

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

DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-5-3-6
© Коллектив авторов, 2020

А. В. Таллерова, А. Г. Межлумян, П. Ю. Поварнина, Т. А. Антипова,
И. О. Логвинов, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин

ДИПЕПТИДНЫЙ МИМЕТИК МОЗГОВОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ГСБ-106 ПРЕДОТВРАЩАЕТ РАЗВИТИЕ АНГЕДОНИИ В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА

ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В. В. Закусова", Россия, 125315, Москва
* e-mail: tata-sosnovka@mail.ru

При моделировании острого социального стресса изучено влияние димерного дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора гексаметилендиамида бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина) (ГСБ-106, лекарственная форма) при пероральном 3-дневном введении в дозе 0,1 мг/кг на предпочтении 1 % раствора сахара и уровень белка постсинаптической плотности PSD-95 в префронтальной коре и гиппокампе мышей C57Bl/6. У стрессированных мышей статистически значимо снижалось потребление сладкого раствора и вдвое уменьшалось содержание PSD-95 в префронтальной коре по сравнению с контрольными животными. В гиппокампе изменений содержания PSD-95 у стрессированных животных не выявлено. Введение ГСБ-106 в дозе 0,1 мг/кг перорально в течение 3 дней однократно после каждой сессии стресса полностью предотвращало развитие ангедонии по показателям потребления раствора сахара. Влияния ГСБ-106 на сниженное содержание PSD-95 в префронтальной коре стрессированных животных в период эксперимента не выявлено.

Ключевые слова: BDNF; дипептидный миметик ГСБ-106; ангедония; белок постсинаптической плотности PSD-95; острый социальный стресс.

В НИИ фармакологии имени В. В. Закусова в качестве перспективного антидепрессанта разрабатывается миметик 4-й петли мозгового нейротрофического фактора (BDNF) ГСБ-106, представляющий собой замещенный димерный дипептид, гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина) [1]. Ранее показано, что ГСБ-106 активирует TrkB рецепторы и сопряженные сигнальные пути MAPK/ERK и PI3K/AKT [2, 3].

В экспериментах на мышах установлена способность ГСБ-106 стимулировать гиппокампальный синапто- и нейрогенез [3, 4].

ГСБ-106 проявлял антидепрессивную активность в ряде тестов на грызунах при внутрибрюшинном (0,1 – 1,0 мг/кг) и пероральном (0,5 – 5,0 мг/кг) введении [5, 6]. В созданной таблетированной лекарственной форме (ЛФ) антидепрессивная активность ГСБ-106 зарегистрирована в дозах 0,05 – 1,0 мг/кг [7, 8].

Из литературы известно, что при остром стрессе сокращаются размеры апикальных дендритов, снижается синтез синаптических белков и количество дендритных шипиков во фронтальной коре [9 – 12]. Подобные изменения рассматриваются в качестве предрасполагающего фактора депрессивного состояния, что соответствует нейропластической теории развития психических заболеваний [9]. В экспериментальных исследованиях также установлено, что у мышей на

модели острого социального стресса снижение плотности мембранных белков/рецепторов во фронтальной коре ассоциировано с развитием симптомов депрессивного состояния, в частности, ангедонии [12]. Исходя из этих данных, можно полагать, что стимулирующее влияние ГСБ-106 на гиппокампальный синаптогенез приводит к защите от развития депрессивно-подобного состояния при остром стрессе.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния ГСБ-106 на экспериментальные показатели ангедонии и на содержание белка постсинаптической плотности PSD-95 в префронтальной коре и гиппокампе у мышей-самцов C57Bl/6 на модели острого (3-дневного) социального стресса. В качестве препарата сравнения использовали трициклический антидепрессант amitриптилин, стимулирующий фосфорилирование TrkB рецепторы [13, 14].

Экспериментальная часть

ЛФ ГСБ-106 (таблетки). Фармацевтическая субстанция ГСБ-106 синтезирована в отделе химии лекарственных средств НИИ имени В. В. Закусова как описано ранее [1]. ЛФ ГСБ-106 для перорального применения разработана и произведена в опытно-технологическом отделе НИИ фармакологии имени В. В. Закусова и содержала 1 % ФС ГСБ-106 и 99 % наполнителя,

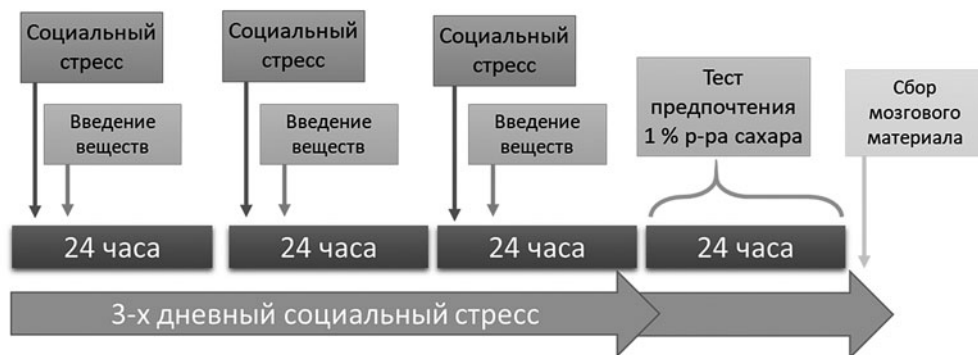


Схема эксперимента.

состоящего из лактозы, микрокристаллической целлюлозы, сополимера полиэтиленгликоля-поливинилового спирта и стеарата магния [6, 7].

Эксперименты выполнены на мышах-самцах линии C57Bl/6 массой 18 – 20 г, полученных из Центрального питомника лабораторных животных “Столбовая” (Московская обл.). Животных содержали в условиях вивария при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному гранулированному корму и воде. При работе соблюдали требования, сформулированные в Приказе Минздрава РФ от 01.04.2016 № 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики” и в Решении Совета ЕЭК № 81 “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического Союза в сфере обращения лекарственных средств”. Все манипуляции с животными были одобрены биоэтической комиссией ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова”.

Моделирование остро́го социального стресса у самцов-мышей линии C57Bl/6 осуществляли согласно международным протоколам [12]. Для формирования стрессового состояния мышей-самцов попарно содержали в экспериментальных клетках размером 28 × 14 × 10 см, разделенных прозрачной перегородкой с отверстиями, по одной особи на отсек. Ежедневно в течение 10 мин поднимали прозрачную перегородку для непосредственного контакта животных. В случае чрезмерно агрессивных атак со стороны агрессора (продолжающиеся укусы даже после того, как мышь-жертва продемонстрировала позу покорности) взаимодействие прекращали до истечения 10 мин. Процедуру стрессирования проводили ежедневно в течение 3 дней, что, согласно литературным данным, вызывает развитие остро́го стрессового состояния у животных [12].

Дизайн эксперимента. Были сформированы 4 группы, в каждой не менее 8 животных: “контроль (без стресса) + плацебо”, “стресс 3 дня + плацебо”, “стресс 3 дня + ЛФ ГСБ-106” и “стресс 3 дня + amitriptilin”. Контрольным животным без стресса и животным в группе “стресс 3 дня + плацебо” вводили перорально наполнитель ЛФ, суспензированный в 1 % растворе крахмала (плацебо), ежедневно однократно в

течение 3 дней после предоставления стресса. ЛФ ГСБ-106 (таблетки) суспензировали в 1 % растворе крахмала и вводили мышам перорально в дозе 0,1 мг/кг ежедневно однократно в течение 3 дней после предоставления стресса. Amitriptilin вводили в дозе 10 мг/кг в инъекционной форме внутривентрикулярно ежедневно в течение 3 дней после предоставления стресса. Дозу ГСБ-106 выбрали на основании данных экспериментов, проведенных ранее [7, 8], дозу amitriptilina — на основании литературных данных [15]. Мышей рассаживали индивидуально и проводили 2-бутылочный тест предпочтения 1 % раствора сахара. На 4-й день эксперимента оценивали влияние 3-дневного социального стресса и ЛФ ГСБ-106 на показатели потребления 1 % раствора сахара. В этот же день мышам декапитировали, выделяли фронтальную кору и гиппокамп для определения содержания постсинаптического белка PSD-95. Схема эксперимента представлена на рисунке.

Тест предпочтения раствора сахара (ангедония). Мышам, рассаженым индивидуально, предоставлялся в течение 1 сут свободный доступ одновременно к 2 бутылкам, одна из которых содержала 1 % раствор сахара, а другая — обычную воду. Потребление воды и раствора сахара оценивали при взвешивании бутылок. Уменьшение параметра предпочтения раствора сахара ниже показателя контрольной группы расценивали как развитие стресс-индуцированной ангедонии [16].

Предпочтение раствора сахара вычисляли по формуле:

$$\text{Предпочтение} = \frac{M_{\text{потребленного о раствора сахара}}}{M_{\text{потребленного о раствора сахара}} + M_{\text{потребленной воды}}} \cdot 100 \%,$$

где M — масса.

Оценка содержания белка постсинаптической плотности PSD-95 во фронтальной коре и гиппокампе мышей. Содержание PSD-95 оценивали методом Вестерн-блот анализа. Размороженные образцы тканей гомогенизировали при температуре 4 °C в стеклянном гомогенизаторе с лизирующим буфером (50 мМ трис-HCl, 5 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитола, 1 % Triton X-100, pH 7,5), содержащим коктейль ин-

гибиторов протеаз (пепстатин, бестатин, лейпептин и апротинин, “Sigma-Aldrich”, США), в соотношении ткань : буфер = 1 : 10 (вес/объем). Инкубировали в течение 20 мин при 4 °С и центрифугировали 20 мин при 15000 об./мин (центрифуга Allegra® X-12R “Beckman Coulter Inc.”, США) при той же температуре. Концентрацию белка в супернатанте определяли методом Фолина — Лоури. Белки супернатанта разделяли в 12 % полиакриламидном геле и далее переносили на мембрану из поливинилденфторида электролюцией. Мембраны дезактивировали 5 % (вес/объем) обезжиренным молоком в *tris*-буфере, содержащим 1 % твина 20 (TBST), в течение 1 ч. Затем мембраны в течение 1,5 ч при 37 °С обрабатывали первичными моноклональными мышинными антителами против PSD-95 (“BD Biosciences”, Великобритания) в разведении 1:5000, избыток антител отмывали TBST с 0,5 % (вес/объем) обезжиренным молоком, и мембраны инкубировали 1 ч при 37 °С с козыми антителами против IgG кролика (“Santa Cruz Biotechnology”, США, 1:1000), конъюгированными с пероксидазой хрена. Детектирование белков осуществляли после отмывки от вторых антител в буфере TBST в реакции с реагентами-усилителями хемилюминесценции (ECL-реагенты, “Santa Cruz Biotechnology”) с использованием гель-документирующей системы Alliance Q9 (“UVITEC”, Великобритания). Денситометрию полученных изображений проводили с помощью программы GIMP2.

Межгрупповые различия оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим использованием метода LSD Фишера либо с помощью *U* теста Манна — Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Данные представляли в форме средних и стандартных ошибок среднего.

Результаты и их обсуждение

Развитие ангедонии — нарушения “системы вознаграждения” мозга — является ключевым симптомом выраженного стресса и депрессии как в международной классификации болезней десятого пересмотра (МКБ-10), так и в классификации психических расстройств Американской психиатрической ассоциации (DSM-IV). В экспериментальных условиях ангедония моделируется с использованием показателя снижения потребления сладких растворов у грызунов [12, 16].

В настоящем исследовании установлено, что у подвергнутых 3-дневному стрессу животных предпочтение раствора сахара достоверно снижено на 30 % ($p < 0,01$) по сравнению с контрольными животными. ГСБ-106 предотвращало снижение показателя ангедонии, потребление раствора сахара у животных, получавших препарат, не отличалось от уровня, наблюдаемого в контрольной группе (табл. 1). Амитриптилин в изученной дозе не оказывал влияния на предпочтение сладкого раствора мышами в условиях эксперимента.

Таблица 1
Влияние димерного дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 (таблетки) на потребление 1 % раствора сахара мышами-самцами C57Bl/6 при 3-дневном социальном стрессе

Группа	<i>n</i>	Продолжительность введения, дни	Предпочтение 1 % раствора сахара, %	Изменение предпочтения 1 % раствора сахара по сравнению с контролем, %
Контроль, 1 % раствор крахмала + плацебо	8	3	89,5 ± 7,3	
Стресс 3 дня, 1 % раствор крахмала + плацебо	8	3	62,9 ± 5,11*	30
Стресс 3 дня, 1 % раствор крахмала + ЛФ ГСБ-106 0,1 мг/кг	8	3	87,5 ± 6,14[#]	–
Стресс 3 дня, амитриптилин 10 мг/кг, внутривенно	8	3	67,1 ± 4,32*	25

* $p < 0,01$, статистическая значимость различий по сравнению с группой “контроль 1 % раствор крахмала + плацебо”.

[#] $p < 0,01$, статистическая значимость различий по сравнению с группой “стресс 3 дня 1 % раствор крахмала + плацебо”.

Сравнение с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA post hoc Fisher LSD test.

Таблица 2
Влияние ЛФ ГСБ-106 на содержание постсинаптического белка PSD-95 в префронтальной коре и гиппокампе мышей-самцов C57Bl/6 при 3-дневном социальном стрессе

Группа (<i>n</i> = 10)	<i>n</i>	Продолжительность введения, дни	Содержание PSD-95, о.д.е.	
			фронтальная кора	гиппокамп
Контроль, 1 % раствор крахмала	8	3	8,0 ± 2,0	6,0 ± 3,0
Стресс 3 дня, 1 % раствор крахмала	8	3	4,0 ± 1,0*	6,0 ± 1,0
Стресс 3 дня, 1 % раствор крахмала + ЛФ ГСБ-106 0,1 мг/кг	8	3	5,0 ± 2,0	5,0 ± 1,0
Стресс 3 дня, амитриптилин 10 мг/кг, внутривенно	8	3	6,0 ± 2,0	6,0 ± 2,0

* $p < 0,05$, статистическая значимость различий по сравнению с группой “контроль 1 % раствор крахмала + плацебо” по критерию Манна — Уитни.

Из литературы известно, что при моделировании стресса и депрессии у животных происходит выраженное снижение содержания синаптических белков в головном мозге [9, 11, 11, 17]. PSD-95 является ключевым каркасным белком постсинаптической части глутаматергических синапсов, и поэтому он рассматривается в качестве маркера синаптогенеза [9].

В настоящем исследовании установлено 2-кратное ($p < 0,05$) уменьшение содержания PSD-95 в префронтальной коре стрессированных животных по сравнению с контрольными (табл. 2). Эти данные соответствуют хорошо известному факту о развитии синаптической дисфункции при стрессе [9]. При этом нами не выявлены изменения содержания PSD-95 в гиппокампе мышей, что согласуется с литературными данными о том, что префронтальная кора является более чувствительной к острому стрессу [10], чем гиппокамп, патологические изменения в котором наблюдаются только при хроническом стрессе [9, 17].

Полученные результаты находятся в соответствии с литературными данными о том, что развитие ангедонии у мышей на модели острого социального стресса обусловлено снижением трансляции синаптических протеинов в префронтальной коре [12].

Введение ГСБ-106, как и амитриптилина, не оказывало достоверного влияния на сниженное содержание PSD-95 в префронтальной коре мышей при стрессе (табл. 2). По-видимому, 3-дневного периода недостаточно для восстановления нарушенного каркаса постсинаптических мембран.

Известно [18], что в условиях 10-дневного социального стресса кетамин и агонист TrkB 7,8-дигидроксифлавонол восстанавливали предпочтение сладкого после однократной дозы на 1 и 3 день, но содержание PSD-95 в префронтальной коре восстанавливалось только кетамином на 8 день после введения.

Таким образом, в настоящем исследовании установлено, что ГСБ-106 при трёхдневном однократном введении после каждой сессии стресса проявлял выраженный антиангедонический эффект у мышей, но при этом не восстанавливал в этот короткий период содержание белка постсинаптической плотности PSD-95 в префронтальной коре.

Работа выполнена в рамках государственного задания на 2019 – 2021 гг. по темам № 0521-2019-0003 “Изыскание фармакологических способов избирательной активации путей трансдукции сигнала тирозинкиназных нейротрофиновых рецепторов как основы для создания лекарственных средств, свободных от побочных эффектов нативных нейротрофинов” и № 0521-2019-0002 “Разработка новых средств и методов фармакотерапии тревожных расстройств и депрессивных состояний”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Гудашева, А. В. Тарасюк, С. В. Помогайбо, et al., *Био-орган. химия*, **38**(3), 280 – 290 (2012).
2. Т. А. Гудашева, И. О. Логвинов, Т. А. Антипова, С. Б. Середенин, *Докл. Академии Наук*, **451**(5), 577 – 580 (2013); doi: 10.7868/S0869565213240250
3. Т. А. Гудашева, П. Ю. Поварнина, С. Б. Середенин, *Бюл. эк-сперим. биол. и мед.*, **162**(10), 448 – 451 (2016).
4. Т. А. Gudasheva, P. Y. Povarnina, T. A. Antipova, S. B. Seredenin, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **481**(1), 225 – 227 (2018); doi:10.1134/S1607672918040130.
5. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Т. А. Гудашева и др., *Acta Naturae*, **5**, № 4(19), 116 – 120 (2013).
6. П. Ю. Поварнина, Т. Л. Гарибова, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин, *Acta Naturae*, **10**, 3(38), 81 – 84 (2018).
7. А. В. Таллерова, П. Ю. Поварнина, Е. В. Блынская и др., *Хим.-фарм. журн.*, **52**(5), 15 – 17 (2018).
8. Т. А. Gudasheva, P. Y. Povarnina, T. A. Tallerova, et al., *Int. J. Pharma Sci. Scientific Res.*, **4**(7), 74 – 79 (2018).
9. R. S. Duman, G. K. Aghajanian, G. Sanacora, et al., *Nature Med.*, **22**(3), 238 – 249 (2016).
10. E. Y. Yuena, W. Liua, I. N. Karatsoreos, et al., *PNAS*, **106**(33), 14075 – 14079 (2009).
11. R. S. Duman, *F1000Research*, **7**(659), 1 – 10 (2018).
12. S. Yashiro, K. Seki, *Stress*, **20**(4), 404 – 418 (2017).
13. T. Rantamäki, *Cell Tissue Res.*, **377**, 155 – 124 (2019).
14. T. Rantamäki, P. Hendolin, A. Kankaanpää, et al., *Neuropsychopharmacology*, **32**(10), 2152 – 2162 (2007).
15. F. C. Vilela, M. de M. Padilha, G. Alves-Da-Silva, et al., *J. Med. Food*, **13**(1), 219 – 222 (2010).
16. T. Strekalova, R. Spanagel, D. Bartsch, et al., *Neuropsychopharmacology*, **29**, 2007 – 2017 (2004).
17. L. Musazzi, P. Tornese, N. Sala, et al., *Frontiers in Pharmacol.*, **9**(758), 1 – 13 (2018).
18. J. C. Zhang, W. Yao, C. Dong, et al., *Psychopharmacology (Berl.)*, **232**(23), 4325 – 4335 (2015).

Поступила 09.09.19

DIPEPTIDE MIMETIC OF BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR GSB-106 PREVENTS ANHEDONIA DEVELOPMENT IN MICE UNDER CONDITIONS OF ACUTE SOCIAL DEFEAT STRESS

A. V. Tallerova, A. G. Mezhlumyan, P. Yu. Povarnina, T. A. Antipova, I. O. Logvinov, T. A. Gudasheva*, and S. B. Seredenin

V. V. Zakusov State Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia

* e-mail: tata-sosnovka@mail.ru

On acute 3-days social defeat stress model, the BDNF factor mimetic GSB-106 dosage form effects (0.1 mg/kg/1/3 days, i.p.) on 1% sucrose solution preference test and on prefrontal/hippocampal PSD-95 protein content were studied in C57Bl/6 mice. Control 3-days stressed mice showed significant decrease in sucrose solution preference test and two-fold reduction in the level of PSD-95 in prefrontal cortex. No change was detected in hippocampal PSD-95 content as compared to the control group. Three-day single 0.1 mg/kg i.p. GSB-106 administration after each stress session totally removed stress-induced anhedonia in sucrose solution preference test levels. There was no GSB-106 effect on the reduced prefrontal PSD-95 content in acute 3-days stressed mice.

Keywords: BDNF; dipeptide mimetic GSB-106; anhedonia; postsynaptic density protein PSD-95; acute social defeat stress.