

УДК 577.112.6:615.214.31

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЕ СОЕДИНЕНИЕ ГСБ-106 ИМИТИРУЕТ КЛЕТОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ BDNF В УСЛОВИЯХ СЫВОРОТОЧНОЙ ДЕПРИВАЦИИ

Л. Ф. Зайнуллина, Т. А. Гудашева, Ю. В. Вахитова*,
академик РАН С. Б. Середенин

Поступило 27.08.2019 г.

На *in vitro* модели сывороточной депривации показано, что выживаемость нейрональных клеток SH-SY5Y обеспечивается собственной трофической активностью миметика β -изгиба четвертой петли BDNF ГСБ-106 (10^{-7} М), сопоставимой с таковой эндогенного нейротрофина (10^{-9} М). Анализ клеточного цикла и S-фазы показал, что ГСБ-106 подобно BDNF индуцирует остановку клеточного цикла в фазе G1, снижает количество клеток в S-фазе, уменьшает количество апоптотических клеток и не стимулирует пролиферацию.

Ключевые слова: димерный дипептидный миметик, сывороточная депривация, трофические свойства, клеточный цикл, апоптоз.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524895521-524>

Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) — представитель семейства нейротрофинов, регулирующий процессы выживания клеток, нейрональной дифференцировки, роста аксонов и дендритов, синаптической пластичности [1]. Эффекты BDNF реализуются посредством активации тирозинкиназного TrkB и неспецифического р75-рецепторов. Связывание зрелого BDNF с TrkB сопровождается димеризацией рецептора, изменением конформации, аутофосфорилированием остатков тирозина в тирозинкиназном домене и активацией связанных с рецептором MAPK/ERK-, PI3K/Akt-, PLC- γ 1-протеинкиназных путей передачи сигнала, обеспечивающих специфичность действия нейротрофина [2]. В многочисленных исследованиях установлено критическое значение дисрегуляции BDNF-зависимых систем для патогенеза нейродегенеративных, психических и неврологических заболеваний [3]. Благодаря участию BDNF в контроле разнообразных функций нейрональных, глиальных и других клеток патогенетически обоснованным представлялось использование нейротрофина в качестве средства заместительной терапии. Однако, несмотря на установленный в эксперименте высокий терапевтический потенциал, системное применение BDNF ограничивается его неудовлетворительными фармакокинетическими свойствами и нежелательными побочными эффектами [4]. Для создания ме-

тодов фармакотерапии на основе BDNF разрабатываются генно-инженерные подходы к продукции и регуляции локальной экспрессии нейротрофина в ЦНС, а также реализуются стратегии, направленные на конструирование и синтез низкомолекулярных пептидных и непептидных миметиков или фармакологических соединений, способных активировать TrkB-зависимый сигналинг [5].

На основе аминокислотной последовательности Asp⁹³–Ser⁹⁴–Lys⁹⁵–Lys⁹⁶ β -изгиба четвертой петли BDNF в нашем институте сконструирован димерный дипептидный миметик ГСБ-106 (гексаметилендиамид *бис*-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина); Патент РФ № 2410392, 2010). Установлена зависимость от ГСБ-106 активация TrkB рецептора и MAPK/ERK и PI3K/Akt сигнальных путей, способность повышать выживаемость нейрональных клеток в интервале концентраций 10^{-5} – 10^{-8} М [6], предотвращать нарушения нейрогенеза [7] и проявлять антидепрессивный эффект в диапазоне доз 0,1–1 мг/кг при пероральном введении грызунам [8, 9]. Совокупность ранее полученных данных свидетельствует о BDNF-подобных свойствах дипептида [10].

В предыдущих экспериментах культивирование клеток проводилось в стандартных условиях с добавлением в питательную среду эмбриональной сыворотки. В составе сывороток содержатся различные факторы роста (EFG, PDGF, FGF, NGF, IGF-1/2), обеспечивающие трофическую поддержку клеток [11]. В совокупности сывороточные компоненты могут маскировать собственные эффекты

Научно-исследовательский институт фармакологии
им. В.В. Закусова, Москва
*E-mail: juvv73@gmail.com

миметиков ростовых факторов. Поэтому для дальнейшего доказательства свойств ГСБ-106 как миметика BDNF в настоящей работе применяли модель сывороточной депривации, которая позволяет оценить эффекты низкомолекулярного аналога BDNF *in vitro* в условиях отсутствия трофических факторов.

Сравнительную оценку влияния BDNF и ГСБ-106 на выживаемость недифференцированных клеток нейробластомы SH-SY5Y при отсутствии сыворотки проводили МТТ-методом [12]. Как следует из данных, представленных в табл. 1, инкубация клеток с экзогенным BDNF в концентрации 10^{-9} М в течение 72 ч приводит к повышению жизнеспособности клеток в среднем на 40% по сравнению с контрольной группой. Действие ГСБ-106 на жизнеспособность клеток характеризуется колоколообразной зависимостью: в концентрации 10^{-7} М миметик поддерживал выживаемость на том же уровне, что и BDNF в концентрации 10^{-9} М. Клетки SH-SY5Y экспрессируют TrkB рецептор на невысоком уровне, однако не синтезируют BDNF или другие нейротрофины, что доказано анализом соответствующих мРНК, и подвергаются апоптозу при отсутствии трофических факторов и сыворотки [13]. Предполагается, что при инкубации нейрональных клеток в бессывороточной среде внесение BDNF обеспечивает нейропротекцию за счёт предотвращения апоптоза посредством активации PI3K/Akt сигнального пути [14]. В предыдущих работах установлено, что данный каскад активируется при действии ГСБ-106 [6].

Перспектива медицинского применения соединения, регулирующего тирозинкиназные рецепторы,

Таблица 1. Влияние ГСБ-106 и BDNF на жизнеспособность клеток SH-SY5Y в условиях сывороточной депривации

Экспериментальная группа	Жизнеспособность, % (МТТ-тест)
0% сыворотки	62,0 ± 1,3
BDNF, 10^{-9} М	100,00 ± 4,08
ГСБ-106:	
10^{-10} М	78,05 ± 3,30
10^{-9} М	85,4 ± 12,5
10^{-8} М	88,7 ± 9,4
10^{-7} М	104,0 ± 1,3
10^{-6} М	90,4 ± 8,2
10^{-5} М	75,5 ± 0,3
10^{-4} М	73,4 ± 2,9

Примечание. Здесь и далее: моделирование сывороточной депривации: клетки SH-SY5Y ($7 \cdot 10^4$ клеток в лунке) выращивали в полной среде культивирования до 90% конfluence. Далее проводили замену среды на бессывороточную, одновременно добавляли BDNF или ГСБ-106 в указанных концентрациях и инкубировали в течение 48 или 72 ч. Процент жизнеспособности клеток в группах “0% сыворотки” и “ГСБ-106” рассчитывали по отношению к группе “BDNF” (10^{-9} М), значения в которой принимали за 100%. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего. Сравнение экспериментальных групп проводили с использованием *t*-критерия Вилкоксона для зависимых выборок ($N = 2, n = 6$).

требуется исследования пролиферативной активности. При анализе влияния ГСБ-106 в широком диапазоне концентраций и BDNF в качестве положительного контроля (10^{-9} М) на прогрессию клеточного цикла клеток SH-SY5Y, культивируемых в условиях отсутствия сыворотки, было показано следующее (табл. 2).

В бессывороточной среде инкубация с BDNF в течение 48 ч приводит к повышению процента

Таблица 2. Влияние ГСБ-106 и BDNF на параметры клеточного цикла клеток SH-SY5Y в условиях сывороточной депривации

Воздействие/концентрация	% клеток			
	subG0	G1	S	G2/M
0% сыворотки, 48 ч	2,86 ± 0,5	47,78 ± 1,1	34,75 ± 2,5	16,42 ± 0,9
Сывороточная депривация, 48 ч				
BDNF, 10^{-9} М	0,81 ± 0,2*	54,16 ± 0,6	23,49 ± 1,1	21,54 ± 2,0
ГСБ-106:				
10^{-9} М	1,25 ± 0,02	58,91 ± 1,9	23,46 ± 1,5	16,37 ± 1,6
10^{-8} М	1,24 ± 0,6	50,93 ± 2,3	31,22 ± 2,1	16,6 ± 3,4
10^{-7} М	1,37 ± 0,5	47,76 ± 3,1	28,14 ± 2,3	22,73 ± 1,5
10^{-6} М	0,82 ± 0,01*	51,95 ± 2,0	25,6 ± 5,1	21,64 ± 1,3

Примечание. Анализ клеточного цикла осуществляли методом проточной цитофлуориметрии (“Novocyte® 2060”, “ACEA Bioscience Inc.”, США) после окрашивания клеток пропидиум йодидом (PI; “Invitrogen”, США). Определение процента клеток, соответствующих по количеству ДНК стадиям клеточного цикла, проводили с помощью программы “Novo-Express 1.2.5” (“ACEA Bioscience Inc.”, США). Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего. Сравнение экспериментальных групп проводили с использованием *t*-критерия Вилкоксона для зависимых выборок ($N = 2, n = 6$; * — $p < 0,05$ по отношению к группе “0% сыворотки”).

клеток в G₁-фазе до 54,16% по сравнению со значением в контрольной группе (“0% сыворотки”; 47,78%). При действии нейротрофина относительное содержание клеток в S-фазе уменьшается с 34,75 до 23,49%. Кроме того, на фоне BDNF отмечается снижение количества клеток в апоптозе почти в 3,5 раза по сравнению с контролем. ГСБ-106 в диапазоне концентраций 10⁻⁹–10⁻⁶ М при инкубации в бессывороточной среде в течение 48 ч вызывает увеличение процента клеток в фазе G₁, снижает количество клеток, находящихся в S-фазе, и способствует снижению содержания апоптотирующих клеток. Отметим, что ГСБ-106 в концентрации 10⁻⁹ М демонстрирует сопоставимую с BDNF активность в отношении влияния на параметры клеточного цикла: повышение количества клеток в фазе G₁ до 58,91%, снижение процента клеток в S-фазе до 23,46% и снижение уровня апоптотирующих клеток в 2,3 раза по сравнению с контрольной группой.

Анализ влияния BDNF (10⁻⁹ М) и ГСБ-106 (10⁻⁹–10⁻⁵ М) на инкорпорацию в ДНК модифицированного аналога нуклеотида EdU показал, что ни нейротрофин, ни его миметик (при инкубации в течение 48 ч) не стимулируют усиление включения нуклеотида в ДНК в течение S-фазы, что даёт основания для заключения об отсутствии у них способности усиливать пролиферацию клеток (табл. 3).

Таблица 3. Анализ S-фазы клеточного цикла клеток SY-SY5Y при действии ГСБ-106 и BDNF

Экспериментальная группа	S-фаза, % клеток
0% сыворотки	19,01 ± 0,64
BDNF 10 ⁻⁹ М	19,10 ± 1,21
ГСБ-106:	
10 ⁻⁹ М	24,56 ± 8,13
10 ⁻⁸ М	25,27 ± 6,53
10 ⁻⁷ М	20,67 ± 5,44
10 ⁻⁶ М	23,20 ± 9,79
10 ⁻⁵ М	21,90 ± 5,54

Примечание. Для оценки влияния BDNF и ГСБ-106 на синтез ДНК к клеткам за 3 ч до окончания инкубации с нейротрофином и его миметиком вносили модифицированный нуклеотид EdU (“Click-iT[®] Plus EdU Flow Cytometry Assay Kit”, “Thermo Scientific”, США), а затем окрашивали клетки согласно протоколу производителя. Анализ S-фазы проводили методом проточной цитофлуориметрии. Данные представлены в виде среднего арифметического условных единиц флуоресценции ± стандартная ошибка среднего. Сравнение экспериментальных групп проводили с использованием *t*-критерия Вилкоксона для зависимых выборок (*N* = 3, *n* = 9).

Таким образом, в совокупности полученные результаты указывают, что выживаемость клеток в отсутствие сыворотки и сопутствующих ростовых факторов обеспечивается собственной трофической активностью ГСБ-106, сопоставимой с таковой эндогенного нейротрофина, что согласуется с развиваемой гипотезой [6] о достаточности минимальной димеризованной дипептидной последовательности, имитирующей β-изгиб четвертой петли BDNF, для проявления BDNF-подобной трофической активности. Анализ клеточного цикла и S-фазы показал, что ГСБ-106 подобно BDNF индуцирует остановку клеточного цикла в фазе G₁, снижает количество клеток в S-фазе, уменьшает количество апоптотических клеток и не стимулирует пролиферацию.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках темы государственного задания ФГБНУ “Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова” № 0521-2019-0002.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lewin G.R., Barde Y.A. // Annu. Rev. Neurosci. 1996. V. 19. P. 289–317.
2. Reichardt L.F. // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2006. V. 361. P. 1545–1564.
3. Nagahara A.H., Tuszynski M.H. // Nat. Rev. Drug Discov. 2011. V. 10. № 3. P. 209–219.
4. Ochs G., Penn R.D., York M., et al. // Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron. Disord. 2000. V. 1. № 3. P. 201–206.
5. Lu B., Nagappan G., Guan X., et al. // Nat. Rev. Neurosci. 2013. V. 14. № 6. P. 401–416.
6. Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // ДАН. 2013. Т. 451. № 5. С. 577–580.
7. Гудашева Т.А., Поварнина П.Ю., Середенин С.Б. // Бюлл. эксперим. биол. мед. 2016. Т. 162. № 10. С. 448–451.
8. Середенин С.Б., Воронина Т.А., Гудашева Т.А. и др. // Acta natur. 2013. Т. 5. № 4. С. 116–120.
9. Поварнина П.Ю., Гарибова Т.Л., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. // Acta natur. 2018. Т. 10. № 3. С. 88–92.
10. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. // Журн. неврол. и психиат. 2015. Т. 6. С. 63–70.
11. Agholme L., Lindstrom T., Kagedal K., et al. // J. Alzheimers Dis. 2010. V. 20. № 4. P. 1069–1082.
12. Mosmann T. // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. № 1/2. P. 55–63.
13. Koh J.-Y., Gwag B.J., Lobner D., et al. // Science. 1995. V. 268. P. 573–575.
14. Hetman M., Kanning K., Cavanaugh J.E., et al. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 32. P. 22 569–22 580.

LOW MOLECULAR WEIGHT COMPOUND GSB-106 MIMICS THE CELLULAR EFFECTS OF BDNF AFTER SERUM DEPRIVATION

**L. F. Zainullina, T. A. Gudasheva, Yu. V. Vakhitova,
Academician of the RAS S. B. Seredenin**

Research Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, Russian Federation

Received August 27, 2019

The *in vitro* model of serum deprivation shows that the survival of SH-SY5Y neuronal cells is ensured by the intrinsic trophic activity of BDNF loop 4-th mimetic GSB-106 (10^{-7} M), which is comparable to that of endogenous neurotrophin (10^{-9} M). The analysis of the cell cycle and S-phase showed that GSB-106, like BDNF, induces cell cycle arrest in the G1 phase, diminishes the number of cells in the S-phase, reduces the number of apoptotic cells and does not stimulate proliferation.

Keywords: dimeric dipeptide mimetic, serum deprivation, trophic properties, cell cycle, apoptosis.