

УДК 577.112.6:615.214.31

Дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора обладает свойствами антидепрессанта при пероральном введении

П. Ю. Поварнина*, Т. Л. Гарибова, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин

Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

*E-mail: povarnina@gmail.com

Поступила в редакцию 05.07.2017

Принята к печати 06.06.2018

РЕФЕРАТ Участие BDNF в регуляции нейропластичности и нейрогенеза в гиппокампе, нарушение которой лежит в основе патофизиологии депрессии, позволяет рассматривать этот эндогенный белок как перспективный объект для разработки нового поколения антидепрессантов с нейрофизиологически обоснованным механизмом действия. В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова сконструирован и синтезирован низкомолекулярный миметик BDNF ГСБ-106, представляющий собой замещенный димерный дипептид, гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина). Установлено, что ГСБ-106 активирует специфические для BDNF рецепторы TrkB и их основные пострецепторные сигнальные пути MAPK/ERK и PI3K/AKT. ГСБ-106 проявил выраженную антидепрессивную активность в батарее тестов на грызунах при внутрибрюшинном введении в дозах 0.1–1.0 мг/кг. Поскольку при депрессии предпочтительной является пероральная лекарственная форма, что обусловлено длительностью курса фармакотерапии и проведением ее во внебольничных условиях, нами изучены антидепрессивные свойства ГСБ-106, перорально вводимого в виде фармацевтической субстанции и таблетированной лекарственной формы (ЛФ). В тесте вынужденного плавания по Порсолту проведено сравнительное исследование ГСБ-106 и классического антидепрессанта amitriptилина у крыс. Установлено, что антидепрессивная активность ГСБ-106 сохраняется при пероральном введении и проявляется в дозах 0.5–5.0 мг/кг для фармацевтической субстанции и 0.01–5.0 мг/кг для таблетированной формы. Таблетированная форма была активна в 50 раз более низких дозах, чем фармацевтическая субстанция, и по выраженности эффектов превосходила amitriptилин – «золотой стандарт» антидепрессантов. Таким образом, можно заключить, что как в виде субстанции, так и в виде таблетированной лекарственной формы ГСБ-106 обладает антидепрессивными свойствами, что позволяет рассматривать его в качестве перспективного антидепрессивного лекарственного средства, первого в классе – миметиков BDNF.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ГСБ-106, депрессия, димерный дипептидный миметик BDNF, пероральная лекарственная форма.

ВВЕДЕНИЕ

Экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о центральной роли мозгового нейротрофического фактора (brain derived neurotrophic factor, BDNF) в патогенезе депрессии [1]. Проявление антидепрессивных свойств наблюдали в экспериментах при внутримозговом введении BDNF [2–4]. Содержание BDNF снижено в плазме крови больных депрессией, а после лечения антидепрессантами возвращается к нормальным значениям [5]. Кроме того, сниженный уровень BDNF зарегистрирован в гиппокампе людей, страдавших депрессией, а также

у жертв суицида [6, 7]. Научно обосновано предположение, что патогенетическая роль BDNF в депрессии связана с регуляцией нейропластичности и нейрогенеза в гиппокампе [8], нарушение которых считается ведущим этиопатогенетическим фактором заболевания [9].

Очевидно, что BDNF является важным объектом для разработки антидепрессантов с патофизиологически обоснованным механизмом действия.

Физиологические эффекты BDNF, включая регуляцию нейрогенеза и поддержание нейропластичности, опосредованы рецепторами TrkB и основны-

ми путями трансдукции их сигнала – MAPK/ERK и PI3K/AKT [10, 11]. Нами созданы низкомолекулярные соединения, имитирующие бета-изгибы отдельных петлеобразных структур BDNF, и экспериментально доказана селективность вызываемой ими активации пострецепторных каскадов [12, 13]. При этом установлено, что миметики BDNF, селективно активирующие либо PI3K/AKT, либо MAPK/ERK, не обладают антидепрессивной активностью, что доказывает необходимость обоих пострецепторных сигнальных путей для проявления такой активности.

Рассматривая проблему с фармакологических позиций, следует отметить, что клиническое использование нативного BDNF ограничено его неудовлетворительными фармакокинетическими свойствами.

В связи с этим в качестве перспективного антидепрессанта в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова отобран дипептид ГСБ-106, миметик бета-изгиба четвертой петли BDNF, представляющий собой гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина) [14, 15]. Методом Вестерн-блот-анализа установлено, что ГСБ-106 активирует специфические для BDNF рецепторы TrkB и их пострецепторные сигнальные пути MAPK/ERK и PI3K/AKT [12, 16]. ГСБ-106 проявлял выраженную антидепрессивную активность в батарее валидированных фармакологических тестов на грызунах при внутрибрюшинном (в/б) введении в дозах 0.1–1 мг/кг [15, 17]. Предположительно, механизмы антидепрессивного действия ГСБ-106, как и полноразмерного белка, связаны с нейрогенезом и синаптогенезом. Влияние ГСБ-106 на нейрогенез доказано ранее на модели стресса у мышей, вызванного контактом с хищником [18].

Очевидно, что при депрессии предпочтительной является лекарственная форма для приема внутрь, что обусловлено длительностью курса фармакотерапии и ее проведением во внебольничных условиях. Поэтому в настоящем исследовании изучены антидепрессивные свойства ГСБ-106, вводимого перорально в виде как фармацевтической субстанции (ФС), так и созданной в Институте таблетированной лекарственной формы (ЛФ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Лекарственные средства

ФС ГСБ-106 синтезирована в отделе химии лекарственных средств НИИ фармакологии им. В.В. Закусова как описано ранее [15]. ЛФ ГСБ-106 для перорального применения разработана и произведена в опытно-технологическом отделе НИИ фармакологии им. В.В. Закусова и содержала 1% ФС

ГСБ-106 и 99% наполнителя, состоящего из лактозы, микрористаллической целлюлозы, сополимера полиэтиленгликоля-поливинилового спирта и стеарата магния.

Амитриптилин в инъекционной ЛФ произведен на Московском эндокринном заводе (Россия).

Животные

Эксперименты выполнены на 188 белых беспородных крысах-самцах массой 240–270 г, полученных в филиале «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства. Животных содержали в условиях вивария при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному гранулированному корму и воде в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Организация и проведение работ осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике НИИ фармакологии им. В.В. Закусова (протокол № 2 от 20 февраля 2017 г.).

Изучение антидепрессивной активности

Антидепрессивную активность ГСБ-106 у крыс определяли в тесте вынужденного плавания по Порсолту [19, 20]. Установка для оценки антидепрессивной активности представляла собой шесть сосудов цилиндрической формы диаметром 20 см и высотой 60 см, разделенных непрозрачными перегородками. Сосуды наполняли водой температурой 22°C на 40 см. Предварительно каждое животное помещали в сосуд с водой на 15 мин, после чего давали обсохнуть и возвращали в домашнюю клетку. Через 24 ч животных помещали в сосуд с водой на 5 мин, в течение которых оценивали время сохранения характерной позы иммобильности (отказ от активно-оборонительного и исследовательского поведения). Поведение животных регистрировали с помощью видеокамеры. Видеозапись эксперимента обрабатывали в полуавтоматическом режиме с помощью программы RealTimer («НПК Открытая Наука»).

Дизайн эксперимента

ФС ГСБ-106 растворяли в дистиллированной воде и вводили крысам ежедневно в течение 14 сут в дозах 0.1; 0.5; 1; 5 и 10 мг/кг перорально в объеме 1 мл/кг. Контрольные животные получали в том же

режиме дистиллированную воду. ЛФ ГСБ-106 суспендировали в 1% растворе крахмала и вводили крысам ежедневно в дозах 0.001; 0.01; 0.05 и 0.1 и 5.0 мг/кг перорально в объеме 1 мл/кг в течение 14 дней. Контрольные животные получали в том же режиме плацебо, представляющее собой суспензию наполнителя ЛФ в 1% растворе крахмала. В качестве препарата сравнения использовали классический трициклический антидепрессант amitриптилин, который разводили в дистиллированной воде и вводили крысам перорально в дозе 5.0 мг/кг [21] в объеме 1.0 мл/кг в течение 14 дней. Контрольным животным вводили дистиллированную воду в том же режиме. Через 24 ч после последнего введения препаратов проводили предварительную посадку крыс в цилиндры с водой для формирования депрессивноподобного состояния, еще через 24 ч осуществляли тестирование.

Статистический анализ

Межгрупповые различия оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента и *U*-теста Манна–Уитни (при сравнении более двух групп использовали поправку Бонферрони). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$. Данные представляли в форме средних и стандартных ошибок среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Антидепрессивная активность ФС ГСБ-106 при пероральном введении

Установлено, что крысы контрольной группы, получавшие дистиллированную воду, при тестировании в условиях вынужденного плавания по Порсолту после периода активности принимали характерную позу иммобильности (отказ от активно-оборонительного поведения) и сохраняли ее, с небольшими перерывами, до конца опыта. Время иммобильности у животных контрольной группы составило в разных экспериментах в среднем от 178 до 216 с. ГСБ-106 в виде ФС в дозах 0.5, 1.0 и 5.0 мг/кг статистически значимо ($p \leq 0.05$) снижал время иммобильности в 1.5, 1.2 и 1.6 раза соответственно по сравнению с контролем (таблица), что указывает на наличие антидепрессивной активности. В дозах 0.1 и 10 мг/кг ГСБ-106 не оказывал антидепрессивного действия, что свидетельствует о дозозависимости эффекта. При этом выраженность эффекта ФС ГСБ-106 в дозе 0.5 мг/кг была сравнима с выраженностью эффекта amitриптилина в дозе 5.0 мг/кг (перорально) (таблица).

Таким образом, установлено, что ГСБ-106 в виде ФС обладает антидепрессивной активностью при пероральном введении в дозе 0.5–5 мг/кг.

Антидепрессивная активность ЛФ ГСБ-106 при пероральном введении

Время иммобильности у крыс контрольной группы, получавших плацебо, составило в двух экспериментах 245.7 и 201 с. ЛФ ГСБ-106 при пероральном введении в дозе 0.01, 0.05, 0.1 и 5.0 мг/кг статистически значимо ($p < 0.01$) снижала время иммобильности у крыс в тесте вынужденного плавания по Порсолту в 1.6, 1.8, 1.5 и 2.2 раза соответственно по сравнению с контролем (таблица). Эффект ЛФ ГСБ-106 был дозозависимым и не проявлялся в дозе 0.001 мг/кг.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании установлено, что антидепрессивная активность дипептидного миметика BDNF ГСБ-106, выявленная ранее при в/б введении в интервале доз 0.1–1.0 мг/кг, сохранялась при пероральном введении и проявлялась в дозах 0.5–5.0 мг/кг для ФС и 0.01–5.0 мг/кг для ЛФ ГСБ-106. ЛФ ГСБ-106 была активна в 50 раз более низких дозах, чем ФС ГСБ-106, и по выраженности эффектов превосходила amitриптилин – «золотой стандарт» антидепрессантов.

Важно, что активность ГСБ-106 при пероральном введении сравнима с таковой при внутрибрюшинном введении. Такая устойчивость ГСБ-106 в биологических средах обусловлена отсутствием связей-мишеней протеаз, аминокептидаз и карбоксипептидаз благодаря дипептидной природе, наличию защиты на N- и C-концах соответственно. Это подтверждает перспективность и преимущество использования замещенных дипептидов в качестве пероральных лекарственных средств в сравнении с олигопептидами, которые легко деградируют в желудочно-кишечном тракте и не проникают через гастроинтестинальный барьер. Терапевтические олигопептиды, влияющие на ЦНС, применяются преимущественно в интраназальной форме, а олигопептиды с периферическими эффектами – в инъекционной форме. Однако показано, что дипептидные препараты, например ноотроп Ноопепт (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина), антипсихотик Дилепт (метиловый эфир N-капроил-L-пролил-L-тирозина) и анксиолитик ГБ-115 (амид N-фенилгексаноил-L-пролил-L-триптофана), сохраняют активность при пероральном введении [22, 23]. Как установлено ранее [24, 25], существуют специфические транспортные системы переноса дипептидов через энтеральную слизистую желудочно-кишечного тракта PEPT-1 и через гематоэнцефалический барьер PEPT-2.

Таким образом, можно заключить, что дипептид ГСБ-106 и его таблетированная лекарственная форма обладают антидепрессивными свойствами, что позволяет рассматривать ГСБ-106 в качестве

Антидепрессивные эффекты перорального введения ГСБ-106 у крыс, определенные в тесте вынужденного плавания по Порсолту

Антидепрессивный эффект ФС ГСБ-106				
Группа	n	Доза, мг/кг	Иммобильность, с	Время иммобильности, снижение по сравнению с контролем, разы
Контроль (вода)	8		177.9 ± 9.3	
Амитриптилин	8	5.0	134.5 ± 10.1*#	1.3
ГСБ-106	8	0.1	184.8 ± 16.6	
	8	0.5	116.9 ± 21.6#	1.5
Контроль (вода)	18		199.2 ± 10.0	
ГСБ-106	18	1.0	163.2 ± 7.9#	1.2
Контроль (вода)	10		216.3 ± 13.8	
ГСБ-106	10	5.0	137.1 ± 12.3*#	1.6
Контроль (вода)	10		190.8 ± 9.8	
ГСБ-106	10	10.0	202.2 ± 14.9	
Антидепрессивный эффект ЛФ ГСБ-106				
Группа	n	Доза, мг/кг	Иммобильность, с	Время иммобильности, снижение по сравнению с контролем, разы
Контроль (плацебо)	10		245.7 ± 13.4	
ГСБ-106	10	0.001	192.5 ± 13.2	
ГСБ-106	10	0.01	155.2 ± 20.3**	1.6
ГСБ-106	10	0.05	134.9 ± 18.8***	1.8
ГСБ-106	10	0.1	165.4 ± 15.1**	1.5
Контроль (плацебо)	10		201.2 ± 12.1	
ГСБ-106	10	1.0	159.9 ± 23.6#	1.3
ГСБ-106	10	5.0	92.8 ± 17.2***	2.2

Примечание. n – количество животных в группе. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. * – $p \leq 0.05$, ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$ по сравнению с контролем (U-тест Манна–Уитни); # – $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем (t-критерий Стьюдента).

оригинального антидепрессивного лекарственного средства, первого в классе.

ВЫВОДЫ

Димерный дипептидный миметик BDNF, ГСБ-106, обладает антидепрессивной активностью при пероральном введении. Разработанная лекарственная форма ГСБ-106 превосходит субстанцию как по дозам, так и по выраженности антидепрессивного эффекта.

Результаты настоящего исследования показывают целесообразность создания на основе дипептида

ГСБ-106 лекарственного средства, которое по дипептидной структуре и BDNF-ергическому механизму действия может быть отнесено к первому в классе. ●

Работа выполнена при поддержке гранта Президиума РАН «Изучение роли синаптогенеза и нейрогенеза в механизме антидепрессивной активности мозгового нейротрофического фактора с использованием его дипептидных миметиков – первых в классе потенциальных антидепрессантов» и при поддержке РФ (проект № 18-15-00381).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Castrén E., Kojima M. // Neurobiol. Dis. 2017. V. 97. Pt B. P. 119–126.
- Shirayama Y., Chen A.C., Nakagawa S., Russell D.S., Duman R.S. // J. Neurosci. 2002. V. 22. № 8. P. 3251–3261.
- Hoshaw B.A., Malberg J.E., Lucki I. // Brain Res. 2005. V. 1037. № 1–2. P. 204–208.
- Hu Y., Russek S.J. // J. Neurochem. 2008. V. 105. № 1. P. 1–17.
- Polyakova M., Stuke K., Schuemberg K., Mueller K., Schoenknecht P., Schroeter M.L. // J. Affect. Disord. 2015. V. 174. P. 432–440.
- Karege F., Vaudan G., Schwald M., Perroud N., La Harpe R. // Mol. Brain Res. 2005. V. 136. № 1–2. P. 29–37.
- Thompson R.M., Weickert C.S., Wyatt E., Webster M.J. // J.

- Psychiatry Neurosci. 2011. V. 36. № 3. P. 195–203.
8. Autry A.E., Monteggia L.M. // *Pharmacol. Rev.* 2012. V. 64. № 2. P. 238–258.
9. Wainwright S.R., Galea L.A. // *Neural Plast.* 2013. V. 2013. P. 805497.
10. Jiang C., Salton R. // *Transl. Neurosci.* 2013. V. 4. № 1. P. 46–58.
11. Islam O., Loo T.X., Heese K. // *Curr. Neurovasc. Res.* 2009. V. 6. № 1. P. 42–53.
12. Gudasheva T.A., Povarnina P., Logvinov I.O., Antipova T.A., Seredenin S.B. // *Drug Des. Dev. Ther.* 2016. V. 10. P. 3545–3553.
13. Gudasheva T.A., Tarasiuk A.V., Sazonova N.M., Povarnina P.Y., Antipova T.A., Seredenin S.B. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2017. V. 476. № 1. P. 291–295.
14. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Патент № 2410392 РФ. 2011.
15. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В., Логвинов И.О., Поварнина П.Ю., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // *Биоорг. химия.* 2012. Т. 38. № 3. С. 280–290.
16. Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // *Докл. Акад. наук.* 2013. Т. 451. № 5. С. 577–580.
17. Середенин С.Б., Воронина Т.А., Гудашева Т.А., Гарибова Т.Л., Молодавкин Г.М., Литвинова С.А., Елизарова О.А., Посева В.И. // *Acta Naturae.* 2013. Т. 5 № 4(19). С. 116–120.
18. Гудашева Т.А., Поварнина П.Ю., Середенин С.Б. // *Бюл. эксп. биологии и медицины.* 2016. Т. 162. № 10. С. 448–451.
19. Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M. // *Eur. J. Pharmacol.* 1978. V. 47. № 4. P. 379–391.
20. Buccafusco J.J. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2009. 360 p.
21. Takamori K., Yoshida S., Okuyama S. // *Pharmacology.* 2001. V. 63. № 3. P. 147–153.
22. Gudasheva T.A. // *Russ. Chem. Bull. Internat. Ed.* 2015. V. 64. № 9. P. 2012–2021.
23. Жердев В.П., Бойко С.С., Шевченко Р.В., Гудашева Т.А. // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2017. № 1. С. 3–10.
24. Sala-Rabanal M., Loo D.D., Hirayama B.A., Turk E., Wright E.M. // *J. Physiol.* 2006. V. 574. Pt 1. P. 149–166.
25. Ganapathy M.E., Prasad P.D., Mackenzie B., Ganapathy V., Leibach F.H. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. V. 1324. № 2. P. 296–308.