

МЕЖЛУМЯН АРМЕН ГАРИКОВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИДЕПРЕССИВНЫХ СВОЙСТВ ДИПЕПТИДНЫХ
МИМЕТИКОВ НЕЙРОТРОФИНОВ NGF И BDNF**

3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательском институте фармакологии имени В.В. Закусова» (ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»)

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор, член-корр. РАН, руководитель отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»

**Гудашева Татьяна
Александровна**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории общей патологии нервной системы ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

**Крупина Наталия
Александровна**

доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, руководитель института персонализированной психиатрии и неврологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии им. В.М. Бехтерева» Минздрава России

**Насырова Регина
Фаритовна**

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « ____ » _____ 2022 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.183.01, созданного на базе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» по адресу: 125315, Россия, г. Москва, ул. Балтийская, д.8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ученой части ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» по адресу: 125315, Россия, г. Москва, ул. Балтийская, д.8 и на сайте www.academpharm.ru.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук,
профессор

**Вальдман Елена
Артуровна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Депрессия является одним из распространенных психических расстройств. По оценкам ВОЗ на 2021 год, от нее страдает порядка 280 млн. человек в мире. Депрессия вносит значительный вклад в глобальное бремя болезней, а ее тяжелые формы могут приводить к самоубийству (World Health Organization, official Website / Depression // 2021).

Современные моноаминергические антидепрессанты (ингибиторы моноаминоксидазы, трициклические антидепрессанты, селективные ингибиторы обратного захвата моноаминов) эффективны не более, чем в 60% случаев и требуют длительного (не менее 2 недель) применения для достижения эффекта (Frodl T. // *F1000Research*. 2017. Vol. 6, № 619, P. 2-7).

В последние годы в клиническую практику был введен быстродействующий антидепрессант S-кетамин с глутаматергическим механизмом действия в форме назального спрея. Однако, несмотря на выраженный антидепрессивный эффект, его применение ограничивается целым рядом побочных эффектов, а также невозможностью самостоятельного амбулаторного лечения (Jalloh M. // *Am. Fam. Physician*. 2020. Vol. 101, № 6. P. 339-340). Другой потенциальный глутаматергический антидепрессант, тетрапептид рапастинел, пока не получил однозначной оценки ввиду противоречивых результатов третьей фазы клинических исследований.

Экспериментальные и клинические данные последних 10 лет связывают развитие депрессивных расстройств с нарушениями процессов нейрональной и синаптической пластичности мозга, вызванными дефицитом нейротрофинов, таких как мозговой нейротрофический фактор (brain-derived neurotrophic factor) и, в меньшей степени, фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF) (Mondal A.C. et al. // *Int. J. Neurosci*. 2019. Vol. 129, № 3. P. 283–296). Снижение уровня BDNF и NGF в гиппокампе отмечено у жертв суицида, страдавших депрессией (Banerjee R. et al. // *Clin. Med. Insights Pathol*. 2013. P. 1–11). BDNF нокаут с помощью РНК-интерференции и лентивирусов у мышей приводит к формированию депрессивноподобного состояния с проявлениями ангедонии (Taliaz D. et al. // *Mol. Psychiatry*. 2010. Vol. 15. P. 80–92), а у мышей с однонуклеотидным полиморфизмом Val66Met отмечается депрессивноподобное и тревожное поведение, а также нарушение рабочей памяти (Yu H. et al. // *J. Neurosci*. 2012. Vol. 32, № 12. P. 4092–4101).

Описано влияние антидепрессантов на экспрессию и уровень нейротрофинов в гиппокампе, коре мозга и в сыворотке крови. Трехнедельное пероральное (п/о) введение атипичного антидепрессанта тианептина мышам линии BALB/c предотвращает снижение экспрессии NGF на фоне хронического стресса (*Alfonso J. et al. // Biol. Psychiatry. 2006. Vol. 59, № 3. P. 244–251*). Различные по механизму действия антидепрессанты, такие как ингибиторы обратного захвата серотонина флуоксетин, пароксетин и сертралин (*Coppell A.L. et al. // Neuropharmacology. 2003. Vol. 44, № 7. P. 903–910*), ингибитор моноаминоксидазы транилципромин (*Altar C.A. et al. // Biol. Psychiatry. 2003. Vol. 54, № 7. P. 703–709*) и трициклический антидепрессант имипрамин (*Van Hooymissen J.D. et al. // Brain Res. 2003. Vol. 974, № 1–2. P. 228–235*) вызывают увеличение экспрессии BDNF в гиппокампе. Селективный ингибитор обратного захвата норадреналина ребоксетин восстанавливает уровень BDNF и TrkB у крыс на модели депрессивноподобного состояния, вызванного хроническим непредсказуемым стрессом, увеличивая при этом фосфорилирование ERK в гиппокампе (*First M. et al. // J. Mol. Neurosci. 2013. Vol. 50, № 1. P. 88–97*).

Показано, что сами нейротрофины обладают антидепрессантоподобным эффектом. BDNF при однократном внутримозговом введении активен в тесте вынужденного плавания и на модели выученной беспомощности (*Shirayama Y. et al. // J. Neurosci. 2002. Vol. 22, № 8. P. 3251–3261*). Для NGF показана антидепрессантоподобная активность при хроническом подкожном введении в тесте вынужденного плавания (*Overstreet D.H. et al. // Pharmacol. Biochem. Behav. 2010. Vol. 94, № 4. P. 553–560*). Однако терапевтическое применение полноразмерных BDNF и NGF ограничивается их нестабильностью в биологических жидкостях и низкой способностью проникать через гематоэнцефалический барьер в связи с их белковой природой. Создание и изучение низкомолекулярных миметиков нейротрофинов является перспективным направлением в решении проблемы фармакокинетических ограничений нативных нейротрофинов.

Степень разработанности проблемы

На основании оригинальной гипотезы о том, что нейротрофины взаимодействуют со своими высокоаффинными тирозинкиназными рецепторами (Trk) наиболее экспонированными участками их петлеобразных структур, были сконструированы и синтезированы димерные дипептидные миметики β -изгибов отдельных петель NGF и BDNF (*Гудашева Т.А. и др. // Биоорг. Химия. 2012. Т. 38, № 3. С. 280–290; Гудашева Т.А. и др. // ДАН.*

2010. Т. 434, № 4. С. 549–552; Патент РФ №2410392, 2011; Патент США № 9683014 В2, 2017; Патент КНР №102365294 В, 2016; Патент ЕПВ ЕР 2397488, 2019; Патент Индии 296506, 2018).

Было показано *in vitro*, что дипептидные миметики NGF активируют TrkA, а миметики BDNF – TrkB и проявляют нейропротекторную активность *in vitro* в концентрациях 10^{-5} – 10^{-9} М (Гудашева Т.А. и др. // ДАН. 2010. Т. 434, № 4. С. 549–552; Гудашева Т.А. и др. // ДАН. 2015. Т. 460, № 3. С. 346–348; Гудашева Т.А. и др. // ДАН. 2017. № 1. С. 108–112; Середенин С.Б. и др. // Ж. Неврол. Психиатр. 2015. Т. 115, № 6. С. 63–70; Gudasheva T.A. et al. // J. Biomed. Sci. 2015. Vol. 22, № 1. P. 1–10). При этом *in vitro* исследования на культуре immortalized клеток гиппокампа мыши линии НТ-22 показали, что миметики разных петель имеют разные паттерны активации пострецепторных сигнальных путей. Миметик 4-й петли NGF ГК-2 активировал PI3/AKT (Середенин С.Б. и др. // Ж. Неврол. Психиатр. 2015. Т. 115, № 6. С. 63–70), а миметик 1-й петли ГК-6 – MAPK/ERK и PI3/AKT (Gudasheva T.A. et al. // J. Biomed. Sci. 2015. Vol. 22, № 1. P. 1–10). Миметик 4-й петли BDNF ГСБ-106 активировал MAPK/ERK и PI3/AKT пути, а миметики 1-й и 2-й петель BDNF ГСБ-214 и ГТС-201 активировали PI3/AKT и MAPK/ERK соответственно (Гудашева Т.А. и др. // ДАН. 2015. Т. 460, № 3. С. 346–348; Гудашева Т.А. и др. // ДАН. 2017. № 1. С. 108–112). Для всех миметиков показана активация PLC γ (Гудашева Т.А. и др. // ДАН. 2020. Т. 494, №1. С. 486–490).

Дипептидный миметик ГСБ-106 влиял на пластичность мозга, активируя нейрогенез и синаптогенез (Гудашева Т.А. и др. // Бюл. Эксп. Биол. Мед. 2016. Т. 162, № 10. С. 448–451; Гудашева Т.А. и др. // ДАН. 2018. Т. 481, № 6. С. 691–693).

Исследования антидепрессантоподобных свойств миметиков нейротрофинов ранее не проводились, за исключением предварительного эксперимента с ГСБ-106 (Середенин С.Б. и др. // Acta Naturae. 2013. Т. 5, № 4(19). С. 116-120)

Наличие нейропротекторной активности, способность действовать на нейротрофиновые Trk рецепторы и улучшать пластичность мозга определили перспективу исследования антидепрессантоподобной активности в ряду дипептидных миметиков нейротрофинов.

Цель исследования

Сравнительное изучение антидепрессантоподобных свойств дипептидных миметиков нейротрофинов NGF и BDNF и доказательство участия TrkB-зависимых сигнальных путей в механизме действия наиболее активного соединения.

Основные задачи исследования

Для достижения указанной цели решались следующие задачи:

1. Изучение антидепрессантоподобной активности дипептидных миметиков отдельных петель NGF и BDNF в тесте вынужденного плавания на мышах и выбор наиболее активного соединения.
2. Изучение антидепрессантоподобного действия отобранного соединения на модели 10-дневного социального стресса на мышах при однократном пероральном введении с оценкой влияния на синаптогенез в гиппокампе.
3. Изучение антидепрессантоподобного действия отобранного соединения на модели 28-дневного социального стресса на мышах при однократном пероральном введении.
4. Изучение антидепрессантоподобного действия отобранного соединения на модели 28-дневного социального стресса на мышах при хроническом пероральном введении с оценкой влияния на синаптогенез и нейрогенез в гиппокампе.
5. Изучение антидепрессантоподобного действия отобранного соединения на модели депрессивноподобного состояния, вызванного введением липополисахарида.
6. Изучение роли активации TrkB и пострецепторных каскадов PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC γ в механизме антидепрессантоподобной активности отобранного соединения с помощью фармакологического ингибиторного анализа.

Научная новизна

Впервые установлено, что при остром введении антидепрессантоподобной активностью обладает миметик BDNF ГСБ-106, активирующий *in vitro* основные Trk-ассоциированные пострецепторные сигнальные каскады. Антидепрессантоподобные свойства миметиков NGF были выявлены только при субхроническом введении. Показано, что при субхроническом внутрибрюшинном введении активность проявляют все миметики NGF и BDNF, в картине пострецепторного сигналинга *in vitro* которых наблюдали активацию PI3K/AKT.

Впервые установлено, что при однократном введении ГСБ-106 оказывает антидепрессантоподобный эффект на модели 10-дневного социального стресса, а в условиях 28-дневного социального стресса активность ГСБ-106 проявляется только при его хроническом введении и сопровождается увеличением уровней маркеров синапто- и нейрогенеза.

Впервые антидепрессантоподобные свойства ГСБ-106 были установлены на модели депрессивноподобного состояния, вызванного индуктором воспаления – липополисахаридом (ЛПС).

Впервые показано, что антидепрессантоподобные эффекты ГСБ-106 зависят от активации TrkB и пострецепторных каскадов PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC γ .

Научно-практическая значимость

Теоретическое и практическое значение имеют установленные антидепрессантоподобные свойства дипептидных миметиков отдельных петель нейротрофинов и их связь с активацией пострецепторных сигнальных путей. Эти данные в свете нейротрофиновой гипотезы позволят расширить имеющиеся сведения о патогенезе заболевания. Полученные в результате работы данные о механизме антидепрессивного действия миметиков нейротрофинов позволяют разработать принципиально новую стратегию фармакологической коррекции нарушений пластичности мозга, сопутствующих депрессивным расстройствам. Изучение активности миметиков на разных моделях депрессии на животных позволяет определять эффективность их воздействия на определенные звенья патогенеза заболевания, коррелирующие с таковыми у людей. Активные дипептидные миметики нейротрофинов могут послужить основой для разработки нового класса антидепрессантов с нейротрофинергическим механизмом действия.

Методология и методы исследования

Методологический подход включал изучение дипептидных миметиков нейротрофинов в тесте вынужденного плавания по Порсолту с отбором наиболее активного соединения для последующего детального изучения его антидепрессантоподобных свойств на двух принципиально различающихся моделях депрессивноподобного состояния – вызванного социальным стрессом разной продолжительности и индуцированного воспалением с помощью липополисахарида. Изучение механизма антидепрессантоподобного действия соединения-лидера проводилось с применением фармакологического ингибиторного анализа. Полученные в поведенческих тестах результаты подтверждались с

использованием иммунобиологических методов определения уровней белковых маркеров пластичности мозга.

Связь темы диссертации с научными планами института

Диссертация выполнена в рамках научно-исследовательской работы ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Тема 0521-2019-0002: «Разработка новых средств и методов фармакотерапии тревожных расстройств и депрессивных состояний» и тема 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».

Основные положения, выносимые на защиту

1. В тесте вынужденного плавания по Порсолту активностью при однократном внутрибрюшинном введении обладает миметик 4-й петли BDNF ГСБ-106, для которого *in vitro* показана активация всех трех основных TrkB-ассоциированных пострецепторных сигнальных путей, а при субхроническом введении активностью обладают миметики как BDNF, так и NGF, в картине активации сигналинга которых имеется PI3K/АКТ путь.
2. ГСБ-106 при однократном пероральном введении оказывает антидепрессантоподобное действие на модели 10-дневного социального стресса и не проявляет активность на модели 28-дневного стресса.
3. ГСБ-106 оказывает выраженное антидепрессантоподобное действие на модели 28-дневного социального стресса при хроническом пероральном введении, сопровождающееся восстановлением уровней маркеров синаптогенеза (синаптофизин) и нейрогенеза (BDNF, CREB и pCREB), сниженных в условиях стресса.
4. ГСБ-106 проявляет антидепрессантоподобные свойства на модели депрессивноподобного состояния, вызванного введением индуктора воспаления – липополисахарида.
5. В антидепрессантоподобное действие ГСБ-106 вносят вклад основные TrkB-ассоциированные пострецепторные каскады. Эффект ГСБ-106 не реализуется при блокаде как самого TrkB рецептора, так и связанных с ним сигнальных путей: PI3K/АКТ, MAPK/ERK или PLC γ .

Степень достоверности

Исследование выполнено на большом экспериментальном материале с использованием адекватных методов исследования. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием современных методов математической статистики.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на X Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Дагомыс, 2021) и II научной конференции молодых ученых «Актуальные исследования в фармакологии» (Москва, 2021).

Личный вклад автора

Автором лично проведен обзор и анализ литературы по теме диссертации, выполнены фармакологические эксперименты по выявлению антидепрессантоподобного эффекта как в поведенческих тестах, так и на моделях депрессивноподобного состояния. При участии автора выполнены иммунобиологические исследования. Автором лично проведена обработка полученных результатов, сформулированы выводы. При активном и непосредственном участии автора подготовлены публикации по результатам работы.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 статья в журнале, индексируемом в РИНЦ, 1 глава в коллективной монографии и 4 тезиса.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 144 страницах печатного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 34 отечественных и 204 зарубежных источников. Работа содержит 18 таблиц и 24 рисунка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные

Исследование проводили на самцах мышей линии BALB/c массой 20–22 г и самцах мышей линии C57BL/6 массой 18–20 г. Также в работе использовали аутбредных мышей

ICR (CD-1). Все животные получены из сертифицированных питомников РАН. В работе использовано 698 мышей.

Препараты и вещества

Оригинальные димерные дипептидные миметики отдельных петель **NGF**: гексаметилендиамид бис-(6-аминокапроил-*L*-глицил-*L*-лизина) (ГК-6), гексаметилендиамид бис-(*N*-сукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина) (ГК-2); и **BDNF**: гептаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-метионил-*L*-серина) (ГСБ-214), гексаметилендиамид бис-(*N*-гексаноил-*L*-серил-*L*-лизина) (ГТС-201), гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина) (ГСБ-106) были синтезированы в Отделе химии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Для перорального введения использовали лекарственную форму ГСБ-106, разработанную Опытно-технологическим отделом ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (Патент РФ № RU 2697254, 2019).

Использовался препарат сравнения амитриптилин (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия), физиологический раствор (ООО «Мосфарм», Россия); диметилсульфоксид (ООО ТД «Химмед», Россия); липополисахарид *E. coli* (Sigma-Aldrich, США).

Для целей фармакологического ингибиторного анализа у Sigma-Aldrich, США были приобретены и использовались блокатор TrkB рецептора **K252A** (в дозе 25,0 мг/кг в/б), ингибитор PI3K **LY294002** (в дозе 5,0 мг/кг, в/б), ингибитор MEK1/2 **PD98059** (в дозе 2,5 мг/кг, в/б), ингибитор PLC γ **U73122** (в дозе 30,0 мг/кг, в/б).

Для вестерн-блот анализа использовались первичные антитела к синаптофизину (BD Bioscience, США), CREB, pCREB, BDNF (Cell Signaling technology, США) и бета-актину (Abcam, США) и вторичные козы антитела против IgG кролика (Santa Cruz Biotechnology, США), конъюгированные с пероксидазой хрена.

Методы исследования

Поведенческие тесты

Изучение миметиков на антидепрессантоподобную активность проводили в тесте вынужденного плавания (Can A. et al. // *J. Vis. Exp.* 2012. № 58. P. 1–5). Миметики нейротрофинов вводили в/б однократно или субхронически (5 дней).

Развитие ангедонии определяли с использованием теста предпочтения сахарозы (Strekalova T. et al. // *Neuropsychopharmacology.* 2004. Vol. 29, № 11. P. 2007–2017).

Тест двигательной активности проводили с помощью инфракрасного актиметра (Panlab, Испания) согласно инструкции к прибору и программы ActiTrack.

Для определения уровней белков использовали метод вестерн-блот анализа (Mahmood T. et al // N. Am. J. Med. Sci. 2012. Vol. 4, № 9. P. 429–434).

Модели экспериментального депрессивноподобного состояния

Модель социального стресса была поставлена, как описано в (Zhang J.C. et al. // Psychopharmacology. 2015. Vol. 232, № 23. P. 4325–4335; Avgustinovich D.F. et al // Neurosci. Behav. Physiol. 2005. Vol. 35, № 9. P. 917–924) с небольшими модификациями.

В качестве агессоров использовали беспородных мышей-самцов в случае 10-дневного стресса и мышей-самцов C57BL/6 в случае 28-дневного стресса. Контрольные группы мышей не подвергались стрессу. На следующий день после стресса проводили тест двигательной активности, на основании которого отбирали мышей со сформированным депрессивноподобным поведением и рассаживали их в индивидуальные клетки. На следующий день после отбора животных вводили п/о однократно либо хронически на протяжении 21 дня (ежедневно, в одно и то же время) ГСБ-106 в дозе 0,1 мг/кг, amitриптилин в дозе 10,0 мг/кг или плацебо. Доза ГСБ-106 была выбрана на основании ранее проведенного исследования (Поварнина П.Ю. и др. // Acta Naturae 2018. Т. 3, № 38. С. 88–92). На следующий день после введения веществ проводили поведенческие тесты (тест на двигательную активность, тест на ангедонию).

После проведения поведенческих тестов мышей декапитировали, извлекали гиппокамп и определяли уровни синаптофизина, BDNF, CREB и pCREB в случае 28-дневного стресса с хроническим введением или только синаптофизина в случае 10-дневного стресса.

Моделирование ЛПС-индуцированного депрессивноподобного состояния выполнялось в соответствии с (O'Connor J.C. et al. // Mol. Psychiatry. 2009. Vol. 14, № 5. P. 511–522). Исследование проводилось на мышах-самцах C57Bl/6 массой 18-20 г. ЛПС суспендировали в физ. р-ре и вводили однократно в/б в дозе 0,5 мг/г. Контрольным животным однократно в/б вводили физ. р-р. Через 23 ч после введения ЛПС или физ. р-ра формировали 5 экспериментальных групп по 8-9 животных: контрольной группе и группе «ЛПС» вводили однократно п/о 1% р-р крахмала, трем другим группам однократно п/о вводили ГСБ-106 в исследуемых дозах (0,5, 1,0 или 5.0 мг/кг). Спустя 2 ч проводили тест

предпочтения 1% раствору сахарозы с целью установления проявлений ангедонии у мышей и через 24 ч оценивали уровень потребления воды и сладкого раствора.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительное исследование миметиков NGF и BDNF на антидепрессантоподобную активность

В серии опытов на мышцах-самцах линии BALB/c при однократном введении миметиков установлено, что среди исследуемых дипептидов время иммобильности достоверно снижал только миметик BDNF ГСБ-106 в дозах 0.1 мг/кг ($p = 0.0050$; однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, тест Даннета) и 1.0 мг/кг ($p = 0.0109$; однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, тест Даннета) на 23% и 20%, соответственно, что сопоставимо по выраженности с результатами для амитриптилина. Миметики ГК-2, ГК-6, ГСБ-214 и ГТС-201 были неактивны.

Полученные результаты по отсутствию активности у миметиков NGF могут быть объяснены низкой экспрессией TrkA в структурах, вовлеченных в патогенез депрессии. Так, в гиппокампе преимущественно экспрессируется TrkB, а в коре мозга TrkA практически отсутствует (Zhang H.T. et al. // *J. Histochem. Cytochem.* 2007. Vol. 55, № 1. P. 1–19). Это также согласуется с тем, что при однократном внутримозговом введении BDNF проявляет активность в тесте вынужденного плавания, в то время как NGF в этих условиях не активен (Shirayama Y. et al. // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22, № 8. P. 3251–3261).

Наличие антидепрессантоподобного эффекта в ряду миметиков BDNF при однократном введении только у ГСБ-106, по-видимому, связано с его способностью к одновременной активации как PI3K/АКТ, так и MAPK/ERK каскада. Известно, что одним из компонентов PI3K/АКТ каскада является mTOR, играющий важную роль в процессах синаптогенеза и синаптической пластичности, которые, в свою очередь, способствуют быстрому устранению симптомов депрессии (Sarbassov D.D. et al. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005. Vol. 17, № 6. P. 596–603). Одной из мишеней mTOR является эукариотический фактор инициации трансляции 4E, активация которого требует взаимодействия с MAP киназами (Aguilar-Valles A. et al. // *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9, № 1. P. 1–14). Ингибирование MAPK/ERK приводит к устранению эффекта BDNF при его однократном введении крысам (Shirayama Y. et al. // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22, № 8. P. 3251–3261), а ингибирование PI3K/АКТ предотвращает быстрые антидепрессивные эффекты кетамина (N. Li et al. //

Science. 2010. Vol. 329. P. 959–965). Таким образом, нами установлено, что антидепрессантоподобную активность при однократном введении проявляет миметик BDNF ГСБ-106, для которого *in vitro* показана активация как PI3K/АКТ, так и MAPK/ERK сигнальных путей.

Как видно из Таблицы 1, в условиях субхронического введения активностью обладают и миметики NGF. Из неактивных при однократном введении миметиков BDNF антидепрессантоподобное действие наблюдалось у ГСБ-214. Выраженность эффектов миметиков при этом была сопоставима с таковой для amitriptyline.

Таблица 1 Эффекты дипептидных миметиков NGF и BDNF при их субхроническом пятидневном в/б введении в тесте вынужденного плавания у мышей BALB/c

Группа	Доза, мг/кг в/б	Время иммобильности, с ¹	Время иммобильности, % от контрольной группы
Контроль ²	0	205.0 ± 9.1	100
ГСБ-106 ²	1,0	172.7 ± 11.4[#]	84.2
Контроль	0	242,6 ± 6,6	100
ГСБ-214	1,0	198,4 ± 8,1[*]	81,8
ГТС-201	1,0	218,0 ± 7,7	89,9
ГК-2	0,5	225,5 ± 10,5	93,0
	1,0	210,5 ± 4,4[*]	86,8
	5,0	239,3 ± 6,8	98,6
ГК-6	2,0	207,0 ± 11,0[*]	85,3
Амитриптилин	10,0	205,2 ± 8,4[*]	84,6

¹ – данные представлены в виде средних значений со стандартной ошибкой среднего

² – опубликованные результаты (Tallerova A. V. et al. // *Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 2020. № 4. P. 24–27).

* – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA (тест Даннета))

Таким образом, при субхроническом введении активны миметики и NGF, и BDNF, в картину пострецепторного сигналинга которых включена активация PI3K/АКТ каскада. Проявление активности миметиков NGF при субхроническом введении, по-видимому, объясняется их способностью, подобно нативному нейротрофину, стимулировать синтез BDNF (*Tirasa P. // Arch. Ital. Biol.* 2011. Vol. 149, № 2. P. 205–213) и согласуется с литературными данными о наличии антидепрессантоподобного эффекта самого NGF при субхроническом введении (*Overstreet D.H. et al. // Pharmacol. Biochem. Behav.* 2010. Vol.

94, № 4. P. 553–560). Антидепрессантоподобные эффекты у миметика 1-й петли BDNF ГСБ-214 объясняются вкладом активации PI3K/AKT в гиппокампальный нейрогенез за счет увеличения выживаемости постоянно образующихся там нейробластов (Koh S.H. et al. // *J. Clin. Neurol.* 2015. Vol. 11, № 4. P. 297–304). С этим согласуется тот факт, что миметик BDNF ГТС-201, не активирующий PI3K/AKT, активность не проявляет.

В связи с тем, что ГСБ-106 проявляет антидепрессантоподобную активность уже при однократном введении, он был выбран в качестве соединения-лидера.

Изучение антидепрессантоподобного действия соединения-лидера ГСБ-106 на моделях депрессивноподобного состояния

На модели 10-дневного социального стресса при однократном п/о введении

Установлено (совместно с с.н.с. к.б.н. Таллеровой А.В.), что в результате 10-дневного стресса у мышей сформировалась ангедония по уменьшению предпочтения сахара. ГСБ-106 и amitriptyline полностью ее устраняли, восстанавливая предпочтение сахарозы до уровня нестрессированного контроля ($p < 0,05$, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, тест Fisher LSD).

Кроме того, показано (совместно с заведующей лабораторией фармакологии нейропротекции к.б.н. Антиповой Т.А.), что ГСБ-106 вызывал статистически значимое увеличение содержания синаптофизина в гиппокампе нестрессированных животных (рисунки 1). У стрессированных животных содержание синаптофизина в гиппокампе было статистически значимо снижено примерно на 30% по сравнению с интактными. При введении стрессированному животному как ГСБ-106, так и amitriptyline наблюдалась выраженная тенденция к восстановлению уровня синаптофизина ($p = 0,08$; U-тест Манна-Уитни).

Таким образом, ГСБ-106 устранял проявления ангедонии у мышей со сформированным депрессивноподобным состоянием, вызванным 10-дневным социальным стрессом, а также имел тенденцию к восстановлению у них пониженного уровня синаптофизина в гиппокампе.

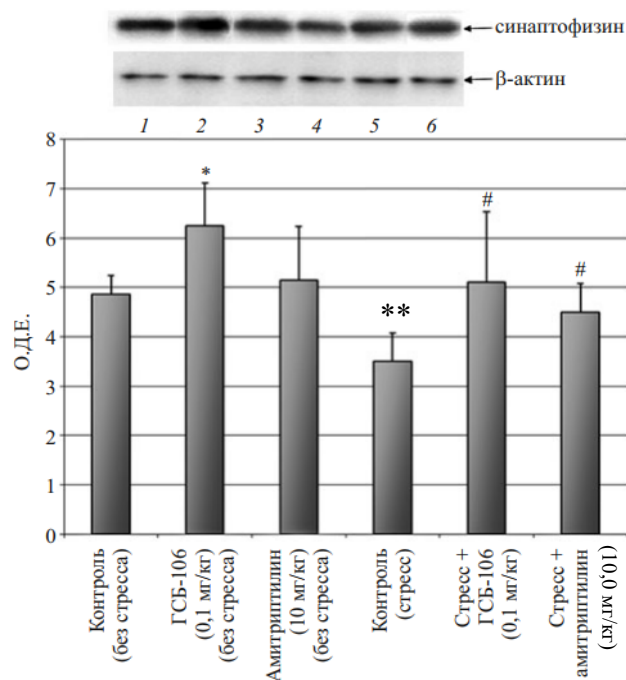


Рисунок 1. Содержание синаптофизина в гиппокампе мышей на 4 сут после введения ГСБ-106 или амитриптилина (данные вестерн-блот анализа)

Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок среднего.

Дорожки: 1 – «контроль без стресса», 2 – «ГСБ-106 без стресса», 3 – «амитриптилин без стресса», 4 – «контроль - стресс», 5 – «стресс + ГСБ-106», 6 – «стресс + амитриптилин».

О. Д. Е. – относительные денситометрические единицы.

* $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль без стресса» (U-критерий Манна-Уитни);

** $p < 0,01$ по сравнению с группой «контроль без стресса» (U-критерий Манна-Уитни);

$p = 0,08$ по сравнению с группой «контроль - стресс» (U-критерий Манна-Уитни).

На модели 28-дневного социального стресса при однократном п/о введении

Исследование, проведенное совместно с с.н.с. к.б.н. Таллеровой А.В., показало, что под влиянием 28-дневного стресса у мышей наблюдалось статистически значимое снижение двигательной активности и предпочтения 1% раствору сахарозы по сравнению с контрольной группой нестрессированных животных ($p < 0,05$; U-тест Манна-Уитни). Однократное введение ГСБ-106 не восстанавливало ни двигательную активность, ни предпочтение сахарозы у стрессированных животных.

На модели 28-дневного социального стресса при хроническом п/о введении

В результате исследования (совместно с с.н.с. к.б.н. Таллеровой А.В.) было установлено, что двигательная активность и предпочтение раствору сахарозы у мышей, подвергнутых 28-дневному социальному стрессу, статистически значимо снижена по сравнению с интактным контролем ($p < 0,05$; U-тест Манна-Уитни). Введение ГСБ-106 на протяжении 21 дня достоверно устраняло дефицит двигательной активности ($p < 0,05$; U-тест

Манна-Уитни) и восстанавливало потребление сладкого раствора до уровня нестрессированного контроля ($p < 0,05$; двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, Fisher LSD test).

Также установлено (совместно с заведующей лабораторией фармакологии нейропротекции к.б.н. Антиповой Т.А.), что под влиянием 28-дневного социального стресса снижаются уровни синаптофизина, BDNF, CREB и pCREB по сравнению с нестрессированными животными на 19,8%, 12,5%, 10,5% и 26,8%, соответственно. Из рисунка 2 видно, что хроническое введение ГСБ-106 статистически значимо восстанавливает уровни данных белков в гиппокампе.

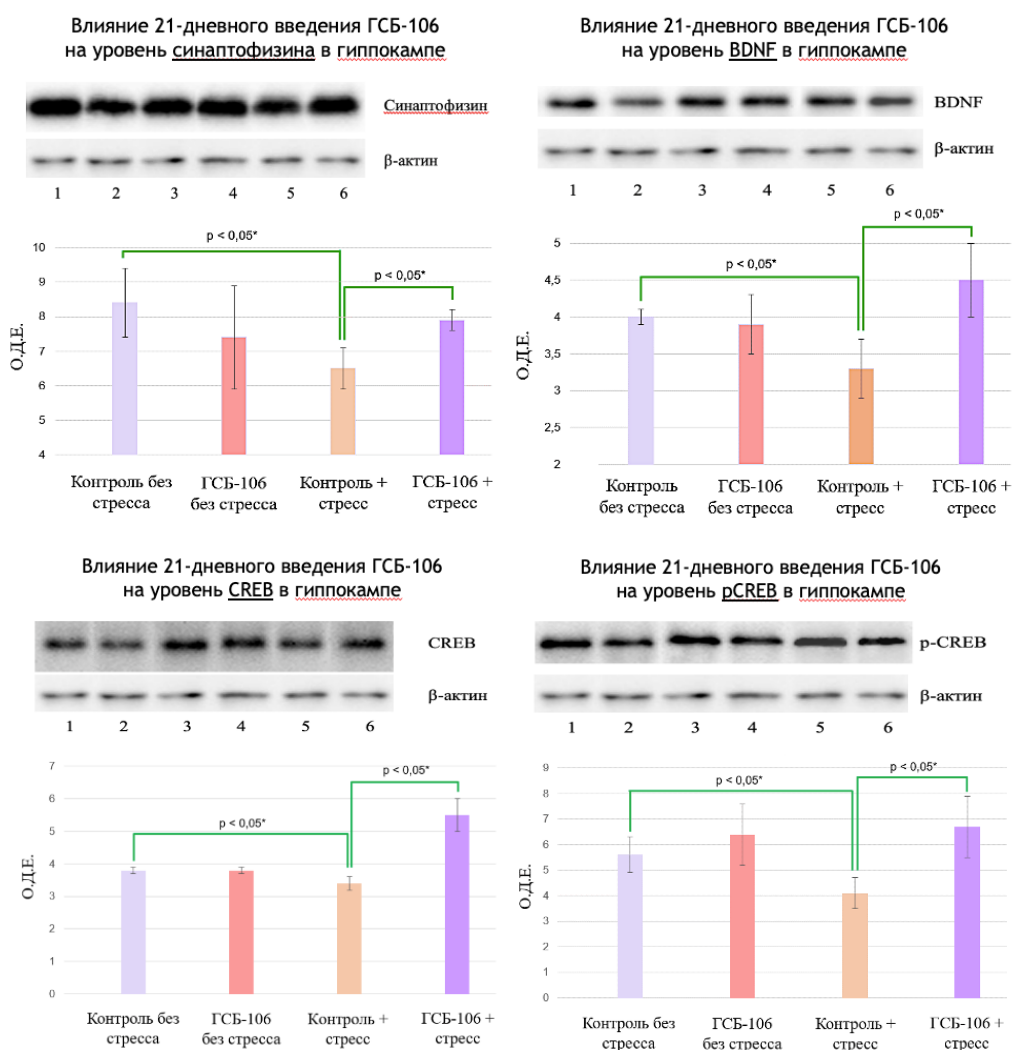


Рисунок 2. ГСБ-106 полностью восстанавливает сниженные уровни синаптофизина, BDNF, CREB и pCREB в гиппокампе мышей, подвергнутых 28-дневному социальному стрессу (данные вестерн-блот анализа)

Данные представлены в виде средних значений со стандартной ошибкой среднего

О. Д. Е. – относительные денситометрические единицы.

* $p < 0,05$ – статистическая значимость различий (U-тест Манна-Уитни)

Таким образом, на модели депрессивноподобного состояния, вызванного социальным стрессом, установлено, что антидепрессантоподобное действие ГСБ-106 проявляется при однократном введении в случае 10-дневного стресса и не проявляется в условиях 28-дневного стресса. Это может быть связано с тем, что 28-дневный социальный стресс формирует более устойчивую депрессивную патологию, для устранения которой однократного введения миметика недостаточно. При трехнедельном введении после 28-дневного социального стресса ГСБ-106 проявляет выраженный антидепрессантоподобный эффект, полностью снимая вызванную стрессом ангедонию и дефицит двигательной активности, а также восстанавливая уровни маркеров синапто- и нейрогенеза. Полученный результат согласуется с литературными данными, согласно которым антидепрессанты не проявляют эффекта на модели хронического социального стресса при однократном введении, но активны при хроническом введении (*Willner P. // Neuropsychobiology. 2005. Vol. 52, № 2. P. 90–110*). Кроме того, эффект ГСБ-106 может реализовываться по аналогии с полноразмерным нейротрофином за счет процессов нейрогенеза, для полного разворачивания которых требуется не менее трех недель (*Гудашева Т.А. и др. // ДАН. 2018. Т. 481, № 6. С. 691–693*).

На модели ЛПС-индуцированного депрессивноподобного состояния при однократном введении

Установлено (совместно с с.н.с. к.б.н. Таллеровой А.В.), что в результате введения ЛПС у мышей регистрировалось снижение потребления 1% раствора сахарозы на 43,4% по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$; t-критерий Стьюдента), что свидетельствует о развитии ангедонии и соответствует литературным данным (*O'Connor J.C. et al. // Mol. Psychiatry. 2009. Vol. 14, № 5. P. 511–522*). ГСБ-106 в дозе 0,5 мг/кг статистически значимо ($p \leq 0,05$; t-критерий Стьюдента) восстанавливал потребление сладкого раствора, сниженное на фоне введения ЛПС, на 38,8% по сравнению с группой, которой вводили только ЛПС. В дозах 1,0 и 5,0 мг/кг миметик не оказывал влияния на предпочтение сахарозы.

Изучение ГСБ-106 в дозах 0,5, 1,0 и 5,0 мг/кг показало, что миметик восстанавливает предпочтение сахарозы в дозе 0,5 мг/кг. Таким образом, антидепрессантоподобная активность ГСБ-106 подтверждена и в воспалительной модели депрессии.

Изучение вклада активации TrkB, PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC γ в антидепрессантоподобное действие ГСБ-106

Предполагаемый механизм антидепрессантоподобного действия дипептидного миметика BDNF ГСБ-106 базируется на полученных *in vitro* данных о его способности активировать TrkB и три основных пострецепторных сигнальных каскада: PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC γ .

Как видно из рисунка 3, блокада TrkB, а также ингибирование PI3K, или MEK1/2, или PLC γ предотвращало антидепрессантоподобное действие ГСБ-106: устранялись статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, фармакологический ингибиторный анализ показал, что антидепрессантоподобный эффект ГСБ-106 зависит как от активации TrkB, так и от активации всех трех ассоциированных с ним сигнальных путей. Данные результаты согласуются с экспериментами *in vitro* и свидетельствуют в пользу полной вовлеченности TrkB сигналинга в действие ГСБ-106.

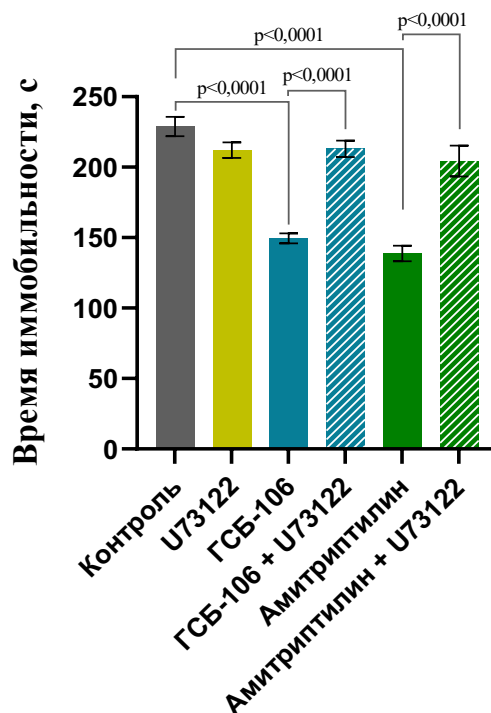
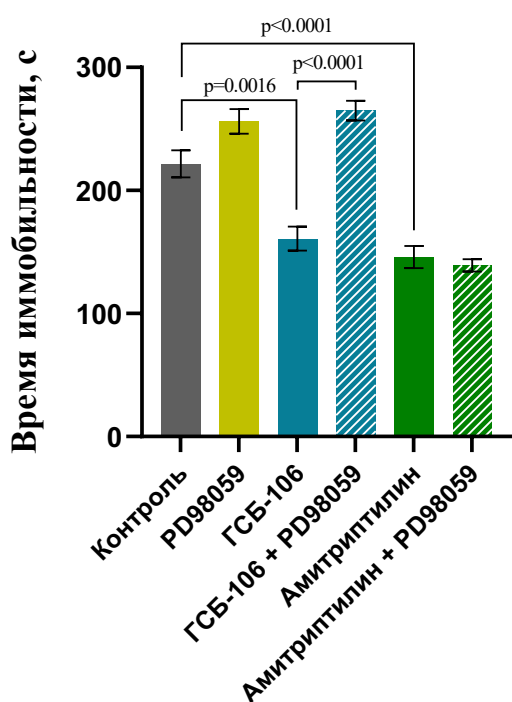
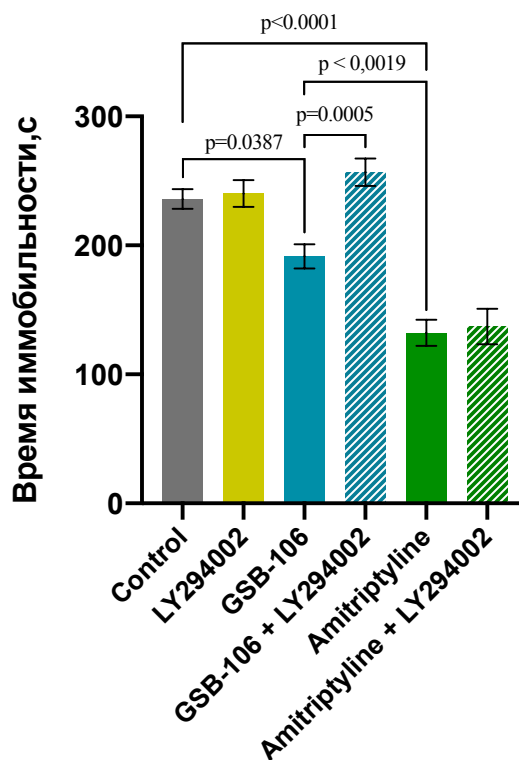
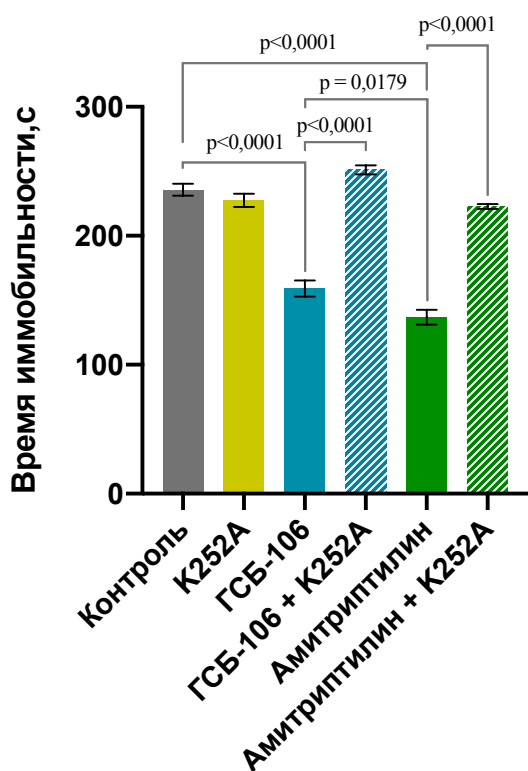


Рисунок 3. Блокатор TrkB (K252A; 25,0 мг/кг в/б) и ингибиторы PI3K (LY294002; 5,0 мг/кг, в/б), MEK1/2 (PD98059; 2,5 мг/кг, в/б), PLC (U73122; 30,0 мг/кг, в/б) предотвращают антидепрессантоподобный эффект ГСБ-106 (0,1 мг/кг в/б) в тесте вынужденного плавания

Величины представляют собой средние значения со стандартной ошибкой среднего
 Достоверность различий оценивалась с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA, тест Тьюки

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительное исследование дипептидных миметиков нейротрофинов NGF и BDNF выявило антидепрессантоподобную активность у миметика 4-й петли BDNF ГСБ-106 при однократном введении в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг. Статистически значимый эффект при субхроническом введении оказывали все исследованные дипептиды, за исключением миметика 2-й петли BDNF ГТС-201. В качестве соединения-лидера был выбран ГСБ-106, активный как при однократном, так и при субхроническом введении. Антидепрессантоподобная активность ГСБ-106 была подтверждена на двух принципиально разных моделях депрессивноподобного состояния – вызванной социальным стрессом и вызванной индуктором воспаления – липополисахаридом.

В случае 10-дневного стресса активность миметика проявлялась уже при однократном п/о введении в дозе 1,0 мг/кг, а при 28-дневном социальном стрессе потребовалось хроническое трехнедельное п/о введение миметика в той же дозе для устранения проявлений ангедонии и дефицита двигательной активности. В последнем случае эффект миметика сопровождался восстановлением уровней маркеров пластичности мозга (синаптофизина, CREB, pCREB и BDNF).

Методом фармакологического ингибиторного анализа было подтверждено, что механизм действия ГСБ-106 подобен BDNF и включает в себя активацию TrkB и трех основных пострецепторных сигнальных каскада PI3/АКТ, MAPK/ERK и PLC γ .

ВЫВОДЫ

1. В ряду димерных дипептидных миметиков отдельных петель NGF и BDNF антидепрессантоподобной активностью при однократном в/б введении обладает миметик 4-й петли BDNF ГСБ-106, активирующий *in vitro* все три основные ассоциированные с TrkB сигнальные пути: ГСБ-106 снижает время иммобильности в тесте вынужденного плавания в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг в/б сопоставимо с амитриптилином. При субхроническом введении антидепрессантоподобной активностью обладают все исследуемые дипептидные миметики, для которых *in vitro* показана активация PI3K/АКТ пути.
2. При однократном п/о введении в дозе 0,1 мг/кг ГСБ-106 в лекарственной форме обладает антидепрессантоподобной активностью в условиях 10-дневного социального стресса, устраняя проявления ангедонии у мышей.

3. В условиях 28-дневного социального стресса ГСБ-106 в лекарственной форме при однократном п/о введении в дозе 0,1 мг/кг не оказывает антидепрессивного эффекта на мышцах.
4. На модели 28-дневного социального стресса ГСБ-106 в лекарственной форме проявляет антидепрессантоподобное действие при хроническом (0,1 мг/кг 21 день) п/о введении: устраняет проявления ангедонии, восстанавливает двигательную активность мышей, а также восстанавливает сниженные на фоне стресса уровни синаптофизина, BDNF, CREB и pCREB.
5. На модели депрессивноподобного состояния, вызванного введением липополисахарида ГСБ-106 оказывает антидепрессивное действие при однократном п/о введении в дозе 0,5 мг/кг, устраняя проявления ангедонии у мышей.
6. Антидепрессантоподобный эффект ГСБ-106 зависит от активации TrkB рецептора и трех основных ассоциированных с ним сигнальных каскада PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC γ : при блокаде рецептора и ингибировании соответствующих киназ эффект ГСБ-106 в тесте вынужденного плавания предотвращается.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты выполненных исследований позволяют сделать заключение о целесообразности дальнейшего изучения соединения-лидера – миметика 4-й петли BDNF ГСБ-106 в качестве потенциального антидепрессанта принципиально нового механизма действия. Соединение имеет перспективу дальнейшего исследования и разработки в качестве лекарственного препарата для лечения депрессивных расстройств, биполярного аффективного расстройства и других заболеваний, сопровождающихся депрессивной симптоматикой.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Статьи в рецензируемых научных изданиях

1. Поварнина, П. Ю. Антидепрессивная активность димерного дипептидного миметика BDNF ГСБ-106 при однократном пероральном введении на модели социального стресса у мышей [Текст] / П.Ю. Поварнина, А.В. Таллерова, **А.Г. Межлумян**, С.В. Круглов, Т.А. Антипова, Т.А. Гудашева, С.Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. – Т. 83, № 4. – С. 3-7.
2. Сазонова, Н.М. Синтез фармакологически активного аналога дипептидного миметика BDNF ГСБ-106 [Текст] / Н.М. Сазонова, А.В. Тарасюк, С.В. Никитин, И.О. Логвинов, **А.Г. Межлумян**, О.Н. Воронцова, П.Ю. Поварнина, Т.А. Антипова, Т.А. Гудашева, С.Б. Середенин // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2019. – Т. 22, № 7. – С. 3-9
3. Таллерова, А.В. Дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 предотвращает развитие ангедонии в условиях острого социального стресса [Текст] / А.В. Таллерова, **А.Г. Межлумян**, П.Ю. Поварнина, Т.А. Антипова, И.О. Логвинов, Т.А. Гудашева, С.Б. Середенин // Химико-фармацевтический журнал. – 2020. – Т. 54, № 5. – С. 3-6.
4. Таллерова, А.В. Эффекты оригинальных соединений ГСБ-106, ГМЛ-3 и ГЗК-111 на экспериментальной модели ангедонии, индуцированной липополисахаридом [Текст] / А.В. Таллерова, **А.Г. Межлумян**, М.А. Яркова, Т.А. Гудашева, С.Б. Середенин // Химико-фармацевтический журнал. – 2021. – Т. 55, № 22. – С. 3-7
5. Gudasheva T. Low-Molecular Weight BDNF Mimetic, Dimeric Dipeptide GSB-106, Reverses Depressive Symptoms in Mouse Chronic Social Defeat Stress [Text] / T. Gudasheva, A. Tallerova, **A. Mezhlumyan**, T. Antipova, I. Logvinov, Y. Firsova, P. Povarnina, S. Seredenin // Biomolecules. – 2021. – V. 11, № 2. – P. 252.

Статья в журнале, индексируемом в РИНЦ

Межлумян, А.Г. Скрининговое изучение эффектов миметиков фактора роста нервов и мозгового нейротрофического фактора на экспериментальной модели депрессии [Текст] / **А.Г. Межлумян**, А.В. Таллерова, П.Ю. Поварнина, Н.М. Сазонова, А.В. Тарасюк, Т.А. Гудашева // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2020. – № 1. – С. 11-17.

Глава в коллективной монографии

Povarnina, P. The BDNF Loop 4 Dipeptide Mimetic Bis(N-monosuccinyl-L-seryl-L-lysine) hexamethylenediamide Is Active in a Depression Model in Mice after Acute Oral Administration [Text] / P. Povarnina, Y. Firsova, A. Tallerova, **A. Mezhlumyan**, S. Kruglov, T. Antipova, T. Gudasheva, S. Seredenin // Antidepressants - Preclinical, Clinical and Translational Aspects, Olivier Berend, IntechOpen. – 2019.

Тезисы

1. **Межлумян, А.Г.** Изучение антидепрессант-подобных свойств дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора в тесте вынужденного плавания на мышах [Текст] / **А.Г. Межлумян**, А.В. Таллерова, А.В. Тарасюк // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. Материалы II научной конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные исследования в фармакологии». – 2021. – С. 248-249.
2. **Межлумян А.Г.** Оценка вклада активации TrkB рецептора и ассоциированных с ним сигнальных путей в антидепрессант-подобное действие дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 [Текст] / **А.Г. Межлумян**, А.В. Тарасюк, Н.М. Сазонова, Т.А. Гудашева // Сборник тезисов III Объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (X Российского Симпозиума «Белки и пептиды»). – 2021. – С. 80.
3. **Межлумян А.Г.** Скрининговое исследование антидепрессивных эффектов дипептидных миметиков NGF и BDNF [Текст] / **А.Г. Межлумян**, А.В. Таллерова, Н.М. Сазонова, Т.А. Гудашева // Сборник тезисов III Объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (X Российского Симпозиума «Белки и пептиды»). – 2021. – С. 79.
4. Таллерова, А.В. Антидепрессант-подобная активность соединений ГСБ-106, ГМЛ-3 и ГЗК-111 в модели липополисахарид-индуцированного депрессивного состояния [Текст] / А.В. Таллерова, **А.Г. Межлумян** // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. Материалы II научной конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные исследования в фармакологии». – 2021. – С. 170-172.

Список сокращений и условных обозначений

AKT	threonine-protein kinase	PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	PLC γ	phospholipase C gamma
CREB	cAMP response element-binding protein	TrkA и TrkB	tropomyosin-related kinases A and B
ERK	extracellular signal-regulated kinase	В/б	внутрибрюшинно
MAPK	mitogen-activated protein kinase	ДМСО	диметилсульфоксид
NGF	nerve growth factor	ЛПС	липополисахарид, бактериальный эндотоксин
pCREB	phosphoCREB	Физ. р-р	физиологический раствор (0,9% хлорид натрия)