

# Миметик мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 оказывает нейропротекторные и нейрорегенеративные эффекты в условиях экспериментального ишемического инсульта

Поварнина П. Ю., Антипова Т. А., Логвинов И. О., Никифоров Д. М.

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

**Аннотация.** *Актуальность.* Димерный дипептидный миметик 4-й петли мозгового нейротрофического фактора (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина) (GSB-106), активирующий TrkB, PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC- $\gamma$ 1, был создан в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Для ГСБ-106 была выявлена нейропротекторная активность в экспериментах *in vitro* и *in vivo* при системном введении. *Цель.* В настоящем исследовании мы изучили влияние ГСБ-106 на объём инфаркта мозга, а также на нейрогенез и синаптогенез в условиях экспериментального ишемического инсульта, индуцированного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс, при его первом введении через 24 ч после моделирования ишемии. *Методы.* Дипептид ГСБ-106 вводили внутривентрикулярно в дозе 0,1 мг/кг 1 раз в день в течение 6 дней. На 7-й день мозговой материал собирали для морфометрических и биохимических (Вестерн-блот анализ) исследований. *Результаты.* Было установлено, что ГСБ-106 снижал объём инфаркта мозга в среднем на 24 %, стимулировал угнетённый нейро- и/или глиогенез (по маркеру пролиферации Ki-67) в гиппокампе и стриатуме и полностью восстанавливал иммунореактивность к синаптическим маркерам синаптофизину и PSD-95 в стриатуме ишемизированного полушария. *Заключение.* Таким образом, димерный дипептидный миметик BDNF ГСБ-106 проявляет нейрорегенеративные свойства в условиях клинически значимого (24 ч) терапевтического окна на модели ишемического инсульта, и эти свойства предположительно обусловлены стимуляцией нейрогенеза (и/или глиогенеза) и синаптогенеза.

**Ключевые слова:** BDNF; дипептидный миметик; ишемический инсульт; нейрогенез; синаптогенез

## Для цитирования:

Поварнина П. Ю., Антипова Т. А., Логвинов И. О., Никифоров Д. М. Миметик мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 оказывает нейропротекторные и нейрорегенеративные эффекты в условиях экспериментального ишемического инсульта. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2022;(1):36–43. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-36-43>

**Поступила:** 01 декабря 2021 г. **Принята:** 15 января 2022 г. **Опубликована:** 30 марта 2022 г.

## The mimetic of the brain neurotrophic factor GSB-106 has neuroprotective and neuroregenerative effects in experimental ischemic stroke

Povarnina PYu, Antipova TA, Logvinov IO, Nikiforov DM

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

**Abstract.** *Background.* A dimeric dipeptide mimetic of the brain-derived neurotrophic factor loop 4, bis(N-monosuccinyl-L-seryl-L-lysine) hexamethylenediamide (GSB-106), which activates TrkB, PI3K/AKT, MAPK/ERK and PLC- $\gamma$ 1 was created at the V.V. Zakusov Research Institute of Pharmacology. GSB-106 showed neuroprotective activity *in vitro* and *in vivo* at systemic administration. *Objective.* In the present study, we studied the effect of GSB-106 on the brain infarct volume, as well as on neurogenesis and synaptogenesis under conditions of experimental ischemic stroke induced by transient occlusion of the middle cerebral artery in rats, when it was first administered 24 h after ischemia onset. *Methods.* Dipeptide GSB-106 was administered i.p. in a dose of 0.1 mg/kg 24 h after surgery and then once a day, with the end of administration on the day 6 after surgery. On the day 7 brain samples were collected for morphometric and biochemical (Western-blot) analysis. *Results.* It was established that GSB-106 reduced the brain damage volume by 24%, restores impaired neurogenesis and/or gliogenesis (by Ki-67) in the hippocampus and in the striatum and completely restored the reduced immunoreactivity to synaptic markers synaptophysin and PSD-95 in the striatum. *Conclusions.* Thus, the dimeric dipeptide BDNF mimetic GSB-106 exhibits neuroregenerative properties at clinically relevant time window (24 h) in a model of ischemic stroke presumably due to stimulation of neurogenesis (and/or gliogenesis) and synaptogenesis.

**Keywords:** BDNF; dipeptide mimetic; ischemic stroke; neurogenesis; synaptogenesis

## For citations:

Povarnina PYu, Antipova TA, Logvinov IO, Nikiforov DM. The mimetic of the brain neurotrophic factor GSB-106 has neuroprotective and neuroregenerative effects in experimental ischemic stroke. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2022;(1):36–43. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-36-43>

**Received:** December 01, 2021. **Accepted:** January 15, 2022. **Published:** March 30, 2022.

## Введение / Introduction

Мозговой нейротрофический фактор (миметик 4-й петли мозгового нейротрофического фактора (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) – нейротрофин, который присутствует практически во всех отделах головного мозга и играет важную роль

в поддержании нейропластичности [1]. BDNF рассматривается как перспективная фармакологическая мишень для лечения ряда психических и неврологических заболеваний [2].

Накоплено большое количество экспериментальных и клинических данных, свидетельствующих о высоком терапевтическом потенциале BDNF для

лечения постинсультного состояния. Так, содержание BDNF в плазме крови у людей в острую фазу инсульта коррелирует со степенью дальнейшего восстановления неврологических функций [3]. В условиях экспериментального ишемического инсульта у грызунов, вызванного окклюзией средней мозговой артерии, экзогенный BDNF снижает объём инфаркта мозга с максимальным эффектом 70 % и улучшает неврологический статус [4–6]. Кроме того, на моделях церебральной ишемии показана стимуляция нейрогенеза под действием BDNF [7, 8]. Однако BDNF имеет серьёзные ограничения для применения в клинике, основные из которых — это проблема его доставки в центральную нервную систему и плеiotропность. Эти ограничения могут быть преодолены путём создания низкомолекулярных миметиков BDNF, обладающих удовлетворительными фармакокинетическими свойствами и реализующих только полезные эффекты полноразмерного нейротрофина. Такие соединения в настоящее время разрабатываются рядом научных групп [9–11].

В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова на основе оригинальной гипотезы о том, что у нейротрофинов фармакофорными являются наиболее экспонированные участки их петлеобразных структур, чаще всего центральные участки бета-изгибов [12] и того факта, что для проявления агонистической активности необходима димерная структура, был создан димерный дипептидный миметик 4-й петли BDNF (гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина)), лабораторный шифр ГСБ-106 [Патент РФ №2410392, 2010; Патент США US 9,683,014 B2, 2017; Патент ЕПВ EP 2397488, 2019; Патент КНР CN 102365294 B, 2016; Патент Индии 296506, 2018].

По данным Вестерн-блот анализа ГСБ-106 активирует специфические для BDNF TrkB-рецепторы и их основные пострецепторные сигнальные пути — PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC- $\gamma$ 1 [13, 14]. Дипептид ГСБ-106 проявляет нейропротекторную активность на культуре гиппокампальных нейронов линии HT-22 в широком диапазоне концентраций ( $10^{-5}$ – $10^{-8}$ М) в условиях окислительного стресса и глутаматной токсичности [15]. На ряде *in vivo* моделей показано, что ГСБ-106 при внутривенном (в/в) и пероральном введении проявляет, как и BDNF, антидепрессантоподобную активность [16]. Установлено, что ГСБ-106 проникает через гематоэнцефалический барьер [17] и нетоксичен [18].

На модели транзиторной окклюзии средней мозговой артерии у крыс ГСБ-106 при субхроническом в/в введении (начало введения через 4 ч после моделирования ишемии) на 60 % снижал объём инфаркта мозга и улучшал неврологический статус [13]. Для дипептида было также показано, что он полностью предотвращает стресс-индуцированные нарушения гиппокампального нейрогенеза у мышей [19], а также стимулирует гиппокампальный синаптогенез у мышей в физиологических условиях [20]. На основании вы-

шесказанного мы предположили, что ГСБ-106 может проявлять нейрорегенеративные эффекты в условиях экспериментального инсульта и таким образом обеспечивать терапевтический эффект в клинически значимые интервалы времени.

В настоящей работе было изучено влияние ГСБ-106 на объём инфаркта мозга, а также на нейрогенез и синаптогенез в условиях экспериментального ишемического инсульта, индуцированного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс, при первом введении соединения через 24 ч после операции. Такой режим введения ГСБ-106 был выбран, поскольку через 24 ч после начала ишемии формирование зоны инфаркта завершено [21], и снижение объёма повреждения может быть обусловлено нейрорегенерацией, но не нейропротекцией. Показатели нейрогенеза и синаптогенеза определяли в гиппокампе и стриатуме методом Вестерн-блот анализа с использованием антител к маркеру пролиферации Ki-67 и маркерам синаптогенеза — синаптофизину и PSD-95. Выбор структур мозга обусловлен тем, что в гиппокампе локализована одна из основных нейрогенных зон взрослого мозга (субгранулярная зона), а стриатум является областью, наиболее подверженной повреждению при окклюзии средней мозговой артерии [22].

## Материалы и методы / Materials and methods

### Материалы / Materials

ГСБ-106 (гексаметилендиамид (бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина) был синтезирован в Отделе химии НИИ фармакологии имени В.В. Закусова как описано в работе [12].  $[\alpha]^{21D} = -42,3$  °(с 1; H<sub>2</sub>O); Tпл = 153–161 °С.

Реактив Фолина был получен в компании Merck (Дармштадт, Германия); бычий сывороточный альбумин (BSA), Na-дезоксихолат, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> и ингибиторный протеазный коктейль были получены в компании Sigma-Aldrich (Мюнхен, Германия); додецилсульфат-натрия (SDS), Tween-20, TEMED, бис-акриламид, Tris, дитиотреитол (DTT), ЭДТА, Тритон X-100, глицерин были фирмы Bio-Rad Laboratories (Геркулес, США); первичные антитела против PSD-95 и против Ki-67 были фирмы ThermoFisher Scientific (Уолтем, США); первичные антитела к синаптофизину и  $\beta$ -актину были получены в компании Santa Cruz Biotechnology (Гейдельберг, Германия); вторичные антитела anti-rabbit IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена, были фирмы Abcam (Кембридж, Великобритания).

### Животные / Animals

Эксперименты были проведены на 41 крысе-самце линии Вистар, массой 220–250 г на момент начала эксперимента, полученной в филиале «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА. Животных содержали в условиях вивария при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному гра-

нулированному корму и воде. Эксперименты с животными проводили в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств». Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

### Моделирование ишемического инсульта / Modeling of ischemic stroke

Ишемический инсульт моделировали внутрисудистым перекрытием средней мозговой артерии нитью [22]. Все хирургические манипуляции осуществляли с помощью титановых микрохирургических инструментов. Крыс вводили в наркоз 5 % раствором хлоралгидрата (350 мг/кг, в/б). Выполняли срединный разрез в области шеи и выделяли с правой стороны шеи сонный треугольник, образованный сверху двубрюшной мышцей, латерально — грудино-ключично-сосцевидной мышцей и медиально — грудино-подъязычной мышцей. В сонном треугольнике выделяли сонный сосудисто-нервный пучок, образованный общей сонной артерией и блуждающим нервом. Осторожно отделяли блуждающий нерв и накладывали микрохирургическую сосудистую титановую клипсу на общую сонную артерию. На внешнюю сонную артерию накладывали хлопчатобумажную нить, плотно затягивали. На внутреннюю сонную артерию накладывали викриловую нить, затягивали не плотно, после чего перерезали внешнюю сонную артерию проксимальнее наложения нити. Гепаринизированную нейлоновую нить диаметром 0,25 мм вводили через культю внешней сонной артерии во внутреннюю сонную артерию на глубину 19–21 мм (до перекрытия средней мозговой артерии) и фиксировали микрососудистой клипсой. Перекрытие кровотока осуществляли в течение 60 мин, после чего нить извлекали из сосуда, восстанавливая кровоснабжение в бассейне средней мозговой артерии. После извлечения нити культю внешней сонной артерии закрывали коагуляцией электрокаутером до полной герметичности. Ложнооперированные животные подвергались тем же процедурам, за исключением перерезания сосудов и введения нити. Срединный разрез шеи зашивали хлопчатобумажными нитями и обрабатывали стрептоцидом.

### Дизайн эксперимента / Experiment design

Животных с экспериментальным инсультом случайным образом делили на 2 группы — группа «ОСМА» (окклюзия средней мозговой артерии) и группа «ОСМА+ГСБ-106». Дипептид ГСБ-106 растворяли в дистиллированной воде и вводили в/б в дозе 0,1 мг/кг через 24 ч после операции и затем 1 раз в сутки, окончание введения — на 6-е сутки после операции. Доза ГСБ-106 была выбрана на основа-

нии предыдущих экспериментов [13]. Животные из групп «л.о.» (ложная операция) и «ОСМА» получали в том же режиме воду для инъекций. На 7-е сутки после операции крыс декапитировали под глубоким наркозом (хлоралгидрат, 350 мг/кг, в/б), головной мозг извлекали при температуре 0–4 °С. Примерно у половины животных (6 из группы «л.о.», 6 из группы «ОСМА», 10 из группы «ОСМА+ГСБ-106») забирали мозг целиком для морфометрического анализа объёма ишемического повреждения; у другой половины животных (6 из группы «л.о.», 7 из группы «ОСМА» и 6 из группы «ОСМА+ГСБ-106») выделяли из повреждённого полушария стриатум и гиппокамп для дальнейших биохимических исследований. Схема эксперимента приведена на рис. 1.

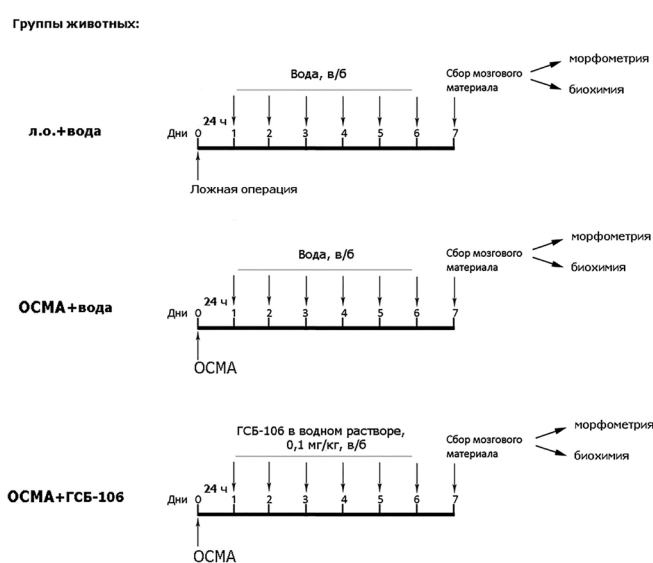


Рис. 1. Схема эксперимента  
Fig. 1. Scheme of the experiment

### Измерение объёма ишемического повреждения / Measurement of the volume of ischemic damage

Объём ишемического повреждения оценивали с помощью морфометрического анализа отсканированных изображений срезов мозга, окрашенных 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом (ТТХ) [23]. Для этого головной мозг помещали, чтобы отмыть от крови, в ёмкость с физиологическим раствором на 1 мин. Затем мозг замораживали при –20 °С в течение 12 мин и с помощью специальной формы с пазами для точной резки и микротомных лезвий разрезали на 5 фронтальных срезов толщиной 1,7 мм. Срезы мозга помещали в чашку Петри с 2 % раствором ТТХ в фосфатно-солевом буфере и инкубировали в течение 15 мин при 37 °С. Затем срезы переворачивали и инкубировали ещё 15 мин при 37 °С, после чего фиксировали в 10 % формалине в течение 30 мин. Затем срезы помещали на предметные стекла и сканировали с двух сторон с помощью планшетного сканера с раз-

решением 2400 dpi в режиме цветного изображения. С помощью свободно распространяемой программы «Image J» (National Institutes of Health, США) измеряли площадь инфаркта (неокрашенная область) и площадь всего среза.

Объем инфаркта определяли по формуле:

$$V = d \times \sum A_i / 2,$$

где:  $\sum A_i$  – сумма площадей области повреждения на срезах мозга с каждой из сторон;  $d$  – толщина среза.

#### **Определение уровня маркера пролиферации Ki-67 и синаптических маркеров / Determination of the level of the Ki-67 proliferation marker and synaptic markers**

Стриатум и гиппокамп поврежденного полушария после извлечения замораживали в жидком азоте и хранили при  $-70^\circ\text{C}$ . Затем образцы гомогенизировали в лизис-буфере (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 % Triton X-100) pH 7,5 в соотношении 1:5 (ткань:буфер) при температуре  $4^\circ\text{C}$  в течение 5 минут, затем помещали в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировали 10 минут при 13000 rpm и  $4^\circ\text{C}$ . Концентрацию белка в образцах измеряли по методу Фолина–Лоури [24]. Белки разделяли в градиентном полиакриламидном геле 5–15 % (ПААГ). Перенос белков с ПААГ на мембрану PVDF осуществляли электроэлюцией в течение 50 минут [25].

Преинкубацию Western-блотов проводили в буфере TBS-T (с добавлением 1 % Tween-20) с 3 % (масса/объем) BSA в течение 1 часа. Затем мембраны инкубировали в присутствии первичных антител против PSD-95 в разведении 1:1000, против синаптофизина в разведении 1:5000, против Ki-67 в разведении 1:2000 в течение 1 ч при температуре  $4^\circ\text{C}$ . Затем после отмывки в буфере TBS-T (с добавлением 1 % Tween-20) с 0,5 % (масса/объем) BSA мембраны инкубировали в присутствии вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (разведение 1:750) в течение 45 минут. Детектирование белков осуществляли после отмывки от вторичных антител в буфере TBS-T (с добавлением 1 % Tween-20) с 0,5 % (масса/объем) BSA в реакции с ECL-реагентами (с использованием гель-документирующей системы Alliance UVITEC (Великобритания)). Денситометрию полученных изображений проводили с помощью программы и GIMP2.

#### **Статистическая обработка / Statistical processing**

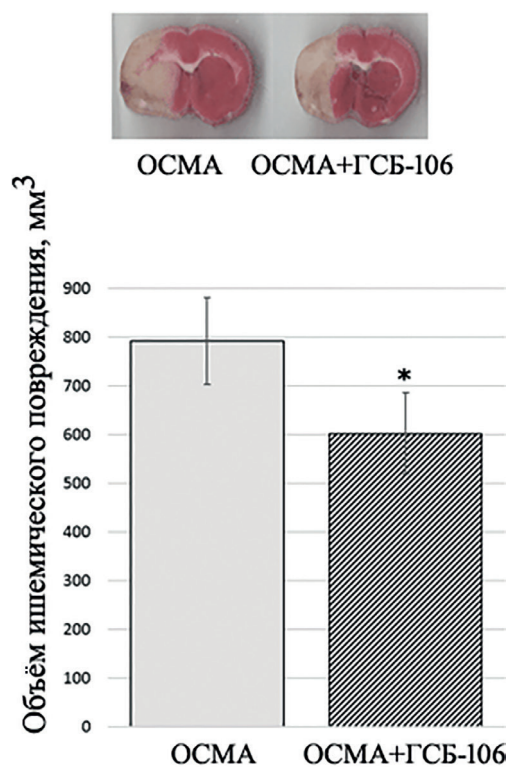
Межгрупповые различия оценивали с помощью U-теста Манна-Уитни. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ . Терапевтический эффект ГСБ-106 оценивали по формуле: (значение параметра в группе «ОСМА+ГСБ-106» – значение параметра в группе «ОСМА») / (значение параметра в группе «л.о.» – значение параметра в группе «ОСМА»)  $\times 100$  %.

## **Результаты и обсуждение / Results and discussion**

### **Дипептид ГСБ-106 снижает объем инфаркта мозга / Dipeptide GSB-106 reduces the volume of brain infarction**

У ишемизированных животных выявлена выраженная зона инфаркта в правом полушарии, включающая кору и стриатум, которая составляла в среднем  $792 \pm 89 \text{ мм}^3$ . ГСБ-106 снижал объем повреждения мозга до  $602 \pm 89 \text{ мм}^3$  (на 24 %) ( $p < 0,05$ ) (рис. 2).

Ранее было показано, что ГСБ-106 снижает объем ишемического повреждения в тех же условиях на 60 % при начале введения через 4 ч после операции [13]. Эффект ГСБ-106 при начале его введения через 24 ч после операции был значительно менее выраженным. По-видимому, это связано с тем, что к 12 часам после начала ишемии формирование зоны инфаркта



**Рис. 2.** ГСБ-106 снижает объем инфаркта мозга после ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс  
**Fig. 2.** GSB-106 reduces the volume of cerebral infarction after ischemic stroke caused by transient occlusion of the middle cerebral artery in rats

*Примечания:* ГСБ-106 вводили в дозе 0,1 мг/кг, в/б, через 24 ч после операции и затем 1 раз в сутки в течение 6 дней; Объем инфаркта мозга определяли с помощью морфометрии срезов, окрашенных TTC, на 7-е сутки после операции; Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «ОСМА» (U-тест Манна-Уитни).

*Notes:* GSB-106 was administered at a dose of 0.1 mg / kg, intraperitoneal, 24 hours after surgery and then once a day for 6 days; The volume of brain infarction was determined using morphometry of sections stained with TTC on the 7th day after surgery; The data is presented in the form of averages and standard errors of the mean; \* –  $p < 0.05$  compared to the "MCAO" group (U-Mann-Whitney test).

практически завершено [21], и в этих условиях роль нейропротекции в снижении объёма ишемического повреждения незначительна. Мы предполагаем, что активность ГСБ-106 в данном случае обусловлена нейрогенеративными свойствами дипептида.

**Дипептид ГСБ-106 восстанавливает нарушенный нейрогенез в гиппокампе и стриатуме / Dipeptide GSB-106 restores impaired neurogenesis in the hippocampus and striatum**

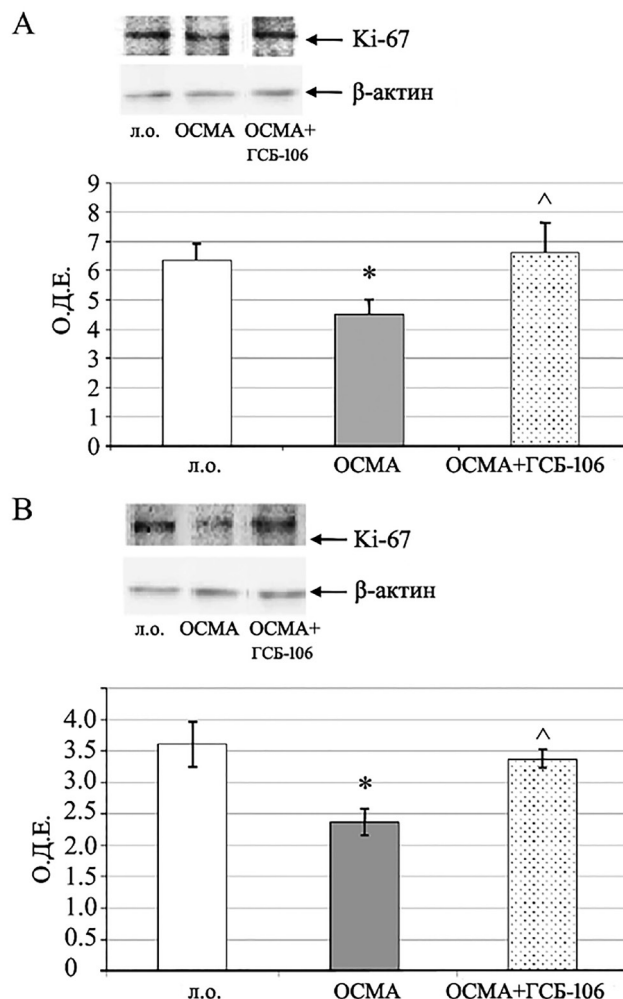
У ишемизированных нелеченых животных иммунореактивность к маркеру пролиферации Ki-67 по сравнению с ложнооперированными животными была снижена ( $p < 0,05$ ) в гиппокампе и стриатуме повреждённого полушария на 29 и 33 %, соответственно (в гиппокампе: «л.о.» –  $6,3 \pm 0,6$  О.Д.Е., «ОСМА» –  $4,5 \pm 0,5$  О.Д.Е.; в стриатуме: «л.о.» –  $3,6 \pm 0,4$  О.Д.Е., «ОСМА» –  $2,4 \pm 0,2$  О.Д.Е.). Это свидетельствует об угнетении нейрогенеза (и/или глиогенеза) в этих областях (рис. 3). Дипептид ГСБ-106 восстанавливал иммунореактивность к Ki-67 как в гиппокампе (до  $6,6 \pm 0,5$  О.Д.Е.), так и в стриатуме (до  $3,4 \pm 0,2$  О.Д.Е.), с терапевтическим эффектом, соответственно, 117 и 83 % ( $p < 0,05$ ) (см. рис. 3).

**Дипептид ГСБ-106 восстанавливает нарушенный синаптогенез / The GSB-106 dipeptide restores impaired synaptogenesis**

Иммунореактивность к синаптическим маркерам синаптофизину и PSD-95 была статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижена в повреждённом стриатуме у ишемизированных животных по сравнению с ложнооперированными (на 32 и 26 %, соответственно) (синаптофизин:  $10,3 \pm 2,3$  О.Д.Е. – в группе «л.о.» и  $7,0 \pm 0,9$  О.Д.Е. – в группе «ОСМА»; PSD-95:  $3,5 \pm 0,9$  О.Д.Е. – в группе «л.о.» и  $2,6 \pm 0,4$  О.Д.Е. – в группе «ОСМА») (рис. 4), что свидетельствует о снижении количества синапсов в этой области. ГСБ-106 полностью восстанавливал иммунореактивность к синаптофизину (до  $12,3 \pm 2,3$  О.Д.Е., терапевтический эффект 160 %) и PSD-95 (до  $4,7 \pm 0,4$  О.Д.Е., терапевтический эффект 233 %) (см. рис. 4).

Известно, что BDNF является одним из ключевых факторов регуляции нейрогенеза во взрослом мозге. Он стимулирует пролиферацию нейрональных стволовых клеток, дифференцировку и миграцию нейробластов и способствует их выживаемости [26–28]. В ряде работ показана стимуляция нейрогенеза под действием BDNF в условиях экспериментальной церебральной ишемии. Так, на модели ишемического инсульта, вызванного фототромбозом сосудов префронтальной коры головного мозга у крыс, BDNF при внутривенном субхроническом введении стимулировал гиппокампальный нейрогенез и миграцию нейробластов из субвентрикулярной зоны по направлению к повреждённой коре [7]. Сходные эффекты BDNF были получены на модели ишемического инсульта у

крыс, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии [8]. На этой модели генная BDNF-терапия приводила к значительному увеличению уровней BrdU-позитивных клеток и мигрирующих нейробластов в субвентрикулярной зоне через неделю после операции, а через 4 недели после операции – к

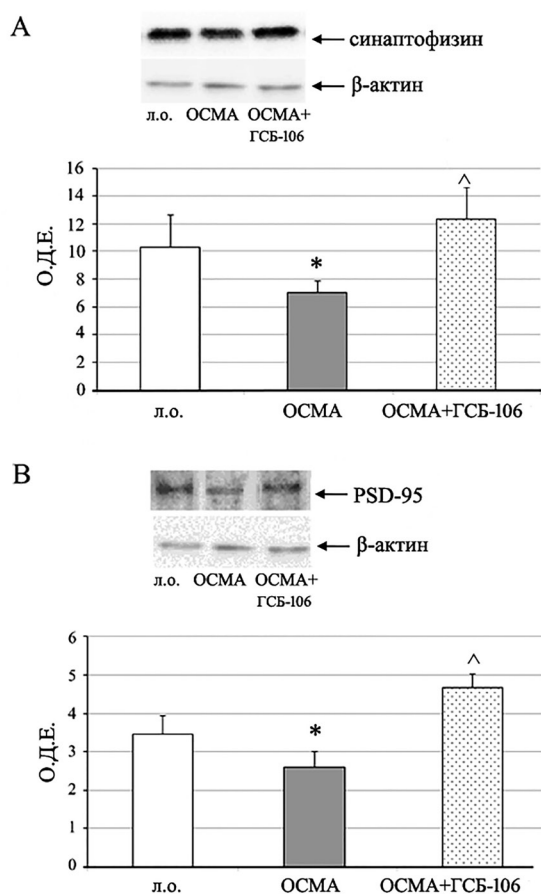


**Рис. 3.** Дипептид ГСБ-106 восстанавливает иммунореактивность к Ki-67 в гиппокампе (А) и стриатуме (Б) повреждённого полушария после ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс

**Fig. 3.** GSB-106 dipeptide restores immunoreactivity to Ki-67 in the hippocampus (A) and striatum (Б) of the damaged hemisphere after ischemic stroke caused by transient occlusion of the middle cerebral artery in rats

*Примечания:* ГСБ-106 вводили в дозе 0,1 мг/кг, в/б, через 24 ч после операции и затем 1 раз в сутки в течение 6 дней; О.Д.Е. – относительные денситометрические единицы; Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «л.о.»; ^ –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «ОСМА» (U-тест Манна–Уитни).

*Notes:* GSB-106 was administered at a dose of 0.1 mg / kg, intraperitoneal, 24 hours after surgery and then once a day for 6 days; R.D.U. – relative densitometric units; Data are presented in the form of averages and standard deviations; \* –  $p < 0.05$  compared with the "sham" group; ^ –  $p < 0.05$  compared with the "MCAO" group (U-Mann–Whitney test).



**Рис. 4.** Дипептид ГСБ-106 увеличивает иммунореактивность к синаптическим маркерам синаптофизину (А) и PSD-95 (Б) в стриатуме повреждённого полушария после ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс **Fig. 4.** Dipeptide GSB-106 increases immunoreactivity to synaptic markers synaptophysin (A) and PSD-95 (B) in the striatum of the damaged hemisphere after ischemic stroke caused by transient occlusion of the middle cerebral artery in rats

*Примечания:* ГСБ-106 вводили в дозе 0,1 мг/кг, в/б, через 24 ч после операции и затем 1 раз в сутки в течение 6 дней; О.Д.Е. – относительные денситометрические единицы; Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «л.о.»; ^ –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «ОСМА» (U-тест Манна–Уитни).  
*Notes:* GSB-106 was administered at a dose of 0.1 mg / kg, intraperitoneal, 24 hours after surgery and then once a day for 6 days; R.D.U. – relative densitometric units; Data are presented in the form of averages and standard deviations; \* –  $p < 0.05$  compared with the "sham" group; ^ –  $p < 0.05$  compared with the "MCAO" group (U-Mann–Whitney test).

увеличению количества вновь образовавшихся нейронов на границе зоны ишемического повреждения по сравнению с активным контролем [8]. Стимуляция нейрогенеза в условиях церебральной ишемии установлена и для низкомолекулярного миметика BDNF N,N',N'-tris (2-hydroxyethyl)-1,3,5-benzene tricarboxamide (LM22A-4), который активирует TrkB рецепторы и их PI3K/АКТ и MAPK/ERK сигнальные пути [11]. Соединение LM22A-4 при хроническом интраназальном введении мышам после односторон-

ней окклюзии общей сонной артерии с последующей гипоксией через неделю после операции увеличивало уровни пролиферирующих клеток и мигрирующих нейробластов в субвентрикулярной зоне, а через 6 и 10 недель после операции – количество вновь образовавшихся нейронов в прилегающих к ишемическому повреждению областях коры и стриатума.

В настоящем исследовании дипептидный миметик BDNF ГСБ-106 восстанавливал сниженную иммунореактивность к Ki-67 в гиппокампе и стриатуме ишемизированных животных с терапевтическими эффектами 117 и 83 %, соответственно. Исходя из данных литературы, можно предположить, что дипептидный миметик BDNF ГСБ-106 в условиях экспериментального ишемического инсульта стимулирует нейрогенез в гиппокампе и стриатуме повреждённого полушария.

Роль BDNF в регуляции синаптогенеза хорошо изучена. BDNF стимулирует рост и ветвление аксонов и дендритов и формирование синапсов [29] как на пре-, так и на постсинаптическом уровнях [30, 31]. Показано, что BDNF стимулирует синаптогенез в условиях ишемического повреждения мозга. Так, на модели транзиторной окклюзии средней мозговой артерии у крыс BDNF, доставленный в повреждённое полушарие с помощью генной терапии, способствовал полному восстановлению на 7-е сутки после операции уровня синаптофизина, сниженного у ишемизированных и не получавших BDNF животных [4]. Сходный эффект был получен для дипептида ГСБ-106 в отношении не только синаптофизина, но и постсинаптического маркера PSD-95.

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что миметик BDNF ГСБ-106, как и нативный нейротрофин, стимулирует синаптогенез в условиях церебральной ишемии.

### Заключение / Conclusion

Таким образом, димерный дипептидный миметик BDNF ГСБ-106 проявляет нейрорегенеративные свойства в условиях клинически значимого терапевтического окна (24 ч) на модели ишемического инсульта, предположительно за счёт стимуляции нейрогенеза и синаптогенеза. Выявленные эффекты свидетельствуют о перспективности дипептида ГСБ-106 в качестве потенциального лекарственного средства для лечения постинсультного состояния.

### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ADDITIONAL INFORMATION

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (Проект № 18-15-00381).

**Financing.** The work was supported by the Russian Science Foundation (Project No. 18-15-00381).

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Поварнина Полина Юрьевна***Автор, ответственный за переписку*

e-mail: povarnina@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>

SPIN-код: 5498-6724

к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

**Антипова Татьяна Алексеевна**

e-mail: zenina\_tatyana@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9309-4872>

SPIN-код: 7723-6008

к. б. н., заведующая лабораторией фармакологии нейропротекции ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

**Логвинов Илья Олегович**

e-mail: logvinov\_ilya@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6101-1035>

SPIN-код: 9909-9630

н. с. лаборатории фармакологии нейропротекции ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

**Никифоров Дмитрий Михайлович**

e-mail: mrdmwriter@gmail.com

SPIN-код: 7028-8335

м. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

**Povarnina Polina Yu.***Corresponding author*

e-mail: povarnina@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>

SPIN code: 5498-6724

PhD Biological Sci., Senior research scientist of the Laboratory of peptide bioregulators of the Department of medicinal chemistry FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

**Antipova Tatyana A.**

e-mail: zenina\_tatyana@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9309-4872>

SPIN code: 7723-6008

PhD Biological Sci., Head Neuroprotection pharmacology laboratory, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

**Logvinov Ilya O.**

e-mail: logvinov\_ilya@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6101-1035>

SPIN code: 9909-9630

Research Scientist, Neuroprotection pharmacology laboratory FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

**Nikiforov Dmitriy M.**

e-mail: mrdmwriter@gmail.com

SPIN code: 7028-8335

Junior research scientist of the Laboratory of peptide bioregulators of the Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

**Список литературы / References**

1. Kowiański P, Lietzau G, Czuba E et al. BDNF: A key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. *Cell Mol Neurobiol.* 2018;38(3):579–593. DOI: 10.1007/s10571-017-0510-4.
2. Autry AE, Monteggia LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev.* 2012;64(2):238–258. DOI: 10.1124/pr.111.005108.
3. Stanne TM, Aberg ND, Nilsson S et al. Low circulating acute brain-derived neurotrophic factor levels are associated with poor long-term functional outcome after ischemic stroke. *Stroke.* 2016;47(7):1943–1945. DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.012383.
4. Zhang Y, Qiu B, Wang J et al. Effects of BDNF-transfected BMSCs on neural functional recovery and synaptophysin expression in rats with cerebral infarction. *Mol Neurobiol.* 2017;54(5):3813–3824. DOI: 10.1007/s12035-016-9946-7.
5. Yu S-J, Tseng K-Y, Shen H et al. Local administration of AAV-BDNF to subventricular zone induces functional recovery in stroke rats. *PLoS One.* 2013;8(12):e81750. DOI: 10.1371/journal.pone.0081750.
6. Han Q, Li B, Feng H, et al. The promotion of cerebral ischemia recovery in rats by laminin-binding BDNF. *Biomaterials.* 2011;32(22):5077–5085. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.072

7. Schäbitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke.* 2007;38(7):2165–2172. DOI: 10.1161/STROKEAHA.106.477331.
8. Jeong CH, Kim SM, Lim JY et al. Mesenchymal stem cells expressing brain-derived neurotrophic factor enhance endogenous neurogenesis in an ischemic stroke model. *Biomed Res Int.* 2014;2014. DOI: 10.1155/2014/129145.
9. Fletcher JM, Hughes RA. Modified low molecular weight cyclic peptides as mimetics of BDNF with improved potency, proteolytic stability and transmembrane passage *in vitro.* *Bioorganic Med Chem.* 2009;17(7):2695–2702. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.02.053.
10. Zhao S, Yu A, Wang X et al. Post-Injury Treatment of 7,8-Dihydroxyflavone Promotes Neurogenesis in the Hippocampus of the Adult Mouse. *J Neurotrauma.* 2016;33(22):2055–2064. DOI: 10.1089/neu.2015.4036.
11. Han J, Pollak J, Yang T, et al. Delayed administration of a small molecule TrkB ligand promotes recovery after hypoxic-ischemic stroke. *Stroke.* 2012;43(7):1918–1924. DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.641878.
12. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В., и др. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора. *Биоорганическая Химия.* 2012;38(3):280–290. [Gudashева TA, Tarasyuk AV, Pomogaibo SV et al. Gudashева TA, Tarasyuk AV, Pomogaibo SV et al. Design

- and synthesis of dipeptide mimetics of the brain-derived neurotrophic factor. *Russ J Bioorg Khim.* 2012;38(3):280–290. (In Russ.). DOI: 10.1134/S1068162012030053.
13. 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.
14. Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Николаев С.В. и др. Дипептидные миметики отдельных петель NGF и BDNF активируют PLC- $\gamma$ 1. Доклады РАН. *Науки о жизни.* 2020;494(1):486–490. DOI: 10.31857/S2686738920050133. [Gudasheva TA, Logvinov IO, Nikolaev S et al. Dipeptide mimetics of different NGF and BDNF loops activate PLC- $\gamma$ 1. *Dokl Biochem Biophys.* 2020;494(1):244–247 (In Russ). DOI: 10.1134/S1607672920050075].
15. Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Дипептидный миметик 4-й петли мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 активирует TrkB, Erk, Akt и способствует выживаемости нейронов *in vitro*. *Доклады Академии наук.* 2013;451(5):577. DOI: 10.7868/S0869565213240250. [Gudasheva TA, Logvinov IO, Antipova TA, Seredenin SB. Brain-derived neurotrophic factor loop 4 dipeptide mimetic GSB-106 activates TrkB, Erk, and Akt and promotes neuronal survival *in vitro*. *Dokl Biochem Biophys.* 2013;451:212–214. (In Russ). DOI: 10.1134/S1607672913040121].
16. Gudasheva TA, Povarnina P, Tarasiuk AV, Seredenin SB. The low molecular weight brain-derived neurotrophic factor mimetics with antidepressant-like activity. *Curr Pharm Des.* 2019;25(6):729–737. DOI: 10.2174/1381612825666190329122852.
17. Колыванов Г.Б., Жердев В.П., Грибакина О.Г. и др. Сравнительная доклиническая фармакокинетика и биодоступность таблетированной лекарственной формы антидепрессанта ГСБ-106. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2019;167(5):577–580. [Kolyvanov GB, Zherdev VP, Gribakina OG, et al. Comparative preclinical pharmacokinetics and bioavailability of antidepressant GSB-106 tablet form. *Bull Exp Biol Med.* 2019;167(5):637–640. (In Russ.). DOI: 10.1007/s10517-019-04587-w.
18. Алексеева С.В., Сорокина А.В., Волкова А.В. и др. Исследование острой и хронической токсичности готовой лекарственной формы дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2019;(2):46–50. [Alekseeva SV, Sorokina AV, Volkova AV, Zabrodina VV, Miroshkina IA, Kachalov KS, Alekseev IV, Zaharov AD, Povarnina PYu, Durnev AD. The study of the acute and chronic toxicity dipeptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor GSB-106 finished dosage form. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2019;(2):46–50. (In Russ.). DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10047.
19. Гудашева Т.А., Поварнина П.Ю., Середенин С.Б. Дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора предотвращает нарушение нейрогенеза у стрессированных мышей. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2016;162(10):448–451. [Gudasheva TA, Povarnina PY, Seredenin SB. Dipeptide Mimetic of the Brain-derived Neurotrophic Factor Prevents Impairments of Neurogenesis in Stressed Mice. *Bull Exp Biol Med.* 2017;162(4):454–457. (In Russ.). DOI: 10.1007/s10517-017-3638-9.
20. Гудашева Т.А., Поварнина П.Ю., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Дипептидный миметик BDNF ГСБ-106 с антидепрессивной активностью стимулирует синаптогенез. *Доклады Академии Наук.* 2018;481(6):691–693. DOI: 10.31857/S086956520002110-4. [Gudasheva TA, Povarnina PY, Antipova TA, Seredenin SB. Dipeptide mimetic of the BDNF GSB-106 with antidepressant-like activity stimulates synaptogenesis. *Dokl Biochem Biophys.* 2018;481(1):225–227. (In Russ). DOI: 10.1134/S1607672918040130].
21. McCullough LD, Liu F. Middle cerebral artery occlusion model in rodents: Methods and potential pitfalls. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:464701. DOI: 10.1155/2011/464701.
22. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989;20(1):84–91. DOI: 10.1161/01.STR.20.1.84.
23. Bederson JB, Pitts L, Germano S, Nishimura M et al. Evaluation of 2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke.* 1986;17(6):1304–1308. DOI: 10.1161/01.str.17.6.1304.
24. Alam A. A model for formulation of protein assay. *Anal Biochem.* 1992;203(1):121–126. DOI: 10.1016/0003-2697(92)90051-8.
25. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 1979;76(9):4350–4354. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.
26. Numakawa T, Odaka H, Adachi N. Actions of brain-derived neurotrophin factor in the neurogenesis and neuronal function, and its involvement in the pathophysiology of brain diseases. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3650. DOI: 10.3390/ijms19113650.
27. Chiamarello S, Dalmasso G, Bezin L et al. BDNF/TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur J Neurosci.* 2007;26(7):1780–1790. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2007.05818.x.
28. Bath KG, Akins MR, Lee FS. BDNF control of adult SVZ neurogenesis. *Dev Psychobiol.* 2012;54(6):578–589. DOI: 10.1002/dev.20546.
29. Mizui T. BDNF and Synaptic Plasticity: The Recent Cell Biology for Understanding of Brain Disorders. *Clin Pharmacol Biopharm.* 2013;S1:004. DOI: 10.4172/2167-065x.s1-004.
30. Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol.* 2010;70(5):304–322. DOI: 10.1002/dneu.20765.
31. Tartaglia N, Du J, Tyler WJ et al. Protein Synthesis-dependent and -independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem.* 2001;276(40):37585–37593. DOI: 10.1074/jbc.M101683200.