

Цитопротекторные свойства дипептидных миметиков фактора роста нервов и мозгового нейротрофического фактора, ГК-2 и ГСБ-106, в модели окислительного стресса у инфузорий

Карпухина О.В.¹, Иноземцев А.Н.¹, Гумаргалиева К.З.²,
Поварнина П.Ю.³, Гудашева Т.А.³

¹ – Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

² – Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва

³ – ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. *Актуальность.* В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова были созданы димерные дипептидные миметики фактора роста нервов (nerve growth factor, NGF) и мозгового нейротрофического фактора (brain derived neurotrophic factor, BDNF), соответственно ГК-2 и ГСБ-106. Установлено подобие ГК-2 и ГСБ-106 соответствующим полноразмерным нейротрофинам по механизму действия и фармакологическим свойствам, включая выраженную нейропротекторную активность *in vitro* и *in vivo*. *Целью* данной работы было получение дополнительных данных о цитопротекторных свойствах ГК-2 и ГСБ-106 с использованием инфузорий. *Методы.* Окислительный стресс у инфузорий *Paramecium caudatum* моделировали добавлением в среду солей тяжёлых металлов (хлорид кадмия, ацетат свинца, сульфат меди, сульфат цинка) в конечных концентрации 10 мкМ. За 45 мин до внесения инициатора окислительного стресса в среду с опытными клетками добавляли ГК-2 или ГСБ-106 в концентрациях от 10^{-5} до 10^{-8} М. *Результаты.* Дипептиды ГК-2 и ГСБ-106 во всех изученных концентрациях защищали клетки от гибели. Максимальный нейропротекторный эффект дипептиды проявляли в концентрации 10^{-8} М, полностью предотвращая гибель инфузорий. *Заключение.* ГК-2 и ГСБ-106 в концентрации 10^{-8} М полностью защищают от гибели инфузории *Paramecium caudatum* в условиях окислительного стресса, вызванного солями тяжёлых металлов.

Ключевые слова: фактор роста нервов; мозговой нейротрофический фактор; димерные дипептидные миметики; инфузории *Paramecium caudatum*; цитопротекция; окислительный стресс, вызванный солями тяжёлых металлов.

Для цитирования:

Карпухина О.В., Иноземцев А.Н., Гумаргалиева К.З., Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А. Цитопротекторные свойства дипептидных миметиков фактора роста нервов и мозгового нейротрофического фактора, ГК-2 и ГСБ-106, в модели окислительного стресса у инфузорий // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – № 4. – С. 37–41. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10028.

Cytoprotective properties of the nerve growth factor and brain derived neurotrophic factor dipeptidic mimetics, GK-2 and GSB-106, in the model of oxidative stress in paramecium caudatum

Karpukhina O.V.¹, Inozemtsev A.N.¹, Gumargalieva K.Z.², Povarnina P. Yu.³, Gudasheva T.A.³

¹ – Lomonosov Moscow State University, Moscow

² – Semenov Institute of Chemical Physics of Russian Academy of Sciences, Moscow

³ – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. *Actuality.* Dimeric dipeptide mimics of the nerve growth factor (NGF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF), respectively GK-2 and GSB-106, were created in the V.V. Zakusov Institute of pharmacology. The similarity of GK-2 and GSB-106 to the corresponding full-sized neurotrophins by the mechanism of action and pharmacological properties, including pronounced neuroprotective activity *in vitro* and *in vivo*, has been established. *The purpose* of this study was to obtain additional data on the cytoprotective properties of GK-2 and GSB-106 using *Paramecium caudatum*. *Methods.* Oxidative stress in the *Paramecium caudatum* was induced by adding heavy metal salts (cadmium chloride, lead acetate, copper sulfate, zinc sulfate) to the medium at a final concentration of 10 μ M. GK-2 or GSB-106 in concentrations from 10^{-5} to 10^{-8} M was added into the medium with experimental cells 45 minutes before introducing the oxidative stress initiator. *Results.* Dipeptides GK-2 and GSB-106 in all studied concentrations protected cells from death. The maximum neuroprotective effect of the dipeptides showed in a concentration of 10^{-8} M, completely preventing the death of ciliates. *Conclusion.* GK-2 and GSB-106, at a concentration of 10^{-8} M, completely protect against the death *Paramecium caudatum* under conditions of oxidative stress caused by heavy metal salts.

Keywords: nerve growth factor; brain-derived neurotrophic factor; dimeric dipeptide mimetics; *Paramecium caudatum* infusoria; cytoprotection; oxidative stress induced by heavy metal salts

For citations:

Karpukhina OV, Inozemtsev AN, Gumargalieva KZ, Povarnina PYu, Gudasheva TA. Cytoprotective properties of the nerve growth factor and brain derived neurotrophic factor dipeptidic mimetics, GK-2 and GSB-106, in the model of oxidative stress in paramecium caudatum. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;4:37-41. DOI: 10.24411 / 2587-7836-2018-10028.

Введение

Нейродегенерация в головном мозге — ключевое звено патогенеза ряда широко распространённых заболеваний, таких как нарушения мозгового кровообращения, болезни Альцгеймера и Паркинсона, депрессия и др. Инвалидизация вследствие нейродегенеративных процессов представляет собой серьёзную социально-экономическую проблему, поэтому поиск высокоэффективных нейропротекторов является актуальной задачей фармакологии.

Высоким терапевтическим потенциалом обладают эндогенные нейропротекторные белки — нейротрофины, такие как мозговой нейротрофический фактор (brain derived neurotrophic factor, BDNF) и фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF) [1]. Однако клиническое применение нейротрофинов ограничено нестабильностью в биологических жидкостях, плохой способностью проникать через гематоэнцефалический барьер и побочными эффектами, обусловленными плейотропностью [2, 3].

В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова на основе бета-изгибов 4 петель NGF и BDNF сконструированы и синтезированы димерные дипептиды, соответственно гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина (ГК-2) и гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина) (ГСБ-106) [Патент РФ №2410392, 2010; Патент США № 9683014 B2, 2017; Патент Китая №102365294 B, 2016]. Показано, что ГК-2 и ГСБ-106 активируют специфические для полноразмерного белка тирозинкиназные рецепторы, соответственно TrkA и TrkB, и обладают нейропротекторной активностью *in vitro* в микро-наномолярных концентрациях на различных клеточных моделях, в том числе на модели окислительного стресса [46]. Нейропротекторная активность ГК-2 и ГСБ-106 была подтверждена *in vivo* на модели обширного ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс [7–9]. Для ГК-2 было показано, что он лишен основных побочных эффектов, характерных для NGF, а именно он не вызывает гипералгезии и потери веса [6].

Для получения дополнительных данных о цитопротекторных свойствах дипептидов ГК-2 и ГСБ-106 представляло интерес изучить их на модели окислительного стресса у инфузорий [10, 11]. Известно, что окислительный стресс является одним из основных механизмов повреждения нейронов при различных патологиях. Для моделирования окислительного стресса как *in vitro*, так и *in vivo* широко используются соли тяжёлых металлов [11–13] — экзотоксикантов, потенциально опасных для всех живых организмов. Ионы свинца, кадмия, цинка и других тяжёлых металлов способны инициировать генерацию избыточного количества активных форм кислорода [13–15], повышенный уровень которых в клетке способствует запуску цепных реакций окислительной деградации биомолекул.

Одноклеточные, в частности инфузории, представляют собой удобный модельный организм для фармакологических исследований, поскольку в данном случае преимущества, свойственные использованию культуры клеток, дополняются тем, что в данном случае тест-системой является одновременно и отдельная клетка, и целостный организм. Следует отметить, что для инфузорий, как и для других одноклеточных организмов, нет данных в литературе о наличии тирозинкиназных рецепторов, подобных рецепторам нейротрофинов у позвоночных, которые могли бы опосредовать фармакологические эффекты дипептидов ГК-2 и ГСБ-106. Тем не менее, у инфузорий были обнаружены ростовые факторы, регулирующие выживаемость и пролиферацию, подобные нейротрофинам [16, 17], что предполагает наличие подобных рецепторных систем.

Целью данного исследования стало изучение эффективности дипептидных миметиков нейротрофинов ГК-2 и ГСБ-106 в модели окислительного стресса у инфузорий, вызванного солями тяжёлых металлов.

Материалы и методы

Работа выполнена на культуре *Paramecium caudatum* — одном из наиболее часто используемых тест-объектов для лабораторных исследований, направленных на определение прямого действия химических соединений. Культуру клеток парамеций выращивали на среде Лозина–Лозинского с добавлением питательной среды, содержащей дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Клетки, взятые в лог-фазе роста, инкубировались при температуре 24 ± 2 °C, pH = 6,8–7,0.

Окислительный стресс моделировали [10] добавлением к 1 мл среды с инфузориями *Paramecium caudatum* 1 мл водного раствора одной из солей металлов (хлорид кадмия, ацетат свинца, сульфат меди, сульфат цинка) в конечных концентрациях 1; 5; 10 и 15 мкМ. Длительность инкубирования клеток в среде, содержащей соль тяжёлого металла, составляла 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 час, 2 часа, 6 часов. За 45 мин до внесения инициатора окислительного стресса в среду с опытными клетками добавлялся 1 мл раствора ГК-2 или ГСБ-106 в концентрациях от 10^{-5} до 10^{-8} М. Активные концентрации ГК-2 и ГСБ-106 были выбраны на основании предыдущих экспериментов [4, 5, 18].

На всех этапах эксперимента с помощью pH-метр контроллера Kelilong PH-221 измеряли pH среды. Регистрировали численность клеток, интенсивность их деления; характер и скорость движения инфузории, изменение формы клетки. Численность клеток определяли под микроскопом при увеличении 7×10 с видеорегистрацией путём подсчёта их общего количества в 1 мл культуры.

Полученные результаты представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего. После проверки распределения на нормальность значимость различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Под влиянием действия ионов тяжёлых металлов численность клеток заметно снизилась, особенно выраженные последствия отмечались при концентрациях 10–15 мкМ солей тяжёлых металлов (рис. 1). При этом в клетке происходил ряд морфологических изменений, в том числе реорганизация структур цитоскелета, приводящих к клеточной гибели. Наблюдалось набухание оргanelл цитоплазмы, которое приводило к разрыву

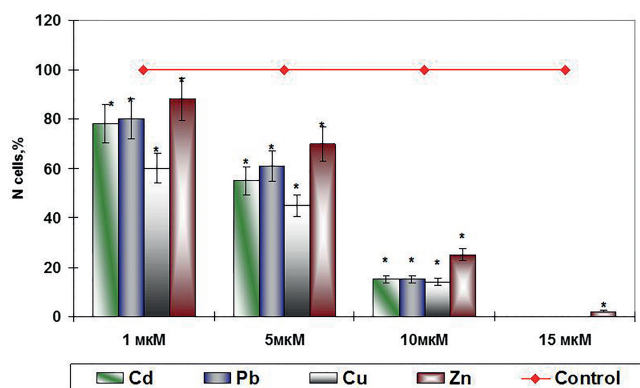


Рис. 1. Влияние солей тяжёлых металлов на выживаемость клеток *Paramecium caudatum* после 6 ч инкубации

Примечания: Соли тяжёлых металлов (хлорид кадмия, ацетат свинца, сульфат меди, сульфат цинка) в конечных концентрациях 1; 5; 10 и 15 мкМ добавляли в среду и инфузорию. Длительность инкубирования составляла 6 часов. На оси абсцисс показаны разные концентрации солей металлов; на оси ординат — число выживших клеток в % от интактного контроля. * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем (t-критерий Стьюдента). **Источник:** Карпущина О.В. и соавт., 2018.

мембраны клетки парамеций. Снижение численности опытных клеток в результате деструктивной мембранной патологии свидетельствовало об интенсификации процессов свободно-радикального окисления, вызванной ионами тяжёлых металлов. После 6 ч инкубации с растворами солей тяжёлых металлов (10 мкМ) количество выживших клеток в культуре *Paramecium caudatum* составило примерно от 15 до 25 % от пассивного контроля (без повреждения) (максимальное количество — в среде с сульфатом меди).

Дипептиды ГК-2 и ГСБ-106 во всех изученных концентрациях защищали клетки от гибели, вызванной действием тяжёлых металлов. Максимальный нейропротекторный эффект дипептиды проявляли в концентрации 10^{-8} М (рис. 2). В этой концентрации исследуемые соединения практически полностью предотвращали гибель инфузорий даже через 6 ч инкубирования с солями тяжёлых металлов (10 мкМ) (см. рис. 2).

Эффективность ГК-2 и ГСБ-106 в данной модели предполагает, что у *Paramecium caudatum* присутствуют рецепторные системы, подобные тирозинкиназным рецепторам нейротрофинов у позвоночных, что соответствует литературным данным о наличии у инфузорий ростовых факторов, регулирующих выживаемость и пролиферацию [16, 17].

Заключение

Таким образом, нами установлено, что дипептидные миметики NGF и BDNF, соответственно ГК-2 и ГСБ-106, в концентрации 10–8 М полностью защищают от

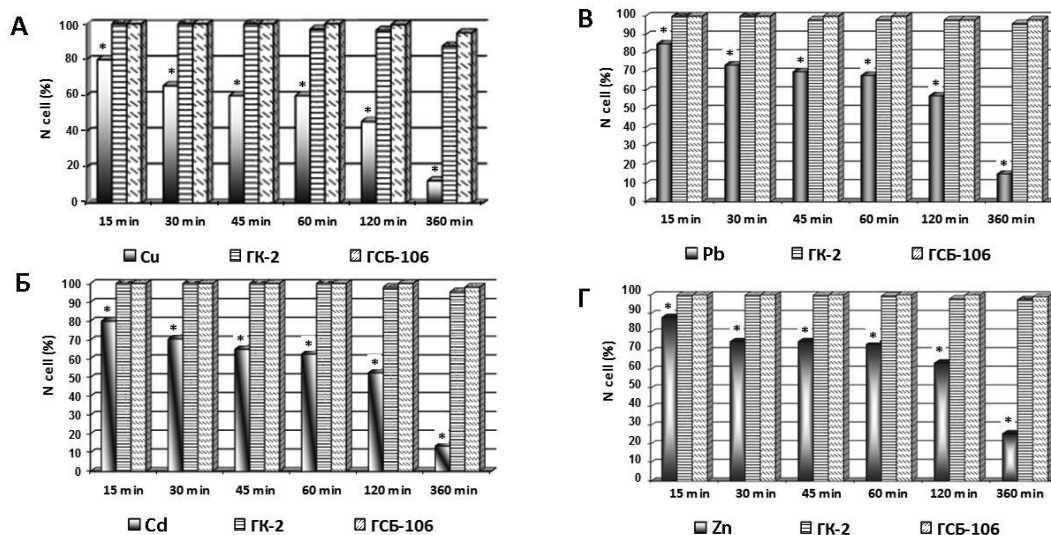


Рис. 2. Влияние димерных дипептидных миметиков NGF и BDNF, соответственно ГК-2 и ГСБ-106 в концентрациях 10^{-8} М на выживаемость клеток при окислительном стрессе, вызванном солями тяжёлых металлов (сульфат меди, хлорид кадмия, ацетат свинца, сульфат цинка) (10 мкМ) через 15, 30, 45, 60, 120 и 360 мин после инкубирования

Примечания: А — окислительный стресс вызывали сульфатом меди; Б — окислительный стресс вызывали ацетатом свинца; Г — окислительный стресс вызывали сульфатом цинка. ГК-2 и ГСБ-106 добавляли в среду за 45 мин до токсина. На оси абсцисс показано время инкубирования с солями тяжёлых металлов; на оси ординат — число выживших клеток в % от интактного контроля. * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем (t-критерий Стьюдента). **Источник:** Карпущина О.В. и соавт., 2018.

гибели клетки *Paramecium caudatum* в условиях окислительного стресса, вызванного солями тяжёлых металлов (хлоридом кадмия, ацетатом свинца, сульфатом меди, сульфатом цинка).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Работа была выполнена при поддержке РФФИ (проект № 18-015-00228).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. *Поварнина П.Ю.* — разработка модели, проведение экспериментов, анализ и интерпретация результатов, написание текста; *Карпукхина О.В.* — разработка модели, разработка дизайна эксперимента, анализ и интерпретация результатов, написание текста; *Иноземцев А.Н.* — разработка модели, проведение экспериментов, анализ и интерпретация результатов; *Гумаргалиева К.З.* — анализ и интерпретация результатов, написание текста; *Гудашева Т.А.* — разработка дизайна эксперимента, анализ и интерпретация результатов, редактирование, финальное утверждение.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Поварнина Полина Юрьевна
Автор, ответственный за переписку
 e-mail: povarnina@gmail.com
 ORCID: 0000-0003-3278-8915
 SPIN-код: 5498-6724
 к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Povarnina Polina
Corresponding author
 e-mail: povarnina@gmail.com
 ORCID: 0000-0003-3278-8915
 SPIN-code: 5498-6724
 PhD, Senior Researcher, Laboratory of Peptide Bioregulators, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Карпукхина Ольга Вячеславовна
 ORCID: 0000-0002-9847-8058
 SPIN-код: 6762-7087
 к. б. н., в. н. с. кафедры высшей нервной деятельности Биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва

Karpukhina Olga
 ORCID: 0000-0002-7271-4008
 SPIN-code: 6762-7087
 PhD, Leading Researcher, Department of Higher Nervous Activity, Faculty of Biology of Lomonosov Moscow State University, Moscow

Иноземцев Анатолий Николаевич
 ORCID: 0000-0002-5059-3241
 SPIN-код: 7119-9015
 д. б. н., ведущий научный сотрудник кафедры высшей нервной деятельности Биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва

Inozemtsev Anatoli
 ORCID: 0000-0002-5059-3241
 SPIN-code: 7119-9015
 Grand PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Department of Higher Nervous Activity, Faculty of Biology of Lomonosov Moscow State University, Moscow

Гумаргалиева Клара Зенноновна
 SPIN-код: 4305-2824
 д. х. н., руководитель лаборатории стабильности и устойчивости органических веществ и материалов отдела динамики химических и биологических процессов, ФГБУН «Институт химической физики имени Н.Н. Семенова» РАН, Москва

Gumargalieva Klara
 SPIN-code: 4305-2824
 PhD, Head of the Laboratory of Stability and Sustainability of Organic Substances and Materials, Department of Chemical and Biological Processes Dynamics, Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow

Гудашева Татьяна Александровна
 ORCID: 0000-0002-5185-4474
 SPIN-код: 4970-0006
 д. б. н., профессор РАН, руководитель лаборатории фармакологической регуляции состояний зависимости ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Gudasheva Tatiana
 ORCID: 0000-0002-5185-4474
 SPIN-code: 4970-0006
 Grand PhD in Biological Sciences, Professor of RAS, Head of the Laboratory of Peptide Bioregulators, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

- Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, et al. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther.* 2013;138(2):155–175. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.01.004
- Aloe L, Rocco ML, Bianchi P, Manni L. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *J Transl Med.* 2012;10(1):239. DOI: 10.1186/1479-5876-10-239
- Dunkel P, Chai CL, Sperl gh B, et al. Clinical utility of neuroprotective agents in neurodegenerative diseases: current status of drug development for Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases, and amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs.* 2012;21(9):1267–1308. DOI: 10.1517/13543784.2012.703178
- Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Исследование *in vitro* нейропротективных свойств нового оригинального миметика фактора роста нервов ГК-2 // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2010. – Т. 150. – № 11. – С. 537–540. [Antipova TA, Gudasheva TA, Seredenin SB. *In vitro* study of neuroprotective properties of GK-2, a new original nerve growth factor mimetic. *Bulleten experimentalnoy biologii i medicini.* 2011;150(5):607–9. (in Russ).]
- Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо СВ и др. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора // *Биоорганическая химия.* – 2012. – Т. 38. – № 3. – С. 280–290. [Gudasheva TA, Tarasyuk AV, Pomogaybo SV, et al. Design and synthesis of dipeptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *Bioorganicheskaya khimiya.* 2012;38(3):280–90. (In Russ).]
- Gudasheva TA, Povarnina PY, Antipova TA, et al. Dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor Loop 4 and Loop 1 activate TRKA with different patterns of intracellular signal transduction. *J Biomed Sci.* 2015;22(5):106. DOI: 10.1186/s12929-015-0198-z
- Gudasheva TA, Povarnina P, Logvinov IO, et al. Mimetics of brain-derived neurotrophic factor loops 1 and 4 are active in a model of ischemic stroke in rats. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:3545–3553. DOI: 10.2147/DDDT.S118768
- Povarnina P, Gudasheva TA, Seredenin SB. Dimeric dipeptide mimetics of NGF and BDNF are promising agents for post-stroke therapy. *J Biomed Sci Eng.* 2018;11(5):100–107. DOI: 10.4236/jbise.2018.115009
- Середенин С.Б., Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А. Экспериментальная оценка терапевтического окна нейропротективной активности препарата ГК-2, низкомолекулярного миметика фактора роста нервов // *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова.* – 2018. – Т. 118. – № 7. – С. 49–53. DOI: 10.17116/jnevro20181187149 [Seredenin SB, Povarnina PY, Gudasheva TA, et al. An experimental evaluation of the therapeutic window of the neuroprotective activity of a low-molecular nerve growth factor mimetic GK-2. *Zhurnal Nevrol i psikiatrii im SS Korsakova.* 2018;118(7):49. (in Russ).]
- Karpukhina OV, Gumargalieva KZ, Inozemtsev AN. The effect of antioxidant compounds on oxidative stress in unicellular aquatic organisms. In: *On the borders of physics, chemistry, biology, medicine and agriculture. Research and Development. Torun: Institute for Engineering of polymer materials and Dues.* 2014:145–151.
- Morgunov IG, Karpukhina OV, Kamzolova SV, et al. Investigation of the effect of biologically active threo-Ds-isocitric acid on oxidative stress in *Paramecium caudatum*. *Prep Biochem Biotechnol.* 2018;48(1):1–5. DOI: 10.1080/10826068.2017.1381622
- Simmons SO, Fan C-Y, Yeoman K, et al. NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent. *Curr Chem Genomics.* 2011;5:1–12. DOI: 10.2174/1875397301105010001
- Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem.* 2001;1(6):529–539. DOI: 10.2174/1568026013394831
- Flora SJS, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res.* 2008;128(4):501–523. DOI: 10.1093/jexbot/53.366.1
- Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:657–667. DOI: 10.1146/annurev.physiol.48.1.657
- Tanabe H, Nishi N, Takagi Y, et al. Purification and identification of a growth factor produced by *Paramecium tetraurelia*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;170(2):786–792. DOI: 10.1016/0006-291X(90)92160-2
- Rasmussen MI, Wheatley DN. Purification and characterisation of cell survival factor 1 (TCSF1) from *Tetrahymena thermophila*. *J Cell Commun Signal.* 2007;1(3-4):185–193. DOI: 10.1007/s12079-007-0016-9
- Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов. *Доклады Академии Наук.* 2010;4(1):549–552. [Gudasheva TA, Antipova TA, Seredenin SB. Novel low-molecular-weight mimetics of the nerve growth factor. *Dokl Biochem Biophys.* 2010 Sep-Oct;434:262-5. (In Russ).] DOI: 10.1134/S160767291005011X