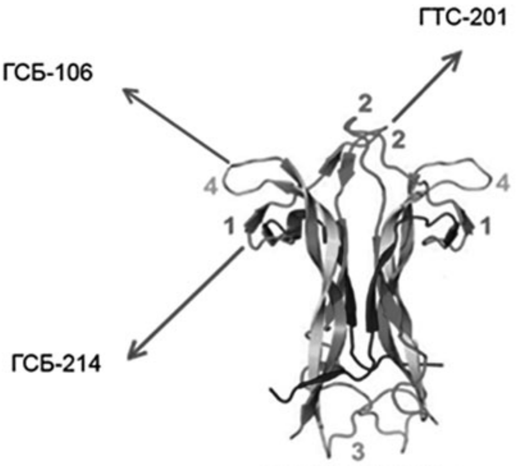
ВВЕДЕНИЕ

В последние годы неуклонно растет интерес к роли мозгового нейротрофического фактора (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), одного из наиболее распространенных представителей семейства нейротрофинов, в регуляции тревожного поведения. BDNF, взаимодействующий с тропомиозиновым тирозинкиназным рецептором B (TrkB) с последующей инициацией нисходящей сигнализации через митоген-активируемую протеинкиназу (MAPK), фосфолипазу Cγ(PLCγ) и фосфоинозитол 3-киназу (PI3K) [10], в настоящее время рассматривается в качестве одной из наиболее перспективных молекул для понимания нейробиологических механизмов формирования ассоциативного синаптического "обучения", возникающего при формировании и развитии тревожных расстройств [7, 8], а также важным фактором стресс-устойчивости. Мыши с вариантом полиморфизма BDNF Val66Met, который связан с гиперреактивностью гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и обнаружен у пациентов с депрессией, демонстрируют уязвимость к стрессу, о чем свидетельствует повышенная тревожность и депрессивно-подобное поведение в ответ на повторяющийся стресс [12]. Более низкие значения мРНК BDNF и содержание белка регистрируются в гиппокампе у чувствительных к эмоциональному воздействию мышей, по сравнению со стресс-устойчивыми животными [5]. При рассмотрении взаимосвязи между снижением функции BDNF в гиппокампе и повышенной восприимчивостью к эмоционально-стрессовой реакции в пожилом возрасте выдвинута гипотеза, согласно которой ослабление BDNF, наряду со старением, индуцирует дисфункцию ГАМК-ергической нейропластичности, а применение экзогенного BDNF может обратить вспять тревожные расстройства, обусловленные процессом естественного старения, восстанавливая ГАМК-нейропластичность [13]. Таким образом, экспериментальные исследования свидетельствует о том, что снижение уровня BDNF провоцирует формирование тревожного поведения.

Опираясь на оригинальную гипотезу о взаимодействии нейротрофинов с Trk-рецепторами с помощью наиболее экспонированных участков их петлеобразных структур, связанных с реализацией определенных биологических эффектов, в НИИ фармакологии имени В. В. Закусова сконструированы и синтезированы димерные дипептидные миметики 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF (рис. 1), которые взаимодействуют с TrkB-рецептором, но в опытах *in vitro* по-разному влияют на пострецепторные сигнальные пути: миметик 1-й петли ГСБ-214 преимущественно активирует PI3K/AKT-путь, миметик 2-й петли ГТС-201 – MAPK/ERK, а миметик 4-й петли ГСБ-106 активирует оба сигнальных пути [1].

В предыдущих исследованиях установлено, что непременным условием реализации антидепрессивного

[1] ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В. В. Закусова", Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.



BDNF/NT-4 (ID: 1b8m)

Рис. 1. Дизайн и структура димерных дипептидных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF.

действия низкомолекулярных миметиков BDNF является активация MAPK/ERK1/2- и PI3K/AKT-путей [3], однако данные об их психотропном эффекте в условиях эмоционального стресса в настоящее время отсутствуют. Цель работы — изучение анксиолитического действия низкомолекулярных миметиков разных петель BDNF в опытах *in vivo*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на мышах-самцах CD-1 ($n = 128$) массой 25 – 30 г (ФГБУН "Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства", филиал "Столбовая"). Животных содержали по 10 особей в клетке стандарта Т/3 в условиях вивария ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В. В. Закусова" (температура 21 – 23 °С, относительная влажность воздуха 40 – 60 %), при естественной освещенности и свободном доступе к воде и брикетированному корму в течение 10 сут до начала тестирования. Эксперименты проводили в соответствии с Директивой Совета Европейского сообщества 2010/63/ЕЕС или с Приказом Минздрава России от 1 апреля 2016 г. № 199н "Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики". Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В. В. Закусова".

Синтезированные в НИИ фармакологии имени В. В. Закусова пептидные миметики BDNF ГСБ-106 (гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина)), ГТС-201 (гексаметилендиамид бис(-N-гексаноил-L-серил-L-лизина)) и ГСБ-214 (гептаметилендиамид бис-моносукцинил-метионил-серина) применяли в диапазоне ранее выявленных эффективных доз 0,1 – 5 мг/кг за 30 или 60 мин до начала тестирования. Время экспозиции животных до тестирования выбрано на основе данных об антиноцицептивной активности миметиков при построении зависимости "время — эффект" (неопубликованные данные). Животным из контрольной группы вводили воду для инъекций (производитель "Обновление ПФК АО"). Все препараты вводили внутрибрюшинно (в/б) из расчета 0,1 мл/10 г массы животного.

Оценку тревожности проводили в соответствии с методикой, описанной ранее [9], с использованием установки "Приподнятый крестообразный лабиринт" (ПКЛ, НПК Открытая Наука, Россия). Животных помещали на центральную площадку и в течение последующих 300 с фиксировали основные параметры, а именно время нахождения в открытых рукавах (с), число заходов в открытые рукава и число заходов в закрытые рукава. Показатели "время в открытых рукавах" и "число заходов в открытые рукава" сравнивали в процентах (%), которые рассчитывали по формуле: время в открытых рукавах в % = (время в открытых рукавах/300) · 100 %; число заходов в открытые рукава в % = (число заходов в открытые рукава/общее число заходов в открытые и закрытые рукава) · 100 % [4]. Увеличение времени нахождения в открытых рукавах при отсутствии изменений двигательной активности (общее число заходов в открытые и закрытые рукава) рассматривали как проявление анксиолитического эффекта.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим использованием критерия Дункана. Критический уровень значимости $\alpha = 0,05$.

Таблица 1. **Влияние ГСБ-106 на поведение мышей CD-1 в тесте "Приподнятый крестообразный лабиринт"**

Параметр поведения	Доза, мг/кг			
	0 ($n = 10$)	0,1 ($n = 10$)	1,0 ($n = 10$)	5,0 ($n = 10$)
Время в открытых рукавах, с	8,4 ± 3,0	28,9 ± 8,4	52,5 ± 13,4**	15,6 ± 11,8
Выход в открытые рукава, количество	1,0 ± 0,5	2,4 ± 0,6	3,0 ± 0,7	1,2 ± 0,7
Заход в закрытые рукава, количество	9,3 ± 1,3	10,6 ± 1,3	9,4 ± 1,0	8,9 ± 1,2
Общая двигательная активность	10,3 ± 1,3	13,0 ± 1,6	12,4 ± 1,2	10,1 ± 1,5

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, тест Дункана, Mean ± S.E.M.

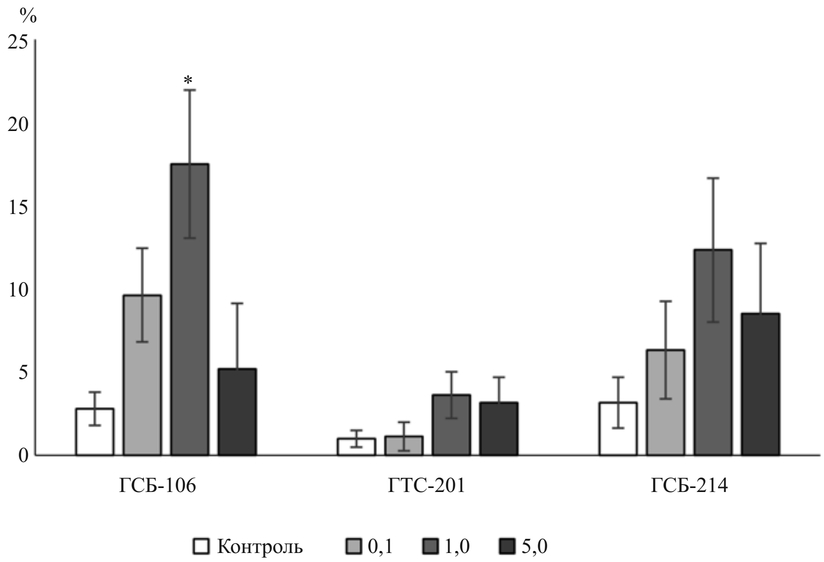


Рис. 2. Сравнительная оценка влияния миметиков BDNF на время пребывания в открытых рукавах ПКЛ.

По оси абсцисс представлены экспериментальные группы (для каждого соединения), по оси ординат — “время в открытых рукавах (%)” и “число заходов в открытые рукава” сравнивали в процентах (%).
* $p < 0{,}01$ статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой, тест Дункана, число животных в каждой группе 10. Mean ± S.E.M.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Миметик 4-й петли BDNF ГСБ-106 в дозе 1 мг/кг за 60 мин до тестирования значительно увеличивал время нахождения в открытых рукавах ($p \le 0{,}05$), количество выходов в открытые рукава ($p \le 0{,}05$), при этом увеличивая общую двигательную активность ($p \le 0{,}05$), по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Миметик 2-й петли BDNF ГТС-201 в дозе 1 мг/кг за 30 мин до тестирования также увеличивал число выходов в открытые рукава ($p \le 0{,}05$) и отношение времени, проведенного в открытых рукавах, по отношению к общему времени эксперимента ($p \le 0{,}05$), не влияя на общую двигательную активность животных (табл. 2). Миметик 1-й петли BDNF ГСБ-214 ни в одной из изученных доз не оказывал статистически значимого действия на поведение животных в тесте ПКЛ (табл. 3).

При сравнительной оценке анксиолитического действия миметиков разных петель BDNF показана наиболее выраженная эффективность миметика 4-й петли (соединение ГСБ-106), который в зависимости от дозы статистически значимо увеличивал два основных показателя тревожности в ПКЛ (рис. 2, 3). Таким обра-

Таблица 2. **Влияние ГТС-201 на поведение мышей CD-1 в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт”**

Параметр поведения	Доза, мг/кг			
	0 (n = 19)	0,1 (n = 10)	1,0 (n = 9)	5,0 (n = 10)
Время в открытых рукавах. с	3,0 ± 1,5	3,4 ± 2,6	10,9 ± 4,2	9,5 ± 4,6
Выход в открытые рукава, количество	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2	1,7 ± 0,5 *	1,2 ± 0,5
Заход в закрытые рукава, количество	8,3 ± 0,8	8,3 ± 1,3	6,8 ± 0,4	8,0 ± 1,1
Общая двигательная активность	8,7 ± 0,8	8,7 ± 1,4	8,4 ± 0,6	9,2 ± 1,3

* $p < 0{,}05$ по сравнению с контрольной группой, тест Дункана, Mean ± S.E.M.

Таблица 3. **Влияние ГСБ-214 на поведение мышей CD-1 в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт”**

Параметр поведения	Доза, мг/кг			
	0 (n = 10)	0,1 (n = 10)	1,0 (n = 10)	5,0 (n = 10)
Время в открытых рукавах. с	19,0 ± 8,8	37,0 ± 12,9	25,6 ± 12,6	57,4 ± 20,7
Выход в открытые рукава, количество	2,0 ± 0,9	3,2 ± 1,1	2,1 ± 0,8	4,2 ± 1,1
Заход в закрытые рукава, количество	9,5 ± 1,1	10,9 ± 0,8	9,8 ± 1,0	9,9 ± 1,4
Общая двигательная активность	11,5 ± 1,6	14,1 ± 1,5	11,9 ± 1,2	14,1 ± 1,7

Статистически значимых отличий по сравнению с контрольной группой не выявлено, тест Дункана, Mean ± S.E.M.

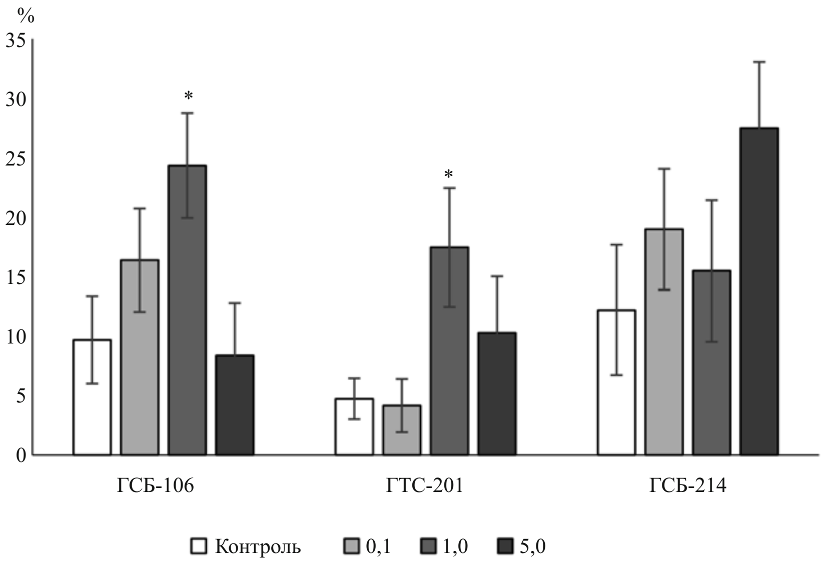


Рис. 3. Сравнительная оценка влияния миметиков BDNF на количество выходов в открытые рукава ПКЛ. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, тест Дункана.

По оси абсцисс представлены экспериментальные группы (для каждого соединения), по оси ординат — число выходов в открытые рукава (%). * $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, тест Дункана, число животных в каждой группе 10. Mean ± S.E.M.

зом, по выраженности противотревожной активности низкомолекулярные пептидные миметики BDNF можно расположить в последовательности ГСБ-106 > ГТС-201 > ГСБ-214.

В последние годы накоплены убедительные экспериментальные данные, свидетельствующие о вовлеченности пострецепторного MAPK/ERK1/2-сигнального пути в проявлении анксиолитической активности соединений различной химической структуры и механизма действия. Так, тандоспирон, препарат с анксиолитическим действием из класса азапиронов, к которому относится буспирон, при системном введении стимулировал сигнальный каскад MAP-киназы, в частности фосфорилирование внеклеточной сигнально-регулируемой киназы (ERK), что стало первым доказательством быстрого повышения уровня p-ERK вследствие активации серотониновых 5-HT1$_A$ рецепторов [11]. Повышенная экспрессия BDNF сопровождала анксиолитическую активность ингибитора обратного захвата серотонина флуоксетина в ПКЛ при одновременном ослаблении серотонинергических процессов в ответ на понижающую регуляцию ауторецепторов 5-HT1$_A$ [9]. С другой стороны, при стрессе показано снижение сигнализации ERK, а блокада ERK-пути с помощью ингибиторов способствует возникновению тревожно-депрессивного поведения [2].

Предполагают, что именно ERK-путь может играть определенную роль в формировании нейронального ответа на хронический стресс и реализации механизма действия флуоксетина [2]. Полученные результаты в отношении анксиолитической активности новых миметиков 2-й и 4-й петель BDNF, активирующих MAPK/ERK1/2 сигнальный каскад, соответствуют современным представлениям об участии данного пострецепторного пути в формировании эмоциональной реакции на стресс. Впервые выявлены анксиолитические свойства соединений ГСБ-106 и ГТС-201 и показана зависимость противотревожного действия от дозы. Преимуществом ГСБ-106 как потенциального лекарственного средства является отсутствие диссоциации в диапазоне доз по анксиолитическому и ранее показанному антидепрессивному [3] действию. Возможно, что активация MAPK/ERK1/2- и PI3K/AKT-пострецепторных путей определяет наиболее выраженный анксиолитический эффект ГСБ-106, по сравнению с ГТС-201 в “Приподнятом крестообразном лабиринте”. Таким образом, можно предположить, что для проявления выраженной анксиолитической активности миметиков BDNF необходима активация его двух основных ERK1/2- и AKT-сигнальных путей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные свидетельствуют о том, что низкомолекулярные миметики 1-й и 4-й петель BDNF обладают анксиолитической активностью в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт”, что может быть связано с активацией двух основных ERK1/2- и AKT-сигнальных путей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Гудашева, А. В. Тарасюк, Н. М. Сазонова и др., *Докл. АН*, **476**(1), 108 – 112 (2017); doi: 10.7868/S0869565217250235
2. M. First, I. Gil-Ad, M. Taler, et al., *J. Mol. Neurosci.*, **45**, 246 – 255 (2011); doi: 10.1007/s12031-011-9515-5
3. T. A. Gudasheva, P. Povarnina, A. V. Tarasiuk, et al., *Cur. Pharm. Design.*, **25**, 729 – 737 (2019); doi: 10.2174/1381612825666190329122852

4. A Holmes 1, S Parmigiani, P F Ferrari et al, *Physiology Behavior*, **71**, 509 ± 516 (2000); doi: 10.1016/s0031-9384(00)003735
5. A. Ieraci, A. Mallei, M. Popoli, *Neural. Plasticity*, ID 6212983 (2016); doi: 10.1155/2016/6212983
6. R. G. Lister, *Psychopharmacology*, **92**, 180 – 185 (1987); doi: 10.1007/BF00177912
7. T. B. Lonsdorf, R. Kalisch, *Transl. Psychiatry*, Sep 20, 1, e41 (2011); doi: 10.1038/tp. 2011.36.
8. S. Mineka, K. Oehlberg, *Acta Psychol (Amst)*, **127**(3), 567 – 580 (2008); doi: 10.1016/j.actpsy.2007.11.007
9. G. Quesseveur, D. J. David, M. C. Gaillard, et al., *Transl. Psychiatry*, **3**, e253 (2013); doi: 10.1038/tp. 2013.30
10. M. S. Sachin Moonat, S. C. Pandey, *Alcohol. Res.*, **34**(4), 495 – 505 (2012); PMCID: PMC3860391 PMID: 23584115
11. T. A. Gudasheva, P. Povarnina, A. V. Tarasiuk and S. B. Seredenin, *Cur. Pharm. Design*, **25**(6), 729 – 737 (2019).
12. H. Yu, D. D. Wang, Y. Wang, et al., *Neurosci*, **32**, 4092 – 4101 (2012); doi: https: // doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5048-11.2012
13. G. Zhu, X. Sun, Y. Yang, *Behav. Neurosci.*, **133**(2), 212 – 224 (2019); doi: 10.1037/bne0000301

Поступила 17.09.20

EXPERIMENTAL STUDY OF THE ANXIOLYTIC ACTIVITY OF LOW-MOLECULAR-MASS MIMETICS OF THE FIRST, SECOND AND FOURTH LOOPS OF BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR

L. G. Kolik[1], A. V. Nadorova[1], E. M. Grigorevskikh[1], T. A. Gudasheva[1], and S. B. Seredenin[1]

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

The anti-anxiety properties of dimeric dipeptide mimetics of the 1st (GSB-214), 2nd (GTS-201) and 4th (GSB-106) brain-derived neurotrophic factor (BDNF) loops interacting with TrkB receptors and differently activating post-receptor signaling pathways have been studied in male CD-1 mice. For the first time, the "elevated plus-maze" test and dose-dependent anxiolytic properties of GSB-106 and GTS-201 were examined in a dose range of 0.1 – 5 mg/kg (i.p.) after acute administration. Non-selective activation of the MARK/ERK1/2 and PI3K/AKT pathways determined the most pronounced anxiolytic effect of GSB-106 at a dose of 1 mg/kg compared to the moderate action of GTS-201 (MARK/ERK1/2 pathway) and the lack of effect in GSB-214 (PI3K/AKT pathway). Thus, activation of the two main signaling pathways is necessary for the manifestation of the anxiolytic activity of short dipeptide BDNF mimetics.

Keywords: brain derived neurotrophic factor; BDNF mimetics; anxiolytic effect; mice.