

# Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2014

И. В. Халин<sup>1</sup>, Н. З. Мусина<sup>2</sup>, Р. Н. Аляутдин<sup>3</sup>, Б. К. Романов<sup>3</sup>, Н. Д. Бунятян<sup>3</sup>

## ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ BDNF (BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR — НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР МОЗГА) ПРИ НЕВРОПАТИИ ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА

<sup>1</sup> Медицинский факультет Национального университета обороны (Малайзия, Куала Лумпур).

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва.

<sup>3</sup> ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва.

В обзоре литературы представлены сведения о нейротрофическом факторе роста (BDNF) как перспективном соединении, препятствующем гибели ганглиозных клеток сетчатки. Рассмотрены механизмы действия BDNF, а также возможные пути доставки этого белка в сетчатку глаза.

**Ключевые слова:** BDNF; ганглиозные клетки сетчатки; стволовые клетки; наночастицы.

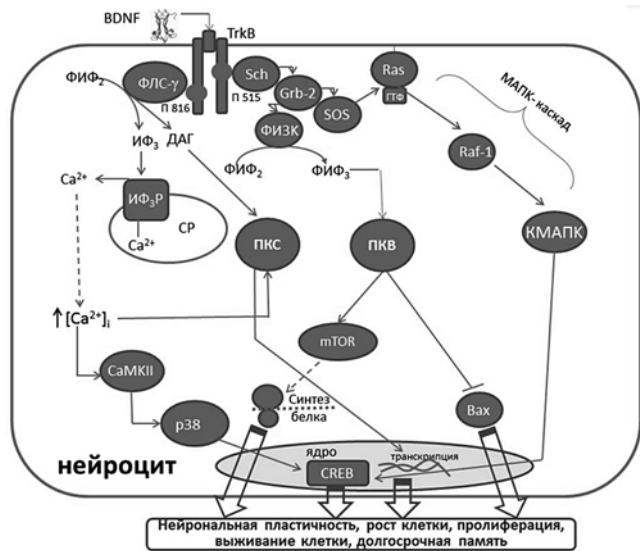
Одной из причин слепоты является невропатия зрительного нерва. Эта патология включает поражение зрительного нерва, сопровождающееся потерей ганглиозных клеток сетчатки (ГКС), экскавацией диска зрительного нерва и, как следствие, появлением прогрессирующих дефектов полей зрения [1, 2]. Перспективным направлением терапии этих заболеваний и профилактики слепоты является сохранение клеток сетчатки, особенно ГКС. В этой связи активно исследуются соединения, обладающие нейропротективным действием. К числу таких соединений относятся нейротрофины, небольшие по размеру секретируемые белки, имеющие ключевое значение в развитии и функционировании нервной системы. Известно, что нейротрофины, кроме центральной нервной системы, экспрессируются во многих тканях организма, в том числе и в сетчатке, где играют важную роль в жизнеобеспечении ГКС. Среди нейротрофинов наиболее перспективным для лечения невропатии зрительного нерва является нейротрофический фактор роста, который секретируется ГКС [3] и астроцитами сетчатки [4], кроме того этот фактор роста синтезируется в мозге, откуда ретроградно достигает аксонов, связанных рецепторами с ГКС в сетчатке. Этот белок успешно применяется в экспериментальной и клинической практике для лечения нейродегенеративных заболеваний центральной нервной системы, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, ишемический инсульт и др. [5].

В данном обзоре представлены данные о клеточном механизме действия нейротрофического фактора роста, а также перспективные пути доставки этой молекулы для лечения нейродегенеративных заболеваний сетчатки.

### *Структура BDNF, взаимодействие с рецепторами и механизмы сопряжения*

Нейротрофический фактор роста (BDNF — от англ. Brain-Derived Neurotrophic Factor) является одним из 4 белков, входящих в особую и наиболее специфическую по своей биологической активности группу биологически активных соединений, получившую название семейства нейротрофинов. Кроме BDNF, туда входят фактор роста нервов (NGF — от англ. Nerve growth factor), нейротрофин 3 (NT-3) и нейротрофин 4 (NT-4). BDNF впервые был выделен из мозга свиньи в 1982 г. [6]. Из 3 кг мозга было получено около 2 мкг очищенного белка молекулярной массой 12300 кДа, который повышал выживаемость и рост волокон в культуре клеток чувствительных нейронов эмбриона цыпленка. Позже была определена аминокислотная последовательность белка, состоящая из 252 аминокислотных остатков [7]. Пространственная структура BDNF представляет собой нековалентно связанный гомодимер, при этом каждый мономер состоит из 3 антипараллельных пар бета-нитей, соединенных с 4 петлями бета-шпилек [8]. Образование “зрелого” белка массой 14000 Да осуществляется путем “расщепления” предшественника, парацеллюлярное “расщепление” про-BDNF происходит при участии тканевого плазмина [9].

Известны 3 типа рецепторов, взаимодействующих с BDNF: рецептор, в состав которого входит тропомиозиновая киназа, типа В (TrkB); нейротрофиновый рецептор p75 (p75NTR) и сортилин. TrkB относится к большому семейству тирозин-киназных рецепторов [10]. Молекула TrkB человека представляет собой трансмембранный гликопротеин типа I (экстрацеллюлярный N-конец), состоящий из 792 аминокислотных



Основные пути сигнальной трансдукции TrkB рецептора. ФЛС — фосфолипаза С; ИФ3 — инозитолтрифосфат; ФИФ2 — фосфатидилинозитолдифосфат; ДАГ — диацилглицерол; ГТФ — гуанилтрифосфат; ПКС — протеинкиназа С; ПКВ — протеинкиназа В; ФИЗК — фосфатидилинозитол-3-киназа; СаМКII —  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-зависимая протеинкиназа 2; МАПК — митоген-активируемая протеинкиназа; КМАПК — киназа митоген-активируемой протеинкиназы; СР — саркоплазматический ретикулум.

остатков, двух N-концевых областей, богатых цистеином, между которыми расположен домен, богатый лейцином. Ближайший к мембране иммуноглобулиноподобный (Ig)-домен осуществляет непосредственное связывание с лигандом — BDNF [11]. Лигандами к рецептору TrkB являются BDNF и NT4. После связывания с лигандом мономерная структура рецептора подвергается димеризации, что в итоге приводит к аллостерической активации тирозинкиназной активности в цитоплазматическом домене рецептора: фосфорилированию множественных остатков тирозина 2 рецепторных субъединиц внутриклеточного домена. Рецептор способен находиться в динамическом равновесии между мономерными и димерным состояниями, регулируя активность дальнейшего каскада внутриклеточных биохимических реакций [12].

Рецептор p75NTR относится к семейству рецепторов фактора некроза опухолей (ФНО) [14]. Лигандами для p75 являются предшественники всех 4 нейротрофинов: про-NGF, про-BDNF, про-NT3 и про-NT4. Этот рецептор имеет низкую аффинность ко всем зрелым нейротрофинам [13]. При его активации снижается аффинность TrkB к BDNF и NT4 [16]. Основными функциями p75 являются регуляция клеточного выживания, рост аксонов и формирование миелина. Например, p75 может взаимодействовать с TrkB, формируя высокую аффинность к нейротрофину в месте связывания и, тем самым, повышая выживаемость клетки. С другой стороны, при взаимодействии p75 с сортилином связывание с предшественником нейротрофинов инициирует апоптоз. Сортилин является еще одним рецептором, взаимодействующим с BDNF, он отно-

сится к семейству вакуолярных белков. Этот рецептор связывается с про-BDNF, что приводит к активации внутриклеточной протеазы фурина, которая осуществляет превращение про-BDNF в зрелую форму BDNF. Таким образом, сортилин и p75 играют ключевую роль не только в клеточном выживании, но и в синтезе BDNF. Интересно, что экспрессия рецептора p75 не ограничивается нервной системой. Этот рецептор обнаруживается в жировой, мышечной ткани, печени, играя важную роль в регенерации, ремоделировании внеклеточного матрикса, ангиогенезе и регуляции углеводного обмена [14].

Высокоаффинное связывание BDNF с TrkB вызывает димеризацию рецептора, аутофосфорилирование остатков тирозина в околочембранном пространстве, создавая так называемые док-сайты или места для связывания. К этим сайтам присоединяются адапторные Shc- и Grb2-белки, фермент фосфолипаза  $Cy\ 1$ . Далее взаимодействие этих молекул инициирует активацию различных сигнальных каскадов, основные 3 из них обсуждаются в обзоре (рисунок).

Первый сигнальный путь связан с фосфолипазой С, этот путь имеет важное значение для синаптической пластичности. Фосфорилирование тирозина в положении 816 вызывает связывание фосфолипазы С с этим сайтом и активацию фермента. Затем фосфолипаза С гидролизует фосфодиэфирную связь между глицериновым остатком фосфолипида и полярной фосфатной группой фосфатидилинозитолдифосфата (ФИФ2) с образованием диацилглицерола (ДАГ) и инозитол 1,4,5-трифосфата (ИФ3). ИФ3 связывается с  $Ca^{2+}$  каналом эндоплазматической сети, стимулируя высвобождение ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазму (рисунок). Повышение внутриклеточного содержания  $Ca^{2+}$  способствует активации протеинкиназы С (ПКС) [15].

Другой путь, связанный с фосфатидилинозитол-3-киназой (ФИЗК), имеет решающее значение для выживания и пролиферации нервных клеток [21]. После фосфорилирования области тирозина в положении 515 адапторный белок Shc связывается с этим док-сайтом, взаимодействуя при этом с другим адаптерным белком Grb2. Эти протеины образуют в свою очередь док-сайт для ФИЗК, активируя его. Затем активный ФИЗК связывается с ФИФ2, преобразовывая его в фосфатидилинозитолтрифосфат (ФИФ3), что приводит к активации протеинкиназы В (ПКВ). ПКВ способна влиять на баланс про- и антиапоптотических белков в сторону повышения уровня белка Bcl-2, что приводит к угнетению белка Вах и, как следствие, предотвращает апоптоз клеток. Другой сигнальный каскад, регулируемый протеинкиназой В, приводит к активации молекулы mTOR (англ. — mammalian target of rapamycin), которая является серин-треонин протеинкиназой, инициирующей рост клеток, пролиферацию и синаптическую пластичность за счет регуляции синтеза белка в дендритах нервных клеток [16].

В образовании каскада реакций третьего сигнального пути участвует семейство ферментов, именуемых митоген-активируемые протеинкиназы (МАПК). Они

принимают участие в регуляции роста нейроцитов, их дифференцировке, а также в хранении и высвобождении нейромедиаторов [17]. В результате активации МАПК-каскада, происходит фосфорилирование киназы митоген-активируемой протеинкиназы (КМАПК), что в итоге приводит к повышению активности фактора транскрипции CREB, обеспечивая нейрогенез [18]. Таким образом, активация TrkB рецептора приводит к нейрональной пластичности, росту клеток, пролиферации, выживанию клеток или предотвращению апоптоза (рисунок).

**Методы доставки BDNF в сетчатку.** BDNF является новой терапевтической стратегией лечения заболеваний сетчатки или системных болезней, которые могут привести к повреждению ГКС. Целый ряд факторов (высокое внутриглазное давление, блокада аксонального тока, ишемия сетчатки) может вызвать повреждение клеток сетчатки. Примечательно, что они могут способствовать уменьшению продукции BDNF. Тирозинкиназный рецептор к BDNF экспрессируется несколькими типами клеток сетчатки, а именно, — колбочками, амакринными клетками, клетками Мюллера, а также ГКС [19].

Гемато-ретинальный барьер (ГРБ) ограничивает попадание BDNF в сетчатку при системном или периферическом введении вещества. ГРБ, как было показано исследователями, имеет аналогичные гематоэнцефалическому барьеру (ГЭБ) характеристики [20]. С другой стороны, анатомические особенности глаза позволяют избежать необходимости системного введения, ввиду относительно простого прямого доступа к сетчатке при интравитреальном введении. Этот фактор имеет принципиальное значение. Действительно, стратегия доставки лекарственного вещества в сетчатку при системном введении неизбежно приведет к необходимости решения сложных проблем преодоления гемато-офтальмического барьера и разрушения препарата в циркуляторном русле.

Первая интравитреальная инъекция раствора рекомбинантного белка BDNF в виде раствора в объеме 10 мкл была произведена в опытах на крысах [21]. Показано, что через 3 нед после пересечения зрительного нерва количество сохранившихся ГКС было выше в 2–3 раза по сравнению с контролем. Вместе с тем однократное введение вызывает лишь временный эффект, и к 5 нед после поражения выживаемость клеток была незначительно выше, чем в контроле. Для преодоления этого недостатка были предложены многократные инъекции BDNF, которые в итоге показали более стойкий эффект [22]. Таким образом, чтобы обеспечить длительное поддержание необходимой концентрации фактора роста необходимо преодолеть трудности, связанные с коротким периодом полуэлиминации BDNF, дозированием и нежелательными эффектами из-за многократных инъекций. Некоторые исследования показали целесообразность использования комбинации BDNF с другими факторами роста, например фактором роста из клеток глии или биологическими молекулами, что позволяло продлить период

полуэлиминации, повысить эффективность и уменьшить побочные эффекты [23]. В 2010 г. показано, что BDNF не только способствует выживанию ганглиозных клеток после перерезки зрительного нерва, но и играет важную роль в сохранении структурной целостности и функциональной активности нейронов головного мозга, отвечающих за создание зрительного образа [24]. Частичное преодоление вышеуказанных трудностей осуществлялось при использовании других методов доставки BDNF. Например, для достижения стабильной, длительной трансдукции клеток сетчатки исследователи воспользовались генной терапией с использованием вирусных векторов. Среди них наиболее подходящим для генной терапии вирусным вектором является адено-ассоциированный вирус (AAB), поскольку он обладает устойчивой экспрессией и относительной безопасностью. Было показано, что однократная интравитреальная инъекция вектора аденовируса, содержащего ген BDNF, вызывает длительную трансдукцию клеток Мюллера, которые начинают секретировать BDNF [25]. Клетки Мюллера играют важную роль в поддержании и функции нейронов сетчатки, и они охватывают всю толщу сетчатки. В 2005 г. установлено, что перенос гена BDNF с помощью AAB в клетки Мюллера оказывал защитное действие на фоторецепторы при индуцированной светом дегенерации сетчатки. Кроме того, показано, что ген BDNF можно доставить в ГКС с помощью феномена электропорации [26]. Такой транспорт может уменьшить нежелательные эффекты интравитреальной инъекции и ДНК BDNF может быть доставлена в ГКС без видимых повреждений клеток. Клетки, получившие ген BDNF посредством вирусного вектора, обеспечивают более устойчивый источник поступления BDNF в сетчатку, чем однократное интравитреальное введение рекомбинантного белка BDNF человека. Однако отсроченное начало экспрессии экзогенного гена является главным ограничением использования AAB. Поэтому сочетание генной терапии с экзогенным введением рекомбинантного белка BDNF, как было продемонстрировано, может компенсировать отсроченное начало AAB-опосредованной продукции белка BDNF [27].

В качестве альтернативы вирусным векторам для доставки специфического гена было предложено применение стволовых клеток. Преимущество стволовых клеток заключается в более длительной выживаемости и больших возможностях для создания систем доставки различных биопрепаратов. Установлено, что стволовые клетки костного мозга, пересаженные в субретинальное пространство, могут продуцировать BDNF, оказывая тем самым трофическое и защитное действие на поврежденную сетчатку крыс [28]. Другое исследование показало положительный эффект применения пигментного эпителия сетчатки в качестве переносчика гена BDNF. Клетки были пересажены в субретинальное пространство крыс [29]. Кроме того, успешно применены швановские клетки, которые в результате генетической модификации способны про-



дуцировать не только BDNF, но и фактор роста из клеток глии [30]. Комбинация BDNF с мезенхимальными клетками костного мозга позволила повысить дифференцировку глиальных и нейронных клеток из более примитивных. В 2012 г. направленно доставляли мезенхимальные стволовые клетки костного мозга крысы крысиной ДНК BDNF с использованием ретровирусного вектора. После интравитреальной или субретинальной инъекции клеток обнаружена повышенная экспрессия BDNF в сетчатке у крыс [31]. Важно отметить, что применение данных методов в значительной степени ограничивается сложностью техники субретинальной инъекции, например, образованием складок сетчатки, разделением сетчатки на слои (ретиношизис), кроме того возможны отторжение клеток, спонтанный рост опухоли, пролиферативная витреоретинопатия и хориоидальная неоваскуляризация.

На сегодняшний день наиболее успешными системами доставки лекарственных средств через гистогематические барьеры являются системы, в основе которых лежит применение различных наночастиц [32, 33]. По этой аналогии и в офтальмологии будет перспективным более углубленное изучение таких систем доставки, позволяющих расширить арсенал лекарственных средств, способных проникнуть в сетчатку, контролировать высвобождение и селективную целевую доставку лекарственного средства [34, 35]. Несмотря на многочисленные многообещающие результаты с использованием липосом, твердых липидных наночастиц, полимерных наночастиц, полимерных наномицелл и наноэмульсий для лечения различных инфекционных и неинфекционных заболеваний структур заднего сегмента глаза, информации о применении BDNF до сих пор не обнаружено [36]. С другой стороны, сообщалось об интравитреальной инъекции наночастиц из желатина, содержащих фактор роста фибробластов, для лечения дегенерации фоторецепторов у крыс [37].

## ЛИТЕРАТУРА

1. F. Quigley, A. Harry, *Progr. Retinal Eye Res.*, **18**, 39 – 57 (1999).
2. A. Bernstein, L. Steven, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, **44**, 4153 – 4162 (2003).
3. K. Herzog, C. von Bartheld, *J. Neurosci.*, **99**, 2891 – 2906 (1998).
4. G. Moretto, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **53**, 78 – 85 (1994).
5. Р. Н. Аляутдин, Б. К. Романов, В. К. Лепяхин и др., *Биопрепараты*, **2**, 22 – 30 (2014).

6. Y. Barde, E. David, H. Thoenen, *EMBO J.*, **1**, 549 – 551 (1982).
7. J. Leibrock, *Nature*, **34**, 149 – 152 (1989).
8. M. Pattararawan, K. Burgess, *J. Med. Chem.*, **46**, 5277 – 5291 (2003).
9. K. Gray, V. Ellis, *FEBS Lett.*, **582**, 907 – 910 (2008).
10. S. M. Massa, T. Yang, Y. Xie, et al., *J. Clin. Invest.*, **120**, 1774 – 1785 (2010).
11. H. J. Gruss, S. K. Dower, *Cytokines Mol. Ther.*, **1**, 75 – 105 (1995).
12. J. Frade, I. A. Barde, *Bioessays*, **20**, 137 – 145 (1998).
13. P. Casaccia-Bonnett, E. R. Bongarzone, *Nature*, **383**, 716 – 719 (1996).
14. A. Nykjaer, R. Lee, K. K. Teng, et al., *Nature*, **427**, 843 – 848 (2004).
15. D. Tardito, J. Perez, E. Tiraboschi, et al., *Pharmacol. Rev.*, **58**, 115 – 134 (2006).
16. N. Takei, N. Inamura, M. Kawamura, et al., *J. Neurosci.*, **24**, 9760 – 9769 (2004).
17. T. Numakawa, *Histol. Histopathol.*, **25**, 237 – 258 (2010).
18. R. W. Nickells, D. Zack, *Ophthalmol. Genetics*, **175**, 145 – 165 (1996).
19. T. N. Jelsma, A. van Belkum, E. Linkels, et al., *J. Neurobiol.*, **24**, 1207 – 1214 (1993).
20. H. Steuer, *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.*, **46**, 1047 – 1453 (2005).
21. J. Mey, S. Thanos, *Brain Res.*, **602**, 304 – 317 (1993).
22. S. Mansour-Robaey, D. B. Clarke, Y. C. Wang, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **91**, 1632 – 1636 (1994).
23. Q-L Fu, X. Huang, Y. Wang, et al., *Neurosci.*, **162**, 375 – 382 (2009).
24. A. J. Weber, *Visual Sci.*, **51**, 327 – 334 (2010).
25. X. Xiao, H. Y. Zhang, X. C. Tang, *Exp. Neurol.*, **144**, 113 – 124 (1997).
26. X. Mo, A. Yokoyama, T. Oshitari, et al., *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.*, **43**, 2401 – 2405 (2002).
27. R. Ren, *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.*, **53**, 1003 – 1011 (2012).
28. Y. Zhang, W. Wang, *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.*, **51**, 3742 – 3748 (2010).
29. T. Abe, T. Saito, H. Sato, et al., *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.*, **49**, 3631 – 3639 (2008).
30. J. M. Lawrence, *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.*, **45**, 267 – 274 (2004).
31. H. Y. Park, J. H. Kim, *Brain Res.*, **1469**, 10 – 23 (2012).
32. R. Alyautdin, I. Khalin, S. Ismail, *Int. J. Nanomed.*, **9**, 795 – 799 (2014).
33. К. Б. Курахмаева, Т. А. Воронина, И. Г. Капица и др., *Бюл. экпер. биол. и мед.*, **145**, 221 – 224 (2008).
34. H. F. Edelhauser, *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.*, **51**, 5403 – 5420 (2010).
35. Р. Н. Аляутдин, Й. Кройтер, Д. А. Харкевич, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **66**(2), 65 – 68 (2003).
36. I. Kaur, S. Kakkar, *J. Control. Rel.*, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.06.005 (2014).
37. T. Sakai, *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.*, **48**, 3381 – 3387 (2007).

Поступила 08.09.14

## PROSPECTS OF USING BDNF FOR THE TREATMENT OF OPTIC-NERVE NEUROPATHY (A REVIEW)

I. V. Khalin<sup>1</sup>, N. Z. Musina<sup>2</sup>, R. N. Alyautdin<sup>3</sup>, B. K. Romanov<sup>3</sup>, and N. D. Bunatyan<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Medicine, National Defense University of Malaysia, 57000 Kuala Lumpur, Malaysia

<sup>2</sup> Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia

<sup>3</sup> State Scientific Center for Drug Expertise and Control, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, 127051 Russia

Data on the use of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a promising agent capable of preventing the loss of retinal ganglion cells are summarized. Mechanisms of BDNF action and the possible pathways of this protein delivery to the retina are considered.

**Keywords:** BDNF; retinal ganglion cells; stem cells; nanoparticles