

Изучение нейропсихотропных свойств соединения с нейропротекторной активностью димерного дипептидного миметика 4-ой петли фактора роста нервов человека, ГК-2h

Котельникова С.О., Гарибова Т.Л., Гудашева Т.А., Крайнева В.А., Воронина Т.А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

Резюме. Димерный дипептидный миметик фактора роста нервов человека ГК-2h в дозах 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 мг/кг, в/б обладает антиамнестическими свойствами на моделях амнезии условной реакции пассивного избегания, вызванной скополамином, максимальным электрошоком или кетамином, увеличивая у крыс латентное время при воспроизведении рефлекса. ГК-2h в дозах 1,0–1,5 мг/кг при различных режимах введения обладает противогипоксическим эффектом в условиях гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме и слабым противосудорожным действием на модели судорог, вызванных максимальным электрошоком и не влияет на ориентировочно-исследовательское поведение животных в открытом поле.

Ключевые слова: димерный дипептидный миметик фактора роста нервов человека, антиамнестический и противогипоксический эффекты

Study of neuropsychotropic properties of substance with neuroprotective activity dimeric dipeptide mimetic of human NGF, GK-2h

Kotelnikova S.O., Garibova T.L., Gudasheva T.A., Kraineva V.A., Voronina T.A.
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. Dimeric dipeptide mimetic human nerve growth factor, bis-(N-monosuccinyl-glycyl-lysine), GK-2h at doses 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 mg/kg, i.p. has an antiamnestic effect on the models of scopolamine, maximal electroshock or ketamin induced passive avoidance response amnesia. GK-2h at doses 1,0–1,5 mg/kg possess weak antihypoxic und anticonvulsive properties, it does not affect the exploratory behavior of animals in the test of open field.

Keywords: mimetic human NGF bis-(N-monosuccinyl-glycyl-lysine), GK-2h, antiamnestic, antihypoxic effects

Автор, ответственный за переписку:

Гарибова Таисия Леоновна – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8; тел.: +79039616126; e-mail: T_Garibova@mail.ru

Введение

Один из актуальных подходов к созданию препаратов с нейропсихотропной активностью базируется на современных представлениях о механизмах эндогенного регулирования функций нейронов и их регенерации. Среди известных эндогенных регуляторных белков особое внимание уделяется факторам роста нервной ткани, в частности, нейротрофинам и среди них фактору роста нервов (ФРН, nerve growth factor, NGF). ФРН участвует в росте, созревании и поддержании жизнедеятельности нейронов в центральной и периферической нервной системе как в норме, так и при патологии [1]. Известно вовлечение ФРН в патогенез болезней с нейродегенерацией, в частности, болезни Альцгеймера (БА), болезни Паркинсона (БП), инсультов и др. [2]. Показана эффективность ФРН в клинике у больных [3] и в экспериментальных исследованиях [4, 5]. Вместе с тем, терапевтическое использование самого ФРН ограничивается его нестабильностью

в биологических жидкостях, плохой способностью проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), возможностью иммунной реакции, наличием побочных эффектов за счёт его плеiotропности. Актуальным подходом к регуляции системы факторов роста нервной ткани в ЦНС является создание (конструирование и синтез) низкомолекулярных миметиков факторов роста, взаимодействующих с соответствующими тирозинкиназными рецепторами [6].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в течение нескольких десятилетий проводятся исследования по созданию и изучению механизмов действия нейропсихотропных лекарственных препаратов, в частности, с нейропротекторной активностью. Была сформулирована оригинальная гипотеза о возможности конструирования фармакологически активных дипептидов на основе петлеобразных структур белков, определяющих рецепторное взаимодействие [7]. Определено, что фармакофорными участками нейротрофина являются их бета-изгибы

(последовательность из четырёх аминокислотных остатков с бета-поворотной конформацией) и созданы дипептидные миметики факторов роста [8]. В опытах на животных выявлены нейропротекторные свойства дипептидного миметика 4-й петли фактора роста нервов крысы [9]. Другой низкомолекулярный димерный дипептидный миметик 4-й петли фактора роста нервов человека гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-глицил-лизина), ГК-2h, в исследованиях проявил нейропротективные свойства как *in vitro* [10], так и на экспериментальных моделях БА и инсультов в опытах на крысах [11].

Целью исследования явилось изучение общего спектра фармакологической активности димерного дипептидного миметика фактора роста нервов человека гексаметилендиамида бис-(N-моносукцинил-глицил-лизина), ГК-2h, в опытах на животных. В задачи исследования входило изучение эффектов соединения, характерных для нейропсихотропных препаратов, а именно выявление антиамнестических свойств, противогипоксической, противосудорожной, антидепрессивной активности, оценка влияния соединения на двигательную активность и ориентировочно-исследовательское поведение животных.

Материалы и методы исследования

Исследование фармакологической активности соединений проводилось в опытах с использованием стандартных методов, применяемых для скрининга и изучения механизмов действия нейропсихотропных препаратов, согласно международным стандартам [12, 13]

Соединения. В исследовании были использованы: оригинальный димерный дипептидный миметик 4-ой петли ФРН человека — гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-глицил-лизина) — ГК-2h, синтезированный в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; блокатор мускаринового типа холинергических рецепторов — скополамин (Sigma); антагонист NMDA-рецепторов — кетамин (Sigma).

Животные. Эксперименты проводились на беспородных мышах-самцах, мышах инбредной линии C57BL/6 массой 20–23 г, беспородных крысах самцах, массой 180–200 г. Экспериментальные животные получены из питомника лабораторных животных «Столбовая», Московская область. Животные содержались в соответствии с правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 351.000.3–96 и Р 51000.4–2011), приказу МЗ РФ № 708н от 23.08.2010 г.

Методы

Антиамнестическое действие соединения оценивали на модели амнезии УРПИ в установке Passive avoidance фирмы Lafayette Instrument Co (США). Регистрировали

латентное время захода животного в тёмную камеру при воспроизведении рефлекса через 24 ч после обучения (неизбегаемый удар током в тёмной камере установки в течение 10 с). Амнезию УРПИ у крыс вызывали максимальным электрошоком (МЭШ), проводимым после обучения через кортикальные электроды ($I = 43$ мА, частота 50 Гц, продолжительность 0,3 с), скополамином (1,5 мг/кг) или кетамином (10,0 мг/кг), каждый из которых вводили внутривенно (в/в) за 15 мин до обучения. ГК-2h использовали в/б однократно или повторно за 40 мин до тестирования. Животные контрольных групп получали дистиллированную воду в эквивалентном объёме.

Противогипоксическое действие соединения оценивали в опытах на мышах на моделях гипоксии с гиперкапнией в гермообъёме, помещая животных в герметически закрываемые банки объёмом 200 см³. Регистрировали время гибели животных.

Для моделирования судорожных состояний использовался тест МЭШ для мышей. С помощью прибора Rodent shocker Type 221 фирмы Harvard apparatus GmbH (Германия) через кортикальные электроды животное получало электрический стимул (10–12 мА, 250 В, длительностью 0,2 с), вызывающий у 40–50% контрольных мышей тоническую экстензию задних конечностей. Регистрировались подергивания (1 балл), клонические судороги (2 балла), тоническая экстензия (3 балла) и гибель мышей (4 балла).

Депрессивноподобное поведение вызывали у мышей с использованием теста вынужденного плавания по Порсолт [14] и теста подвешивания за хвост [15] в опытах на мышах.

Исследование ориентировочно-исследовательского поведения и двигательной активности у животных проводилось в открытом поле размером 60×60 см с полом равномерно разделённым линиями на 9 квадратов с 16 отверстиями диаметром 4 см для крыс и размером 40×40 см с полом разделённым линиями на 9 квадратов с 16 отверстиями диаметром 2 см для мышей. Регистрировалась вертикальная (число подъёмов на задние лапы) и горизонтальная (число пересечений линий квадратов) двигательная активность и количество заглядываний в отверстия.

Статистическую обработку результатов проводили с определением среднего значения и стандартной ошибки среднего значения, которые представлены в итоговых таблицах. Использовался пакет статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft, USA). Различия определялись как статистически значимые при уровне $p \leq 0,05$. Для определения статистической значимости различий между группами использовали ранговый однофакторный анализ Kruskal–Wallis. Если различия были достоверны ($p \leq 0,05$), проводилось попарное сравнение по непараметрическому критерию U Mann–Whitney, Стьюденту, а при анализе альтернативной формы учёта использовался точный метод Фишера (пакет программ Biostat).

Результаты и обсуждение

Изучение антиамнестических свойств ГК-2h на моделях амнезии УРПИ, показало, что МЭШ, скополамин в дозе 1,5 мг/кг или кетамин в дозе 10 мг/кг вызывали у крыс амнезию условной реакции пассивного избегания (УРПИ). Это характеризовалось по сравнению с контролем уменьшением латентного времени рефлекса при воспроизведении через 24 ч после обучения (рис. 1).

На модели амнезии УРПИ, вызванной МЭШ, показано, что ГК-2h в дозах 0,1; 0,3; 0,6; 1,0 и 2,0 мг/кг не оказывал влияния на формирование УРПИ, а в дозе 1,5 мг/кг ГК-2h существенно увеличивал латентное время при воспроизведении рефлекса (рис. 1). На модели амнезии УРПИ, вызванной скополамином, наиболее отчётливо эффект ГК-2h выявлялся при использовании соединения в дозах 0,5 и 1,0 мг/кг, в дозе 0,1 мг/кг наблюдалась тенденция увеличения латентного времени рефлекса. Вместе с тем, при повторном 5-дневном предварительном введении крысам ГК-2h в дозе 0,1 и 0,5 мг/кг регистрировался сильный антиамнестический эффект, характеризующийся полным восстановлением памятного следа. На модели амнезии УРПИ, вызванной кетамином, антиамнестический эффект ГК-2h выявлялся в дозе 1,0 мг/кг при 5-дневном введении (рис. 1).

Таким образом, ГК-2h в диапазоне доз от 0,1 до 1,5 мг/кг обладает антиамнестическими свойствами на моделях амнезии УРПИ, вызванной МЭШ, скополамином или кетамином.

Изучение противогипоксического действия ГК-2h осуществлялось на модели гипоксии с гиперкапнией в гермообъёме. Противогипоксический эффект ГК-2h выявлен в дозе 1,0 мг/кг при 5-дневном введении в опытах на мышах линии С57В16 (табл. 1).

Исследование противосудорожных свойств ГК-2h на модели судорожных реакций, вызванных МЭШ, в опытах на мышах линии С57В16 показало, что в дозах 0,1, 0,5, 1,0 и 2,0 мг/кг соединение не способно предупреждать различные проявления судорожных реакций. Лишь в дозе 1,5 мг/кг отмечалось статистически достоверное ослабление судорожных реакций (табл. 2).

Изучение влияния вещества на депрессивноподобное поведение показало, что в тесте Порсолт в дозе 0,1 мг/кг и в тесте подвешивания за хвост в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг ГК-2h не оказывал влияния на поведение животных, а в дозе 1,0 мг/кг при предварительном 5-дневном введении у мышей наблюдалась тенденция уменьшения времени иммобилизации при плавании (табл. 3).

Изучение поведения животных в открытом поле. ГК-2h в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг при субхроническом 3-дневном введении не оказывал влияния на ориентировочно-исследовательское поведение и двигательную активность мышей в открытом поле (табл. 4).

Ранее было показано, что замещённый димерный дипептидный миметик 4-й петли фактора роста нервов человека ГК-2h, синтезированный как соединение, способное воспроизводить его эффекты, обладает нейропротекторными свойствами на моделях патологий, в механизме которых участвует ФРН. Показано, что в диапазоне доз от 0,1 до 1,0 мг/кг при

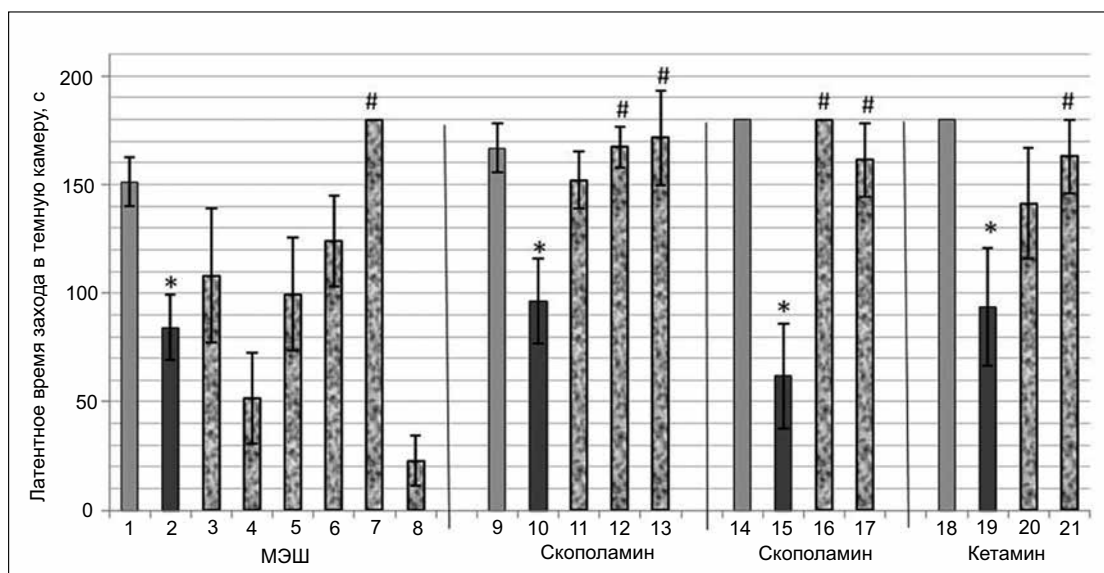


Рис. 1. Антиамнестический эффект ГК-2h на моделях амнезии УРПИ, вызванной максимальным электрошоком, скополамином или кетамином.

Примечание: 1 — пассивный контроль; 2 — активный контроль (МЭШ); 3 — ГК-2h (0,1 мг/кг); 4 — ГК-2h (0,3 мг/кг); 5 — ГК-2h (0,5 мг/кг); 6 — ГК-2h (1,0 мг/кг); 7 — ГК-2h (1,5 мг/кг); 8 — ГК-2h (2,0 мг/кг); 9 — пассивный контроль; 10 — активный контроль (скополамин 1,5 мг/кг); 11 — ГК-2h (0,1 мг/кг); 12 — ГК-2h (0,5 мг/кг); 13 — ГК-2h (1,0 мг/кг); 14 — пассивный контроль; 15 — активный контроль (скополамин 1,5 мг/кг); 16 — ГК-2h (0,1 мг/кг/5 дней); 17 — ГК-2h (0,5 мг/кг/5 дней)[§] (§ — введение ГК-2h внутрь); 18 — пассивный контроль; 19 — активный контроль (кетамин 10,0 мг/кг); 20 — ГК-2h (0,1 мг/кг/5 дней); 21 — ГК-2h (1,0 мг/кг/5 дней); * — достоверность отличий от пассивного контроля; # — достоверность отличий от активного контроля при $p \leq 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Изучение противогипоксических свойств ГК-2h на модели гипоксии с гиперкапнией в гермообъёме в опытах на мышах

Группы животных	Доза, продолжительность введения, в/б	Время жизни, с	
		беспородные мыши	мыши линии C57Bl6
Контроль	Дистиллированная вода/5 дней	1 488±41,76	1 850,0±47,6
ГК-2h	0,1 мг/кг/5 дней	1 360±72,1	2 001,0±105,1
ГК-2h	1,0 мг/кг/5 дней	1 626±104,9	2 228,0±129,5*

Примечание: * — достоверность отличий от контроля при $p \leq 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

Таблица 2

Изучение противосудорожных свойств на модели судорог у мышей линии C57Bl6, вызванных МЭШ

Группы животных	Доза в мг/кг, n=10	Судороги в баллах
Контроль		3,3±0,2
ГК-2h	0,1	3,1±0,3
	0,5	3,1±0,3
	1,0	2,8±0,3
	1,5	2,6±0,2*
	2,0	2,8±0,3

Примечание: * — достоверность отличий от контроля при $p \leq 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

Таблица 3

Изучение антидепрессивного действия ГК-2h в тестах вынужденного плавания и подвешивания за хвост в опытах на мышах

Группы животных	Время иммобилизации, с	
	вынужденное плавание	подвешивания за хвост
Контроль (дистиллированная вода)	229,13±14,62	118,76±16,51
ГК-2h 0,1 мг/5 дней	233,26±20,11	116,41±13,64
ГК-2h 1,0 мг/5 дней	177,92±18,38 ^а	123,15±15,18

Примечание: ^а — достоверность отличий от контроля при $p=0,067$ (критерий Манна–Уитни).

Таблица 4

Влияние ГК-2h на ориентировочно-исследовательское поведение и двигательную активность мышей в открытом поле

Группы животных	Горизонтальная двигательная активность	Вертикальная двигательная активность	Обследование отверстий
Контроль (дистиллированная вода)	92,8±9,9	23,67±5,7	7,0±1,3
ГК-2h (0,1 мг/кг/3 дня)	80,7±7,86	13,1±2,05	8,2±0,88
ГК-2h (1,0 мг/кг/3 дня)	83,9±8,8	19,7±3,86	7,3±1,28

повторном введении ГК-2h на моделях БА ослабляет у крыс нарушения пространственной ориентации и памяти, а на моделях инсультов — обладает способностью увеличивать выживаемость, ослаблять неврологический дефицит, улучшать поведение и память. Нейропротекторный эффект соединения выявлен и при морфометрических исследованиях [11]. В результате проведённой работы по изучению общего спектра фармакологической активности ГК-2h в опытах на мышах и крысах показано, что соединение в используемых дозах и режимах введения обладает антиамнестическими свойствами на моделях амнезии УРПИ, вызванной скополамином, МЭШ или кетамином, умеренным противогипоксическим и слабым противосудорожным эффектами, не влияет на ориентировочно-исследовательское поведение и двигательную активность животных в открытом поле. Особенно отчётливо выявляются антиамнестические свойства ГК-2h, что согласуется с полученным ранее мнемотропным эффектом нового соединения на моделях БА, инсультов [11]. Результаты настоящей работы подтверждают возможность использования методов скрининга нейропсихотропных препаратов, а именно, моделей амнезий УРПИ и гипоксий для первичной оценки и прогнозирования нейропротекторных свойств нейропептидов. Следует отметить, что эти эффекты соединения выявляются практически в том же диапазоне доз, что и его нейропротекторные свойства.

Выводы

1. ГК-2h в дозах 0,1; 0,5 и 1,0 мг/кг в/б обладает антиамнестическими свойствами на модели амнезии условной реакции пассивного избегания, вызванной скополамином; в дозе 1,5 мг/кг, вызванной максимальным электрошоком, а при использовании соединения в дозе 1,0 мг/кг/5 дней на модели кетаминовой амнезии, увеличивая у крыс латентное время при воспроизведении рефлекса.

2. ГК-2h в дозе 1,5 мг/кг, в/б при различных режимах введения обладает противогипоксическим эффектом в условиях гипоксии с гиперкапнией в гермообъёме и слабым противосудорожным действием на модели судорог, вызванных максимальным электрошоком, не влияет на ориентировочно-исследовательское поведение животных в открытом поле.

Литература

1. Manni L., Rocco M.L., Bianchi P., Soligo M., Guaragna M., Barbaro S.P., Aloe L. Nerve growth factor: basic studies and possible therapeutic applications. *Growth Factors*. 2013; 31: 4: 115–122.
2. Calissano P., Matrone C., Amadoro G. Nerve growth factor as a paradigm of neurotrophins to Alzheimer's disease. *Dev. Neurobiol.* 2010; 70: 5: 372–383.
3. Sopova K., Gatsiou K., Stellos K., Laske C. Dysregulation of neurotrophic and haematopoietic growth factors in Alzheimer's disease: from pathophysiology to novel treatment strategies. *Curr. Alzheimer. Res.* 2014; 11:1: 27–39.
4. Yang J., Liu H., Yang H., Feng P. Therapeutic time window for the neuroprotective effects of NGF when administered after focal cerebral ischemia. *Neurol Sci.* 2011; 32: 433–441.
5. Zhu, W., Cheng S., Xu G., Ma M., Zhou Z., Liu D, Liu X. Intranasal nerve growth factor enhances striatal neurogenesis in adult rats with focal cerebral ischemia. *Drug Deliv.* 2011; 18: 5: 338–43.
6. Obianyo O., Ye K. Novel small molecule activators of the Trk family of receptor tyrosine kinases. *Biochim. Biophys Acta.* 2013; 1834:10: 2213–2218.
7. Gudasheva T.A., Povarnina P. Yu, Antipova T.A., Firsova Yu.N., Konstantinopolsky M.A., Seredenin S.B. 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: 106–116.
8. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Патент РФ № 2410392. Дипептидные миметики нейротрофинов NGF и BDNF. 27.01.2011. Бюл. № 3.
9. Поварнина П.Ю., Воронцова О.Н., Гудашева Т.А., Островская Р.У., Середенин С.Б. Оригинальный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 восстанавливает нарушенные когнитивные функции на моделях болезни Альцгеймера у крыс. *Acta Naturae.* 2013; 5: 3(18): 61–68.
10. Антипова Т.А., Николаев С.В., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Исследование in vitro нейропротекторных свойств нового оригинального миметика фактора роста нервов человека ГК-2(h). *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2014; 77: 2: 8–11.
11. Котельникова С.О. Изучение нейропсихотропных свойств димерного дипептидного миметика фактора роста нервов человека. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. 2015; 24.
12. Воронина, Т.А., Островская Р.У., Гарибова Т.Л. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов с ноотропным типом действия. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под общ. ред. А.Н. Миронова. Часть 1, М.: Гриф и К. 2012; 276–296.
13. Vogel H.G. Drug discovery and evaluation: pharmacological assays H.G. Vogel. Springer. Berlin. 3rd Edition. 2008; 1800.
14. Porsolt R. D. Animal model of depression. *Biomedicine.* 1979; 30: 3: 139–140.
15. Steru L., Chermat R., Thierry B., Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 1985; 85: 3: 367–370.