

НОВЫЙ ДИПЕПТИДНЫЙ ЛИГАНД TSPO

О. А. Деева, А. С. Панталеев, И. В. Рыбина, М. А. Яркова,

член-корреспондент РАН Т. А. Гудашева*, академик РАН С. Б. Середенин

Поступило 18.07.2018 г.

На основе полученного нами ранее первого дипептидного лиганда TSPO, амида N-карбобензоксид-триптофанил-L-изолейцина (ГД-23), синтезировали новый дипептид — амид N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина (ГД-102). У ГД-102 обнаружили анксиолитическую активность в тесте открытого поля на мышах BALB/c и в тесте приподнятого крестообразного лабиринта на мышах ICR. Минимальная действующая доза ГД-102 была на порядок ниже, чем таковая ГД-23. Селективный антагонист TSPO — соединение PK11195 — полностью блокировал анксиолитическую активность ГД-102, что свидетельствовало об участии TSPO в реализации анксиолитического действия ГД-102. Полученные результаты были подтверждены данными молекулярного докинга.

Ключевые слова: дипептид, ГД-102, лиганд TSPO, анксиолитическая активность.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524842228-232>

Транслокаторный белок (TSPO, 18 кДа), ранее известный как периферический бензодиазепиновый рецептор, участвует в транспорте холестерина от внешней к внутренней митохондриальной мембране, что является лимитирующей стадией синтеза нейростероидов [1]. Нейростероидные гормоны взаимодействуют с отличным от бензодиазепинового модуляторным сайтом рецептора ГАМК_A [2] и обладают анксиолитической активностью без побочных эффектов бензодиазепиновых транквилизаторов.

В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова с помощью оригинальной стратегии создания фармакологически активных дипептидов [3] на основе структуры алпидема был получен первый дипептидный лиганд TSPO — амид N-карбобензоксид-триптофанил-L-изолейцина (рабочее название ГД-23) [4]. Для дипептида ГД-23 было показано наличие анксиолитической активности в батарее валидированных фармакологических тестов у грызунов в интервале доз 0,1–1,0 мг/кг при системном введении. С помощью ингибиторного анализа с использованием селективного антагониста TSPO и двух блокаторов нейростероидогенеза были доказаны лигандные свойства ГД-23 [5].

С целью расширения группы дипептидных лигандов TSPO, перспективных быстродействующих анксиолитиков, нами были синтезированы аналоги ГД-23, в которых варьировались структуры

S-концевого и N-концевого замещения [6]. Было выявлено, что замена бензилоксикарбонильной группы на фенилалканоильную той же длины приводила к сохранению анксиолитической активности. В развитие этой работы в настоящем сообщении нами описан новый дипептидный лиганд TSPO, амид N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина (ГД-102), в котором по отношению к ГД-23 была проведена одновременная замена остатка изолейцина на остаток лейцина и бензилоксикарбонильной группы на фенилпропионильную.

Для подтверждения того, что ГД-102, как и ГД-23, алпидем и известный антагонист TSPO, соединение PK11195 (N-метил-N-(1-метил-пропил)амид 1-(2-хлорфенил)изохинолин-3-карбоновой кислоты), может быть лигандом TSPO, мы провели их сравнительное молекулярное докирование в TSPO. При этом использовали пространственную структуру рецептора TSPO в комплексе с лигандом PK11195, полученную при помощи ЯМР (PDB ID: 2MGY) [7]. Расчёты выполняли в режиме полужёсткого докинга с помощью программы Glide [8]. Для анализа выбрали комплексы с наименьшей расчётной энергией связывания (табл. 1).

Таблица 1. Рассчитанные значения минимальной энергии связывания лиганд–рецептор

Соединение, шифр	Glide score, ккал /моль
PK11195	–10,0
Алпидем	–10,3
ГД-23	–7,2
ГД-102	–8,2

Научно-исследовательский институт фармакологии
им. В.В. Закусова, Москва
*E-mail: tata-sosnovka@mail.ru

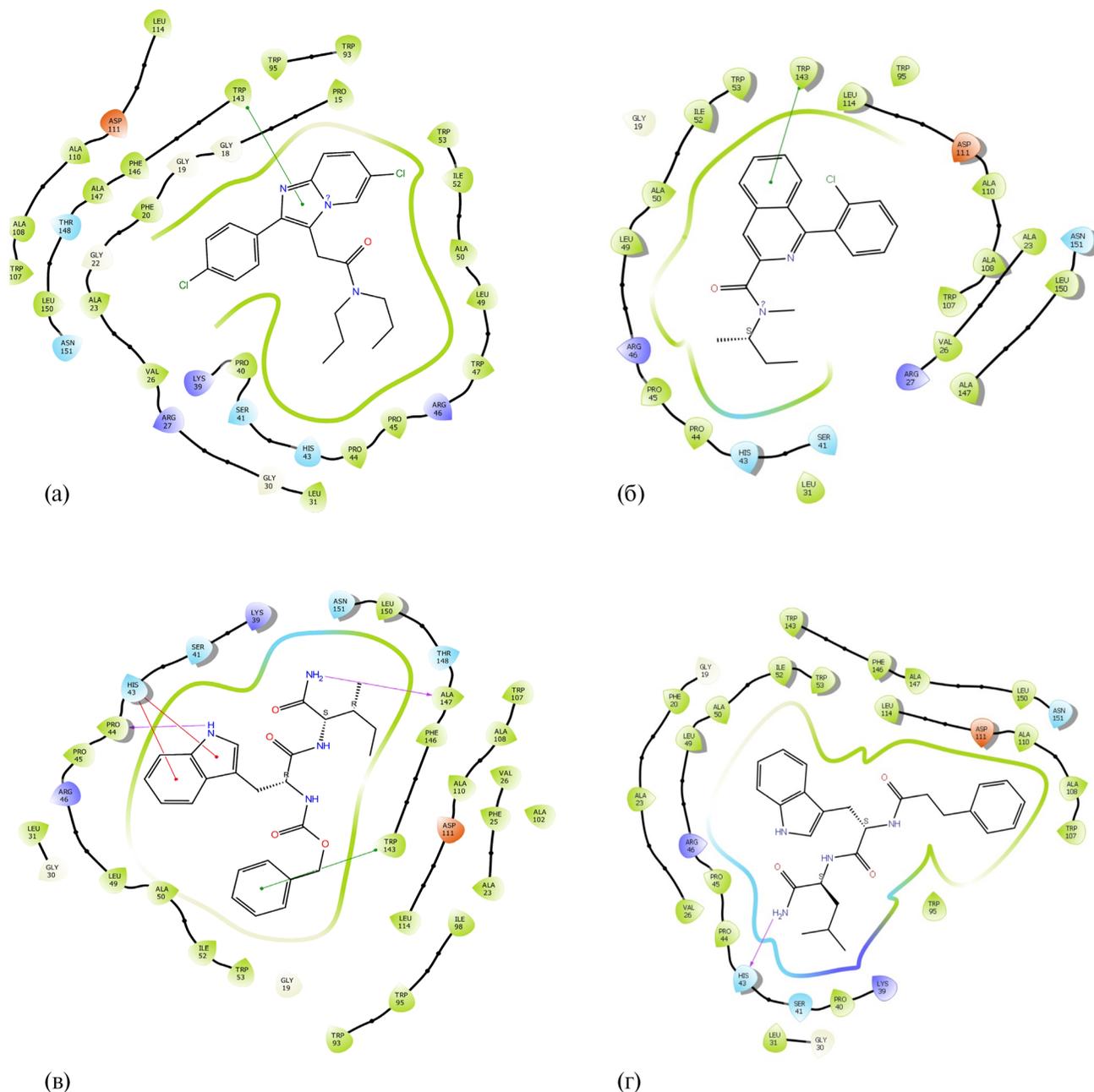


Рис. 1. Положение в зоне связывания рецептора TSPO. а – алпидем, б – РК11195, в – ГД-23, г – ГД-102.

По результатам докинга мы обнаружили, что арильный заместитель в ГД-102, как и в структурах алпидема, РК11195 и ГД-102, занимал гидрофобный карман, образованный Trp107, Ala108 и Ala110. Замещённая амидная группа в структуре РК11195 и С-концевая амидная группа в структуре ГД-102 образовывали водородную связь с His43, а ГД-23 – водородную связь с His43 с помощью индольного кольца. Ароматический гетероциклический фрагмент в структурах алпидема и РК11195 и арильный радикал в структуре

дипептида ГД-23 участвовали в π-π-стэкинге с Trp143. Пептид ГД-102 не формировал стэкинг, но вступал в гидрофобное взаимодействие с этим же остатком триптофана (рис. 1).

Таким образом, данные молекулярного докинга свидетельствовали о наличии лигандных свойств ГД-102 по отношению к TSPO.

Анксиолитическую активность дипептида ГД-102 изучали в стандартных фармакологических тестах открытого поля (ОП) со световой вспышкой с реакцией замирания на мышцах-сам-

цах BALB/cJLacSto и приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) на аутбредных мышах-самцах ICR (филиал питомника “Столбовая” ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Соединение вводили в виде суспензии с водным Твином-80 (две капли на 10 мл воды) однократно внутривнутрибрюшинно за 30 мин до начала эксперимента. Статистическую обработку фармакологических экспериментов проводили, используя однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием Краскала–Уоллиса и непараметрическое оценивание для независимых переменных (критерий *U* Вилкоксона–Манна–Уитни). Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Методика ОП со световой вспышкой основана на формировании стрессового ответа на перемещение из темноты на ярко освещённую арену, выражающегося для мышей линии BALB/c в реакции “замирания” (freezing). Увеличение общей двигательной активности в этом случае трактуется как проявление анксиолитического эффекта у испытуемого вещества, при этом общая двигательная активность оценивается как сумма периферической, центральной, вертикальной активностей и заходов в центр [9]. В тесте ОП со световой вспышкой установили, что соединение ГД-102 после внутривнутрибрюшинного введения в интервале доз 0,01–0,1 мг/кг вызывало статистически значимое увеличение общей двигательной активности мышей BALB/c по сравнению с контролем. В дозах 0,5; 1,0 и 5,0 мг/кг достоверного эффекта не зарегистрировали (рис. 2).

Таким образом, анксиолитическая активность ГД-102 при минимальной действующей дозе была на порядок выше, чем таковая ГД-23, что находится в согласии с данными, полученными методом молекулярного докинга более высокими энергиями связи с TSPO для ГД-102 (8,2 ккал/моль) по сравнению с ГД-23 (7,2 ккал/моль).

Наличие анксиолитической активности у ГД-102 мы подтвердили и в тесте ПКЛ, который считается наиболее адекватным для выявления анксиолитической активности, которая проявляется в увеличении времени пребывания животного в открытых рукавах и относительной частоты заходов в открытые рукава [10]. Относительное время

пребывания в открытых рукавах лабиринта в процентах рассчитывали по формуле $\frac{T_o}{T_o + T_3} \cdot 100$,

где T_o — время пребывания животных в открытых рукавах, T_3 — время пребывания в закрытых рукавах лабиринта. Относительное число заходов в открытые рукава лабиринта рассчитывали по формуле: относительное число заходов в открытые рукава

(проценты) = $\frac{N_o}{N_o + N_3} \cdot 100$, где N_o — число заходов животных в открытые рукава, N_3 — число заходов животных в закрытые рукава лабиринта.

При исследовании соединения ГД-102 после внутривнутрибрюшинного введения в диапазоне доз 0,1–0,5 мг/кг обнаружили достоверный анксиолитический эффект как по относительному времени пребывания в открытых рукавах, так и по относительному числу заходов в открытые рукава лабиринта (табл. 2).

Для доказательства участия рецептора TSPO в реализации анксиолитической активности соединения ГД-102 мы исследовали в тесте ПКЛ возможное влияние антагониста TSPO — РК11195. Ингибитор РК11195 в водном растворе Твина-80 вводили за 30 мин до введения ГД-102 в дозе 10,0 мг/кг, при которой анализатор не влиял ни на время нахождения животных в открытых рукавах, ни на частоту заходов в открытые рукава [11]. В каждом исследовании животные получали одинаковое количество инъекций. Контрольные животные получали воду

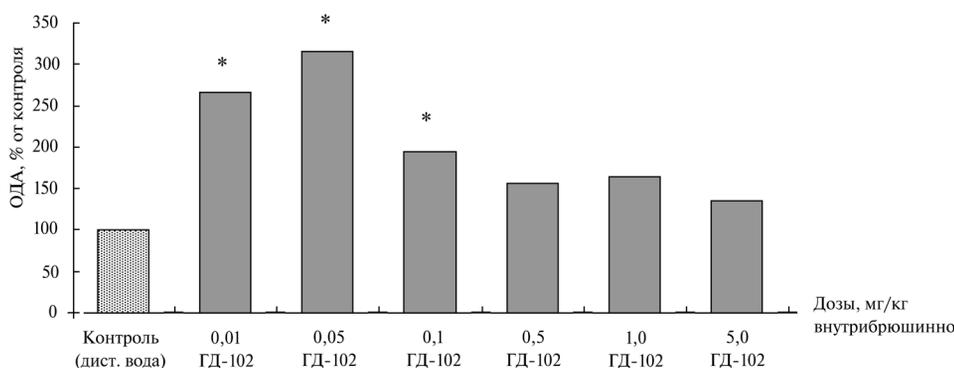


Рис. 2. Анксиолитическая активность ГД-102 у мышей BALB/c в тесте ОП со световой вспышкой. * $p < 0,05$ — при сравнении с контролем (критерий *U*).

Таблица 2. Влияние ГД-102 при однократном внутривенном введении на поведение мышей ICR в тесте ПКЛ

Доза, мг/кг	Время в открытых лаваках, с	Время в закрытых лаваках, с	Число заходов в открытые лавака	Число заходов в закрытые лавака	Время в открытых лаваках, %	Время в закрытых лаваках, %	Общее число заходов в лабиринта	Относительное время пребывания в открытых лаваках, %	Относительное число заходов в открытые лавака, %
Контроль	8,50 ± 14,08	259,25 ± 16,45	1,00 ± 1,31	8,63 ± 2,33	2,83 ± 4,69	86,42 ± 5,48	9,63 ± 2,50	3,12 ± 5,04	10,21 ± 15,18
0,1	58,75 ± 62,21*	206,38 ± 56,76*	2,50 ± 1,69	10,25 ± 2,82	19,58 ± 20,74*	68,79 ± 18,92*	12,75 ± 1,83*	21,69 ± 22,37*	20,39 ± 13,95
0,5	64,63 ± 47,73*	198,88 ± 39,97*	3,38 ± 2,83*	9,13 ± 1,36	21,54 ± 15,91*	66,29 ± 13,32*	12,50 ± 2,67*	24,04 ± 16,85*	24,50 ± 16,01*
1,0	44,00 ± 26,53*	214,38 ± 26,53*	3,13 ± 2,42	7,50 ± 1,93	14,67 ± 8,84*	71,46 ± 8,84*	10,63 ± 2,77	16,95 ± 10,27*	26,91 ± 18,39
<i>p</i> (ANOVA)	0,0106	0,0080	0,0947	0,1128	0,0106	0,0080	0,0728	0,0102	0,1050

Здесь и в табл. 3 данные представлены в виде $M \pm SD$, количество животных $n = 8$ для каждой группы, * $p < 0,05$ при сравнении с контролем (критерий U).

Таблица 3. Влияние специфического ингибитора TSPO (PK11195) на анксиолитический эффект соединения ГД-102

Вещество, доза	Время в открытых лаваках, с	Время в закрытых лаваках, с	Число заходов в открытые лавака	Число заходов в закрытые лавака	Время в открытых лаваках, %	Время в закрытых лаваках, %	Общее число заходов в лабиринта	Относительное время пребывания в открытых лаваках, %	Относительное число заходов в открытые лавака, %
Контроль	29,00 ± 5,35	226,88 ± 15,34	2,00 ± 0,76	8,25 ± 1,91	9,67 ± 1,78	75,63 ± 5,11	10,25 ± 1,75	11,38 ± 2,33	19,96 ± 8,91
PK11195, 10 мг/кг + вода	28,75 ± 23,91	225,75 ± 19,12	2,25 ± 1,91	9,75 ± 3,37	9,58 ± 7,97	75,25 ± 6,37	12,00 ± 3,85	11,05 ± 8,74	18,51 ± 11,98
ГД-102, 0,5 мг/кг + вода	114,13 ± 53,10*	139,13 ± 53,46*	5,50 ± 2,88*	6,88 ± 2,53	38,04 ± 17,70*	46,38 ± 17,82*	12,38 ± 3,38	45,09 ± 20,66*	43,72 ± 17,18*
PK11195, 10,0 мг/кг + ГД-102, 0,5 мг/кг	25,88 ± 13,14	234,38 ± 23,17	2,63 ± 1,41	9,75 ± 2,31	8,63 ± 4,38	78,13 ± 7,72	12,38 ± 2,72	9,99 ± 4,99	21,19 ± 9,29
<i>p</i> (ANOVA)	0,0140	0,0139	0,0308	0,1003	0,0140	0,0139	0,2600	0,0123	0,0155

Предварительное введение РК11195 полностью блокировало анксиолитический эффект ГД-102 (табл. 3). Показатели поведения животных этой группы оставались на уровне контроля и в то же время достоверно отличались от показателей группы, получавшей ГД-102. Эти результаты подтвердили лигандные свойства дипептида ГД-102 по отношению к TSPO.

Таким образом, на основании полученных результатов докинга, наличия анксиолитического эффекта и его блокирования с помощью антагониста РК11195 можно сделать вывод, что ГД-102 является лигандом TSPO.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований 17-04-00861, проект “Дизайн, синтез и изучение анксиолитической активности дипептидных лигандов рецептора TSPO как основа для создания нового класса быстродействующих анксиолитиков”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rupprecht R., Papadopoulos V., Rammes G., Baghai T.C., Fan J., Akula N., Groyer G., Adams D., Schumacher M.* // Nat. Rev. Drug Discovery. 2010. V. 9. P. 971–988.
2. *Hosie A.M., Wilkins M.E., Smart T.G.* // Pharmacol. Ther. 2007. V. 116. № 1. P. 7–19.
3. *Гудашева Т.А.* // Изв. РАН. Сер. хим. 2015. № 9. С. 2012–2021.
4. *Гудашева Т.А., Деева О.А., Мокров Г.В., Ярков С.А., Яркова М.А., Середенин С.Б.* // ДАН. 2015. Т. 464. № 3. С. 361–364.
5. *Гудашева Т.А., Деева О.А., Яркова М.А., Середенин С.Б.* // ДАН. 2016. Т. 469. № 5. С. 621–624.
6. *Середенин С.Б., Гудашева Т.А., Деева О.А., Мокров Г.В., Ярков С.А., Яркова М.А., Жердев В.П., Дурнев А.Д., Алексеев К.В., Незнамов Г.Г.* Замещенные дипептиды с нейрорепродуктивной активностью. Пат. РФ № 2573823. М., 2014.
7. *Jaremko L., Jaremko M., Giller K., Becker S., Zweckstetter M.* // Science. 2014. V. 343. P. 1363–1366.
8. Schrödinger Release 2015–4: Maestro. Vers. 10.4. N.Y.: Schrödinger, 2015.
9. *Середенин С.Б., Ведерников А.А.* // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1979. Т. 88. № 7. С. 38–40.
10. *File S. E.* // Behav. Brain Res. 2001. V. 125. P. 151–157.
11. *Atsuko Kita, Hitoshi Kohayakawa, Tomoko Kinoshita, Yoshiaki Ochi, Keiko Nakamichi, Satoshi Kurumiya, Kiyoshi Furukawa, Makoto Oka* // Brit. J. Pharmacol. 2004. V. 142. P. 1059–1072.

THE NOVEL DIPEPTIDE LIGAND OF TSPO

O. A. Deeva, A. S. Pantileev, I. V. Rybina, M. A. Yarkova,

Corresponding Member of the RAS T. A. Gudashева, Academician of the RAS S. B. Seredenin

Received July 18, 2018

Using the previously obtained first dipeptide ligand TSPO the N-carbobenzoxy-L-tryptophanyl-L-isoleucine amide (GD-23) as a basis, the new dipeptide was synthesized — the N-phenylpropionyl-L-tryptophanyl-L-leucine amide (GD-102). GD-102 expressed anxiolytic activity in the open field test in BALB/c mice and in the elevated plus maze test in ICR mice. The minimum effective dose of GD-102 was an order of magnitude lower than that of GD-23. Preliminary administration of the TSPO selective antagonist, compound PK11195, completely blocked the anxiolytic activity of GD-102, that indicated the participation of TSPO in the realization of the anxiolytic action GD-102. The results were confirmed by molecular docking data.

Keywords: dipeptide, GD-102, TSPO ligand, anxiolytic activity.