

УДК 615.214.32:577.27

# Антидепрессивный эффект оригинального низкомолекулярного миметика BDNF, димерного дипептида ГСБ-106

С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Т. А. Гудашева, Т. Л. Гарибова\*, Г. М. Молодавкин, С. А. Литвинова, О. А. Елизарова, В. И. Посева

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

\*E-mail: t\_garibova@mail.ru

Поступила в редакцию 13.03.2013

**РЕФЕРАТ** Большое число клинических и экспериментальных данных свидетельствуют о вовлечении в патогенез депрессии нейротрофинов, в частности BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Вместе с тем терапевтическое использование самого BDNF ограничивается его нестабильностью в биологических жидкостях, плохой способностью проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), наличием побочных эффектов. В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН на основе структуры четвертой петли BDNF сконструирован и синтезирован низкомолекулярный миметик ГСБ-106, представляющий собой замещенный димерный дипептид, гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина). Установлено, что ГСБ-106 при его внутрибрюшинном введении беспородным мышам и крысам оказывает антидепрессивное действие на различных моделях депрессивноподобного состояния. Эффект вещества выявляется при его ежедневном введении в течение 4–5 дней в тесте вынужденного плавания по Порсолту (0.1 и 1.0 мг/кг) и в тесте подвешивания мышей за хвост (1.0 и 1.5 мг/кг). В опытах на крысах в тесте вынужденного плавания в сосуде с вращающимися колесами по Номура эффект ГСБ-106 в дозе 0.1 и 0.5 мг/кг наблюдали при однократном применении. Полученные данные свидетельствуют в пользу гипотезы о вовлечении BDNF в патогенез различных форм депрессивных состояний, что открывает перспективу поиска новых оригинальных антидепрессантов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** BDNF, миметик, ГСБ-106, антидепрессивное действие, неизбежное плавание, подвешивание за хвост.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** MAO – моноаминоксидаза; BDNF (brain-derived neurotrophic factor) – мозговой нейротрофический фактор; ГСБ-106 – гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина); TrkB (tropomyosin-related kinase B) – тирозинкиназный рецептор типа B; АКТ (serine/threonine protein kinase) – серин/треониновая протеинкиназа; CREB (cAMP response element binding protein) – cAMP-зависимый транскрипционный фактор; ERK (extracellular signal-regulated kinase) – протеинкиназа, регулируемая внеклеточными сигналами.

## ВВЕДЕНИЕ

По данным ВОЗ, депрессией страдают 4–5% населения земного шара, а к 2030 году депрессии могут выйти на первое место по распространенности среди других заболеваний [1, 2]. Уже в настоящее время в экономически развитых странах эндогенными и психогенными депрессивными расстройствами страдают около 20% психически больных [3].

На протяжении многих лет в качестве основного патофизиологического механизма развития депрессивных расстройств рассматривается дезрегуляция основных моноаминергических систем головного моз-

га, включая серотонинергическую, норадренергическую, дофаминергическую. Применение практически всех используемых в настоящее время антидепрессантов, являющихся либо ингибиторами моноаминоксидазы (MAO), либо ингибиторами обратного захвата моноаминов, не всегда приводит к клинически требуемым результатам.

В последнее десятилетие накопилось много данных, свидетельствующих о важной роли изменений уровня нейротрофинов, особенно BDNF, в патогенезе депрессий [4–6]. Клинические исследования показывают, что в крови больных с глубокой депрессией со-

держание BDNF значительно снижено и восстанавливается при приеме антидепрессантов [7, 8].

На моделях депрессии показано, что при центральном введении BDNF проявляет выраженный антидепрессивный эффект [9, 10]. Об антидепрессивных свойствах BDNF свидетельствует также большая устойчивость к депрессии трансгенных мышей с повышенным уровнем этого нейротрофина [11]. Кроме того, выявлена положительная обратная связь между BDNF и серотонином [12].

Терапевтическое использование самого BDNF ограничивается его нестабильностью в биологических жидкостях, плохой способностью проникать через гематоэнцефалический барьер, возможностью иммунной реакции и побочными эффектами за счет его плейотропности.

В связи с этим перспективной представляется стратегия создания на основе низкомолекулярных миметиков BDNF новых веществ, которые обладали бы антидепрессивной активностью при системном введении и не имели побочных эффектов полноразмерного нейротрофина. Описан ряд низкомолекулярных миметиков BDNF. Так, группа австралийских исследователей сконструировала димерные бициклические и трициклические пептиды на основе второй петли с агонистической активностью [13]. Группой американских ученых [14] также на основе второй петли получены семь непептидных соединений. Вместе с тем отсутствуют данные об антидепрессивной активности описанных миметиков BDNF.

В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН на основе структуры четвертой петли BDNF сконструирован и синтезирован низкомолекулярный миметик ГСБ-106 [15, 16], представляющий собой замещенный димерный дипептид, гексаметилендиамид бис(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина). ГСБ-106 был отобран в процессе фармакологического скрининга из четырех соединений, миметиков первой и четвертой петель BDNF, как димерный дипептид, обладающий антидепрессивной активностью у мышей линии Valb/c при однократном введении в тесте вынужденного плавания по Порсолту [16].

Исследования ГСБ-106 *in vitro* на культуре иммортализованных клеток линии HT22 гиппокампа мыши показали, что в концентрации от  $10^{-5}$  до  $10^{-8}$  М это соединение проявляет нейропротективную активность на моделях окислительного стресса и глутаматной токсичности. Нейропротективное действие ГСБ-106 выявлено также на клетках линии SH-SY5Y нейробластомы человека в условиях действия нейротоксина 6-оксидофамина [17].

Цель настоящей работы состояла в изучении антидепрессивных свойств ГСБ-106 на различных моде-

лях депрессивных состояний на беспородных мышах и крысах как при однократном, так и субхроническом введении.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГСБ-106 изучали на белых беспородных крысах-самцах (2–2.5 мес., масса 270–290 г) и мышах-самцах массой 22–25 г, полученных из Центрального питомника лабораторных животных «Столбовая» (Московская обл.). Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики и нормативным документам «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев». Исследование проведено в соответствии с Приказом МЗ и СР РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики». В исследовании использовали ГСБ-106, синтезированный в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН.

Антидепрессивную активность соединений оценивали в тестах неизбегаемого плавания по Порсолту [18], вынужденного плавания в сосуде с вращающимися колесами по Номура [19] и в тесте подвешивания мышей за хвост по Стеру (Steru) [20].

Установка для создания депрессивноподобного состояния (поведенческого отчаяния) по методу Порсолта у мышей представляет собой сосуд цилиндрической формы диаметром 10 см и высотой 30 см. Сосуд на высоту 18 см наполняют водой, температура которой поддерживается на уровне 27°C. Предварительно, за 1 сут до тестирования, каждое животное опускают в сосуд с водой на 5–6 мин для адаптации. В день эксперимента животное помещают в сосуд с водой таким образом, чтобы оно не могло ни выбраться из сосуда, ни найти в нем опору. Попадая в воду, животные начинают проявлять бурную двигательную активность, направленную на поиск выхода из авersive стрессорной ситуации, но затем оставляют эти попытки и зависают в воде в характерной позе, оставаясь полностью неподвижными или совершая незначительные движения, необходимые для поддержания головы над поверхностью воды. Это поведение расценивается как проявление отчаяния, подавленности, депрессивноподобного состояния [18]. Показателем выраженности депрессивноподобного состояния в данном тесте служит длительность неподвижности, т.е. сумма эпизодов иммобилизации у каждого животного в течение 6 мин наблюдения. Критерием антидепрессивной активности считается статистически значимое уменьшение длительности иммобилизации.

Для создания депрессивноподобного состояния у крыс по методу Номура [19] в сосуде с водой и свободно вращающимися колесами была использована четырехканальная установка, разработан-

Таблица 1. Антидепрессивное действие ГСБ-106 у мышей (по Порсолту)

Доза в/б введения ГСБ-106, мг/кг, 1 раз в сутки	Кратность введения	Время иммобилизации, с (M ± SEM)
Контроль (физ. раствор)	1	255.61 ± 25.07
0.1	1	206.29 ± 33.35
1.0	1	204.83 ± 26.67
Контроль (физ. раствор)	5	278.38 ± 12.02
0.1	5	231.41 ± 11.22*
Контроль (физ. раствор)	4	271.73 ± 13.37
1.0	4	205.76 ± 11.02*
Контроль (физ. раствор)	1	238.50 ± 15.37
Амитриптилин, 10.0 мг/кг	1	134.62 ± 23.42*

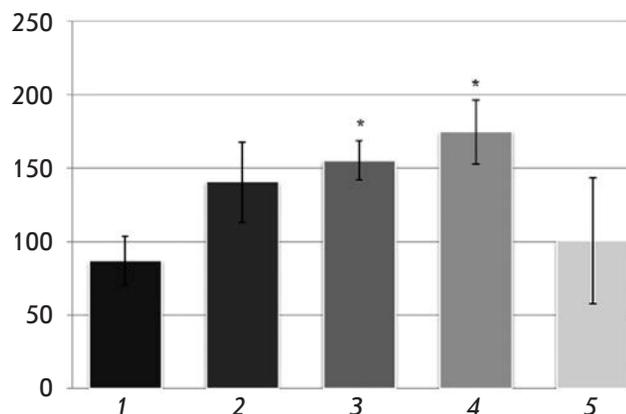
\* –  $p < 0.05$  – статистическая значимость различий по критерию Манна–Уитни в сравнении с группой контроля.

ная в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН [21]. Установка представляет собой сосуд размером 64 × 30 × 42 см, разделенный на четыре равных отсека. В отсеках находятся колеса шириной 11 см с 12 лопастями шириной 2 см, наружный диаметр колес 10 см. На краях каждого колеса укреплены магниты, а над колесами – герконы, которые срабатывают каждый раз, когда магнит проходит под ними, и таким образом происходит автоматическая регистрация оборотов колес, служащая объективной мерой активности животных. Сосуд заполняли водой с температурой 25°C до середины колес. Крыс помещали в каждый отсек мордой от колеса и регистрировали число оборотов колес в течение 10 мин с помощью электромеханических счетчиков.

В тесте подвешивания мышей за хвост [20] животных привязывали за хвост на горизонтальную перекладину. Сначала животные, попадая в стрессорные условия, начинают проявлять двигательную активность, направленную на поиск выхода из аверсивной ситуации, но затем оставляют эти попытки и висят на перекладине, оставаясь почти полностью неподвижными.

Дипептид ГСБ-106 растворяли в дистиллированной воде и вводили животным внутривентрикулярно в дозах 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 и 1.5 мг/кг за 30 мин до тестирования, однократно или повторно раз в день в течение 4–5 дней. Контрольные животные получали в том же режиме физиологический раствор.

Статистическую обработку результатов проводили по программе Biostatistics III с использованием методов Стьюдента и Манна–Уитни.



Антидепрессивное действие ГСБ-106 в тесте депрессивного состояния по Номура. Доза в/б введения ГСБ-106, мг/кг: 1 – контроль; 2 – 0.01; 3 – 0.1; 4 – 0.5; 5 – 1.0. По вертикали – число оборотов колеса. \* –  $p < 0.05$  статистическая значимость отличий от контрольной группы по критерию Манна–Уитни

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Антидепрессивное действие ГСБ-106 в тесте вынужденного плавания по Порсолту у мышей

Установлено, что у контрольных мышей после периода активности возникает иммобилизация, величина которой в разных группах составляет 238–278 с (табл. 1). При однократном введении ГСБ-106 в дозе 0.1 и 1.0 мг/кг уменьшает время иммобилизации на уровне тенденции (табл. 1).

При субхроническом пятидневном введении ГСБ-106 в дозе 0.1 мг/кг или четырехдневном введении в дозе 1.0 мг/кг корректирует поведение животных в тесте вынужденного плавания, статистически значимо уменьшая время эпизодов иммобилизации по сравнению с контрольной группой: в 1.2 раза при использовании ГСБ-106 в дозе 0.1 мг/кг и в 1.3 раза при введении ГСБ-106 в дозе 1.0 мг/кг (табл. 1).

Таким образом, в тесте поведенческого отчаяния по Порсолту ГСБ-106 в дозе 0.1 и 1.0 мг/кг при повторном 4–5-дневном введении обладает антидепрессивным влиянием, которое выражается в статистически значимом уменьшении времени иммобилизации животных. Описано увеличение антидепрессивного эффекта при многократном введении и самого BDNF. Так, при однократной билатеральной инъекции в гиппокамп BDNF (0.25–1.0 мкг) уменьшал время иммобилизации в 2 раза [10], а при семидневной инфузии в средний мозг крысам в дозе 12–24 мкг/день уменьшал время иммобилизации в тесте неизбежного плавания по Порсолту в 3 раза [9].

**Антидепрессивное действие ГСБ-106 в тесте депрессивноподобного состояния по Номура у крыс**

Установлено, что крысы контрольной группы совершают в среднем 87 оборотов колес за 5 мин регистрации (рисунки). ГСБ-106 в дозе 0.01 мг/кг не вызывает увеличения оборотов колес, но при повышении дозы ГСБ-106 до 0.1 мг/кг выявляется отчетливая антидепрессивная активность вещества, о чем свидетельствует статистически значимое увеличение (в 1.8 раза) числа совершаемых крысами оборотов колес по сравнению с показателями контрольных животных (рисунки). Антидепрессивный эффект ГСБ-106 в дозе 0.5 мг/кг усиливается, и число совершаемых крысами оборотов колес увеличивается в 2 раза. Однако при дальнейшем увеличении дозы ГСБ-106 до 1.0 мг/кг его антидепрессивный эффект уменьшается, и показатель оборота колес не отличается от показателя у контрольных животных (рисунки).

Таким образом, ГСБ-106 в дозе 0.1 и 0.5 мг/кг оказывает отчетливое антидепрессивное действие в тесте вынужденного плавания по Номура. Кривая зависимости доза–эффект ГСБ-106 имеет колоколообразный характер.

**Антидепрессивное действие ГСБ-106 в тесте депрессивноподобного состояния, вызванного подвешиванием мышей за хвост**

Установлено, что в контрольной группе животных среднее время иммобилизации при подвешивании за хвост составляет в разных группах 174 и 148 с. ГСБ-106 при субхроническом (4 дня) внутрибрюшинном введении в дозе 0.1 и 0.5 мг/кг не изменяет продолжительность иммобилизации мышей в этом тесте по сравнению с контролем. Вместе с тем при повышении дозы ГСБ-106 оказывает отчетливый антидепрессивный эффект. В дозе 1.0 и 1.5 мг/кг ГСБ-106 (4 дня, внутрибрюшинно) статистически значимо ( $p = 0.04$ ) уменьшает (в 1.3 раза) время иммобилизации мышей в тесте подвешивания за хвост (табл. 2).

Таким образом, антидепрессивное действие дипептида ГСБ-106 отчетливо выражено в условиях трех валидированных методов моделирования депрессивноподобного состояния: в тесте поведенческого отчаяния по Порсолту (0.1 и 1.0 мг/кг, 4–5 дней), в тесте вынужденного плавания в сосуде с вращающимися колесами по Номура (0.1 и 0.5 мг/кг, однократно) и в тесте подвешивания мышей за хвост по Стеру (1.0 и 1.5 мг/кг, 4 дня).

Важно, что антидепрессивный эффект ГСБ-106 выявляется при его системном внутрибрюшинном введении беспородным мышам и крысам как однократно, так и повторно ежедневно в интервале доз

**Таблица 2.** Антидепрессивное действие ГСБ-106 при субхроническом (4 дня) введении в тесте депрессивноподобного состояния, вызванного подвешиванием мышей за хвост

Доза в/б введения ГСБ-106, мг/кг	Время иммобилизации, с ( $M \pm SEM$ )
Контроль (физ. раствор)	174.00 $\pm$ 10.4
0.1	145.20 $\pm$ 15.81
1.0	135.50 $\pm$ 12.85*
Контроль (физ. раствор)	148.25 $\pm$ 6.38
0.5	126.22 $\pm$ 9.89
1.5	120.13 $\pm$ 10.53*

\*Статистическая значимость отличий от контроля, при  $p \leq 0.05$  ( $t$ -критерий Стьюдента).

0.1–1.5 мг/кг. Более выраженный эффект ГСБ-106 у крыс, по-видимому, связан с видовыми различиями и методическими особенностями оценки.

Как отмечалось выше, согласно нейротрофиновой теории развития депрессии низкие уровни BDNF в центральной нервной системе приводят к повреждению структур головного мозга и развитию депрессивных состояний, а применение антидепрессантов или введение животным BDNF корректирует эти нарушения. Полученный в настоящей работе антидепрессивный эффект ГСБ-106 сходен с эффектом BDNF при интравентрикулярной инфузии или введении последнего в отделы мозга животных, ответственные за депрессию [8–10]. В работе Schmidt и Duman [22] системное (подкожное) введение мышам рекомбинантного BDNF вызывало антидепрессивный эффект, характеризующийся уменьшением в 1.5 раза иммобилизации в тесте вынужденного плавания. Вместе с тем этот эффект BDNF наблюдался лишь при его использовании в дозах, в 6–7 раз превышающих дозы ГСБ-106, и только после длительного (7–14 сут) введения. Функциональными последствиями антидепрессивного действия рекомбинантного BDNF была индукция нейрогенеза в гиппокампе и среднем мозге, механизм которой авторы связывают с выявленным увеличением уровня BDNF и повышением уровня активации/фосфорилирования ERK и CREB нижележащих мишеней сигнальных путей BDNF-TrkB [22]. Ранее мы установили, что ГСБ-106, миметик BDNF, активирует TrkB и его сигнальные пути ERK и АКТ [23], вовлеченные в выживаемость нейронов, и этим, возможно, определяется его антидепрессивный эффект. Причем способность фосфорилировать TrkB у димерного дипептида ГСБ-106 была селективной, так как на клетках линии PC12,

не экспрессирующей полноразмерный TrkB, но экспрессирующей другие рецепторы нейротрофинов, нейропротективная активность у ГСБ-106 не была выявлена [23].

Полученные нами данные об антидепрессивной активности низкомолекулярного миметика BDNF

ГСБ-106, с одной стороны, подтверждают гипотезу о вовлечении BDNF в патогенез различных форм депрессивных состояний, а с другой – открывают перспективу разработки на основе вновь синтезированного соединения нового оригинального по структуре и механизму действия антидепрессанта. ●

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бюллетень ВОЗ. 10 фактов о глобальном бремени болезней // 2008. [http://www.who.int/features/factfiles/global\\_burden/ru/index.html](http://www.who.int/features/factfiles/global_burden/ru/index.html)
2. Sartorius N. // *Med. Res.* 2001. V. 1. P. 20–21.
3. Wittchen H.U. // *Обзорение психиатр. и мед. психологии им. В.М. Бехтерева.* 2005. № 4. С. 42–46.
4. Angelucci F., Mathe A.A., Aloe L. // *Progr. Brain Res.* 2004. V. 146. P. 151–165.
5. Yu H., Chen Z.Y. // *Acta Pharmacol. Sinica.* 2011. V. 32. P. 3–11.
6. Neto F.L., Borges G., Torres-Sanchez S., Mico J.A., Berrocoso E. // *Curr. Neuropharmacology.* 2011. V. 9. № 4. P. 530–552.
7. Karege F., Perret G., Bondolfi G., Schwald M., Bertschy G., Aubry J.M. // *Psychiatry Res.* 2002. V. 109. P. 143–148.
8. Chen B., Dowlatshahi D., MacQueen G.M., Wang J.F., Young L.T. // *Biol. Psychiatry.* 2001. V. 50. P. 260–265.
9. Siuciak J.A., Lewis D.R., Wiegand S.J., Lindsay R.M. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1997. V. 56. P. 131–137.
10. Shirayama J., Chen A.C., Nakagawa S., Russel R.S., Duman R.S. // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. P. 3251–3261.
11. Govindarajan A., Rao B.S.S., Nair D., Trinh M., Mawjee N., Tonegawa S., Chattarji S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 35. P. 13208–13213.
12. Siuciak J.A., Altar C.A., Wiegand S.J., Lindsay R.M. // *Brain Res.* 1994. V. 663. P. 326–330.
13. O'Leary P.D., Huges R.A. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 25738–25744.
14. Massa S.M., Yang T., Xie Y., Shi J., Bilgen M., Joyce J.N., Nehama D., Rajadas J., Longo F.M. // *J. Clin. Investigation.* 2010. V. 120. P. 1774–1785.
15. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. // *Пат. РФ № 2410392.* 2011. Приоритет от 16.02.2009.
16. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В., Логвинов И.О., Поварнина П.Ю., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // *Биоорган. химия.* 2012. Т. 38. С. 280–290.
17. Логвинов И.О., Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Антипов П.И., Середенин С.Б. // *Бюл. эксп. биол. мед.* 2013. Т. 155. № 3. С. 319–323.
18. Porsolt B.D., Bertin A., Jalfre M. // *Eur. J. Pharmacol.* 1978. V. 51. P. 291–294.
19. Nomura S., Shimizu J., Kinjo M., Kametani H., Nakazava T. // *Eur. J. Pharmacol.* 1982. V. 83. P. 171–175.
20. Steru L., Chermat R., Thierry B., Simon P. // *Psychopharmacology.* 1985. V. 85. P. 367–370.
21. Молодавкин Г.М., Воронина Т.А., Мдзинаришвили А.Л. // *Эксп. клин. фармакология.* 1994. Т. 1. С. 3–5.
22. Schmidt H.D., Duman R.S. // *Neuropsychopharmacology.* 2010. V. 35. P. 2378–2391.
23. Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // *ДАН.* 2013. Т. 451. № 5. С. 577–580.