

# Димерные дипептидные миметики 3-й и 4-й петель фактора роста нервов активны на модели ишемического инсульта

Поварнина П.Ю.<sup>1</sup>, Гудашева Т.А.<sup>1</sup>, Середенин С.Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – Отдел химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

<sup>2</sup> – Отдел фармакогенетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

**Резюме.** Изучена фармакологическая активность димерных дипептидных миметиков 3-й и 4-й петель фактора роста нервов, соответственно ГТС-115 и ГК-2, на модели ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс. Оба соединения при в/б субхроническом введении (0,5–1 мг/кг/сутки, 7 суток, начало введения через 4 ч после операции) статистически достоверно снижали объём инфаркта мозга, по данным морфометрии срезов мозга, окрашенных трифенилтетразолий-2,3,5 хлоридом (ТТХ): ГТС-115 на 25% и ГК-2 – на 35%. Миметик 4-й петли NGF ГК-2, как наиболее активное соединение, был отобран для дальнейшей разработки в качестве потенциального лекарственного средства.

**Ключевые слова:** димерный дипептидный миметик, фактор роста нервов, нейропротекция, ишемический инсульт, окклюзия средней мозговой артерии

## Dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor loops 3 and 4 are active in a model of ischemic stroke

Povarnina P.Y.<sup>1</sup>, Gudasheva T.A.<sup>1</sup>, Seredenin S.B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – Department of Medicinal Chemistry, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

<sup>2</sup> – Department of Pharmacogenetics, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

**Abstract.** Pharmacological activity of dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor loops 3 and 4, correspondingly GTS-115 and GK-2, was studied in a model of ischemic stroke, induced by transient middle cerebral artery occlusion in rats. The both compounds, at i.p. subchronic administration (0,5-1 mg/kg/day, 7 days, beginning at 4 hours after surgery), significantly reduced cerebral infarct volume as was estimated by morphometry of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) -stained brain slices: GTS-115 by 25% and GK-2 by 35%. Mimetic of NGF loop 4 (GK-2), which is the most active compound, was selected for further development as a potential therapeutic agent.

**Keywords:** dimeric dipeptide mimetic, nerve growth factor, neuroprotection, ischemic stroke, middle cerebral artery occlusion

Автор, ответственный за переписку:

Поварнина Полина Юрьевна — ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8; тел. +7 (905) 789-30-31; e-mail: povarnina@gmail.com

## Введение

За последние десятилетия накоплено множество данных, подтверждающих высокий терапевтический потенциал фактора роста нервов (NGF — nerve growth factor) для лечения ряда нейродегенеративных и других заболеваний, в частности ишемического инсульта. На основе разных подходов во всём мире предпринимаются попытки преодоления ограничений применения NGF в клинике, связанные с его белковой природой.

В НИИ фармакологии имени В. В. Закусова были сконструированы и синтезированы димерные дипептидные миметики наиболее экспонированных наружу участков β-изгибов 4-й и 3-й петель NGF, соответственно гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина) (рабочий шифр ГК-2) и гексаметилендиамид бис-(*N*-гамма-оксибутирил-*L*-лизил-*L*-гистидина) (рабочий шифр ГТС-115) [1, 2].

Ранее было установлено, что оба миметика проявляют нейропротекторную активность *in vitro* в микро-наномолярных концентрациях на модели окислительного

стресса в культуре гиппокампальных нейронов HT-22 [2, 3]. Методом Вестерн-блот анализа было показано, что оба соединения активируют специфичные для NGF TrkA рецепторы, но имеют разную картину активации пострецепторных сигнальных путей: ГТС-115 активирует оба основных TrkA пострецепторные сигнальные пути, MAPK/ERK и PI3K/AKT (неопубликованные данные), а ГК-2 селективно активирует PI3K/AKT путь [4].

**Целью данной работы** являлось сравнительное изучение фармакологических эффектов димерных дипептидных миметиков 4-й и 3-й петель NGF на модели ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс.

## Материалы и методы

**Материалы и реактивы.** Дипептиды ГК-2 (гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина)) и ГТС-115 (гексаметилендиамид бис-(*N*-гамма-оксибутирил-*L*-лизил-*L*-гистидина)) были синтезированы в ФГБНУ «НИИ фармаколо-

гии имени В.В. Закусова. Хлоралгидрат был получен в фирме Merck and Co., Inc. (USA). Трифенилтетразолий-2,3,5 хлорид (ТТХ) был получен в компании Sigma-Aldrich (USA).

**Животные.** Эксперименты были проведены на беспородных крысах-самцах массой 250–290 г на момент начала эксперимента, полученных из Государственного предприятия Питомника лабораторных животных «Столбовая» при РАМН. Животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к корму и воде. При работе с крысами соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

**Моделирование ишемического инсульта.** Ишемический инсульт моделировали внутрисосудистым перекрытием средней мозговой артерии нитью по методике, впервые описанной E.Z. Longa et al. (1989) [5]. Крыс наркотизировали 5% раствором хлоралгидрата (350 мг/кг, внутривентриально), выполняли срединный разрез в области шеи и выделяли правые общую сонную артерию, внешнюю сонную артерию и внутреннюю сонную артерию. Накладывали лигатуры на внешнюю и внутреннюю сонные артерии и микрососудистую клипсу на общую сонную артерию. После этого перерезали внешнюю сонную артерию дистальнее лигатуры. Гепаринизированную нейлоновую нить диаметром 0,25 мм, покрытую силиконом, вводили через культю внешней сонной артерии на глубину 19–20 мм, до перекрытия средней мозговой артерии и фиксировали клипсой. Перекрытие кровотока осуществляли в течение 1 ч, после чего нить извлекали. Ложнооперированные животные подвергались тем же процедурам, что и оперированные, за исключением перерезания сосудов и введения нити.

**Дизайн исследования.** Оперированных животных случайным образом делили на 2 группы. Животным первой группы через 4 ч после операции, а затем раз в сутки в течение 6 дней внутривентриально (в/б) вводили ГК-2 (0,5 мг/кг) или ГТС-115 (1 мг/кг), растворённые в дистиллированной воде из расчёта 2 мл/кг. Выбор дозы исследуемых соединений был осуществлён на основании предварительных экспериментов. Ложнооперированные и оперированные нелеченые животные получали в/б дистиллированную воду. Массу тела крыс измеряли перед операцией, а также на 3-и и 7-е сутки после операции. На 7-е сутки животных декапитировали и определяли объём инфаркта с помощью анализа отсканированных изображений срезов мозга, окрашенных ТТХ. Фармакологические свойства ГК-2 и ГТС-115 были изучены в отдельных экспериментах.

**Определение объёма инфаркта.** Для оценки объёма инфаркта мозга животных под глубоким наркозом (хлоралгидрат, 350 мг/кг, в/б) декапитировали, головной мозг извлекали и замораживали при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин. Затем мозг нарезали на 5 фронтальных

срезов по 1,7 мм толщиной. Срезы головного мозга окрашивали в 2% растворе ТТХ в фосфатном буфере при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 20 мин. Окрашенные срезы затем фиксировали в 10% растворе формалина, помещали на предметные стекла и сканировали с обеих сторон с разрешением 2400 dpi на сканере LaserJet M1212nf MFP. Анализ цифровых изображений проводили с помощью свободно распространяемой программы анализа медицинских изображений Image J. Объём инфаркта (V) определяли по формуле:  $V = 1,7 \times \sum S_i / 2$ , где  $\sum S_i$  — сумма площадей области повреждения (неокрашенные участки) на срезах.

**Статистика.** Межгрупповые различия оценивали с помощью U критерия Манна–Уитни. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В табл. 1 показана гибель животных в течение 7 суток после операции. Статистически достоверных межгрупповых различий по данному параметру выявлено не было.

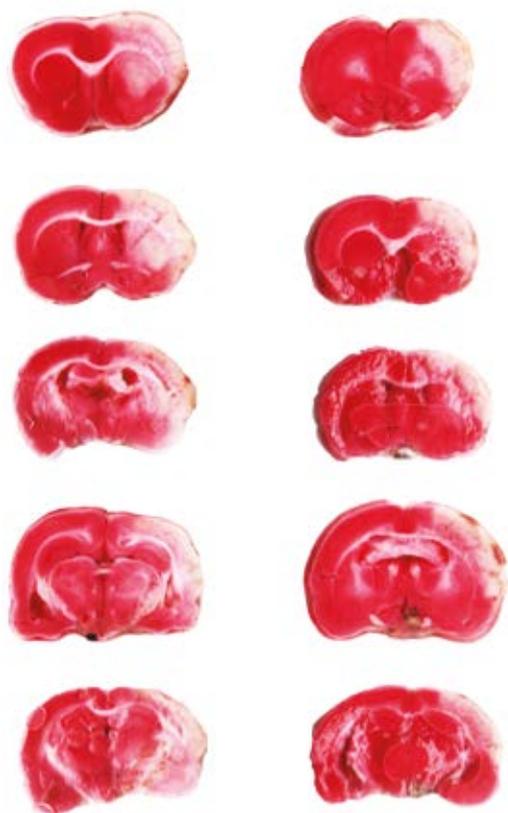
У оперированных нелеченых животных наблюдалась выраженная область повреждения в правом полушарии головного мозга. По результатам эксперимента с ГК-2 морфометрии срезов мозга, окрашенных ТТХ, объём зоны некроза составлял 250–300 мм<sup>3</sup>. Оба исследуемых соединения — ГК-2 и ГТС-115 — вызывали значительное снижение объёма повреждения мозга по сравнению с оперированными нелечеными животными. ГК-2 (0,5 мг/кг/сутки, в/б, 7 сут) снижал объём повреждения на 35% (рис. 1) и ГТС-115 (0,5 мг/кг/сутки, в/б, 7 суток) — на 25% (рис. 2).

Таблица 1

Число выживших животных в течение 7 суток после операции

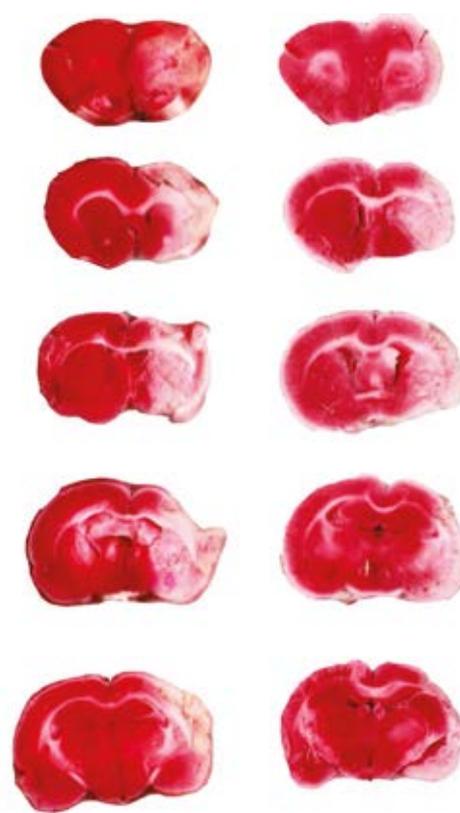
Группа	Дни после операции, число выживших животных						
	Эксперимент с ГК-2						
	1	2	3	4	5	6	7
Л.о.	8	8	8	8	8	8	8
МСаО	13	13	11	11	11	11	11
МСаО+ГК-2	12	12	10	10	10	10	10
Эксперимент с ГТС-115							
Л.о.	6	6	6	6	6	6	6
МСаО	9	6	6	6	6	6	6
МСаО+ГТС-115	7	7	7	7	7	7	7

**Примечание:** «Л.о.» — ложная операция; «МСаО» — группа животных с ишемическим инсультом, вызванным транзиторной окклюзией средней мозговой артерии (МСаО — middle cerebral artery occlusion); «МСаО+ГК-2» и «МСаО+ГТС-115» — группы животных с ишемическим инсультом, вызванным транзиторной окклюзией средней мозговой артерии, леченые соответственно ГК-2 (0,5 мг/кг в сутки, в/б, 7 сут) или ГТС-115 (1 мг/кг в сутки, в/б, 7 сут).



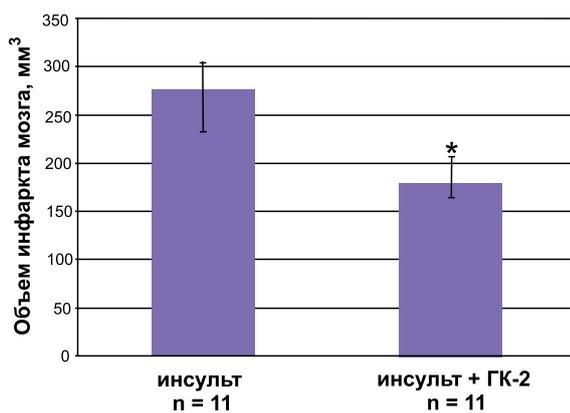
Срезы головного мозга крысы из группы «инсульт»

Срезы головного мозга крысы из группы «инсульт + ГК-2»

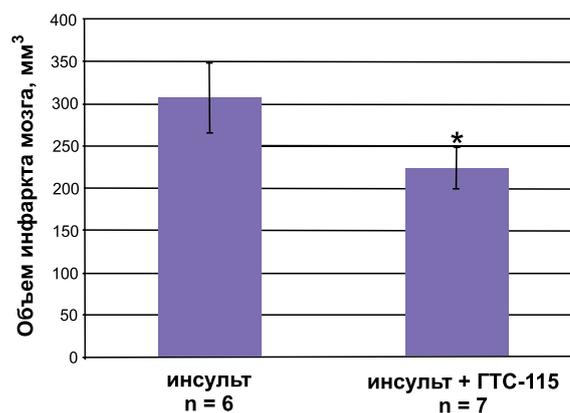


Срезы головного мозга крысы из группы «инсульт»

Срезы головного мозга крысы из группы «инсульт + ГТС-115»



**Рис. 1.** Снижение объёма инфаркта мозга в условиях транзиторной окклюзии средней мозговой артерии у крыс после введения ГК-2 (0,5 мг/кг/сутки, в/б, 7 суток, начало введения через 4 ч после операции). Объём инфаркта мозга оценивали на 7-е сутки после операции с помощью морфометрии срезов мозга, окрашенных ТТХ. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего; \* —  $p < 0,05$  (U тест Манна–Уитни)



**Рис. 2.** Снижение объёма инфаркта мозга в условиях транзиторной окклюзии средней мозговой артерии у крыс после введения ГТС-115 (1 мг/кг/сутки, в/б, 7 суток, начало введения через 4 ч после операции). Объём инфаркта мозга оценивали на 7-е сутки после операции с помощью морфометрии срезов мозга, окрашенных ТТХ. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего; \* —  $p < 0,05$  (U тест Манна–Уитни)

Таким образом, выраженность нейропротекторных эффектов миметика 4-й петли NGF ГК-2 была выше, чем у миметика 3-й петли NGF ГТС-115. Эти данные согласуются с результатами, ранее полученными *in vitro*. Дипептид ГК-2 проявлял нейропротекторную активность на модели окислительного стресса в культуре гиппокампальных нейронов НТ-22 в концентрациях  $10^{-5}$ – $10^{-9}$  [3], а ГТС-115 в тех же условиях был активен в концентрациях  $10^{-5}$ – $10^{-8}$  М [2]. Выращенность нейропротекторных эффектов у ГК-2 была выше, чем у ГТС-115 в соответствующих концентрациях. Это можно объяснить разным вкладом 3-й и 4-й петель NGF в нейропротекцию.

Из литературы известно, что нейропротекторная активность нейротрофинов, в частности NGF, опосредована в основном PI3K/AKT путём [6]. MAPK/ERK путь отвечает за дифференцирующую активность, а в случае с NGF вовлечён в развитие гипералгезии [7]. Таким образом, миметик 4-й петли NGF, селективно активирующий PI3K/AKT сигнальный путь, обладает более предпочтительными фармакологиче-

скими характеристиками, чем ГТС-115, активирующий PI3K/AKT и MAPK/ERK пути.

На основании полученных в данной работе результатов димерный дипептидный миметик 4-й петли NGF ГК-2 был отобран для дальнейшего изучения в качестве потенциального нейропротекторного средства для лечения острых нарушений мозгового кровообращения.

## Выводы

Установлено, что димерные дипептидные миметики 3-й и 4-й петель NGF обладают NGF-подобной нейропротекторной активностью на модели ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс. При этом активации PI3K/AKT сигнального пути достаточно для проявления этой активности. Наиболее активный миметик 4-й петли NGF ГК-2 был отобран для дальнейшей разработки в качестве потенциального лекарственного средства.

## Литература

1. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Дипептидные миметики нейротрофинов NGF и BDNF. Патент РФ № 2410392.
2. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Сазонова Н.М., Логвинов И.О., Поварнина П.Ю., Константинопольский М.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Дизайн, синтез и нейропротекторные эффекты димерного дипептидного миметика 3-й петли фактора роста нервов ГТС-115. *Биоорганическая химия*. 2016 (в печати).
3. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов. *Доклады Академии Наук*. 2010; 434: 4: 262–265.

4. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Константинопольский М.А., Поварнина П.Ю., Середенин С.Б. Оригинальный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 избирательно активирует пострецепторные пути TrkA, не вызывая побочных действий полноразмерного нейротрофина. *Доклады Академии наук*. 2014; 456: 1: 88–91.
5. Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989; 1: 84–91.
6. Kaplan D.R., Miller F.D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000; 10: 3: 381–391.
7. Obata K., Noguchi K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci.* 2004; 74: 21: 2643–5263.