

УДК 612.822.3

ВЛИЯНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО МИМЕТИКА ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ ГК-2 НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ И СВОЙСТВА СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ В СРЕЗАХ ГИППОКАМПА

© 2023 г. А. А. Волкова^{1, 3, *}, П. Ю. Поварнина¹, П. Д. Рогозин², Р. В. Кондратенко², И. Н. Шаронова², А. А. Каменский³, В. Г. Скребицкий²

¹ ФГБНУ “Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова”, Москва, Россия

² ФГБНУ “Научный центр неврологии”, Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.11.2022 г.

После доработки 12.01.2023 г.

Принята к публикации 13.01.2023 г.

Фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF) способствует пролиферации, дифференцировке и поддержанию жизнеспособности и функционирования периферических и центральных нейронов. В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова был сконструирован и синтезирован оригинальный димерный дипептидный миметик 4-й петли NGF – гексаметилендиамид бис-(моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина) (ГК-2) активирующий PI3K/AKT и PLC- γ 1 сигнальные каскады без влияния на MAPK/ERK, с предполагаемыми прокогнитивными свойствами. В настоящей работе изучены мнотропные эффекты ГК-2 при однократном в/б введении в дозах 0.1; 0.5 и 5.0 мг/кг в тесте распознавания нового объекта у крыс. Обнаружено, что ГК-2 в дозе 0.5 мг/кг статистически значимо улучшал долговременную память животных. В экспериментах на переживающих срезах гиппокампа крыс проведена оценка действия ГК-2 на синаптическую передачу и ее пластические свойства в синаптической системе коллатерали Шаффера – пирамидные нейроны поля CA1.

Ключевые слова: переживающие срезы гиппокампа, PPR, низкомолекулярный миметик NGF, тест распознавания нового объекта

DOI: 10.31857/S1027813323020188, **EDN:** UDDMTT

ВВЕДЕНИЕ

Белки семейства нейротрофинов – регуляторы выживания и функционирования как центральных, так и периферических нейронов [1]. Фактор роста нервов (NGF) является наиболее хорошо изученным представителем этого семейства. NGF способствует пролиферации, дифференцировке и поддержанию жизнеспособности и функционирования периферических и центральных нейронов [2]. NGF необходим для нормальной синаптической пластичности в норме и патологии [3, 4].

С момента открытия NGF рассматривается возможность его использования для лечения нейродегенеративных заболеваний, и в настоящее время имеется большое число экспериментальных и клинических данных, свидетельствующих о нейропротекторных и ноотропных свойствах этого пептида [5–7]. Однако существуют ограничения для использования полноразмерного нейротрофина в клинических условиях, связанные

со слабой способностью пептида проникать через гематоэнцефалический барьер, а также наличием ряда побочных эффектов, включая гипералгезию и существенную потерю веса [2]. Это обуславливает необходимость создания низкомолекулярных соединений, обладающих необходимыми клиническими свойствами, но лишенных недостатков их полноразмерного аналога [8–10].

В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова на основе структуры бета-изгиба 4-й петли NGF был создан новый миметик NGF, представляющий собой димерный дипептид – гексаметилендиамид бис-(моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина) (ГК-2) [11] (Патент РФ № 2410392, 2011; Патент Китая № 102365294 В, 2016) (рис. 1).

Ранее с помощью Вестерн-блоттинга было установлено, что ГК-2 взаимодействует со специфическими для полноразмерного NGF высокоафинными TrkA-рецепторами, однако миметик избирательно активирует PI3K/AKT и PLC- γ 1 каскады, не оказывая влияния на MAPK/ERK сигнальный путь [12, 13]. *In vitro* ГК-2 проявлял нейропротективную активность в микро-нано-

* Адресат для корреспонденции: 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8; e-mail: volkova@mail.bio.msu.ru.

Таблица 1. Эффект однократного внутрибрюшинного введения ГК-2 в тесте распознавания нового объекта

Группа (число животных в группе)	КД	
	тест 1 (1 ч)	тест 2 (24 ч)
Контроль ($n = 10$)	0.47 ± 0.05	0.15 ± 0.03
ГК-2, 0.1 мг/кг ($n = 10$)	0.53 ± 0.07	0.16 ± 0.04
ГК-2, 0.5 мг/кг ($n = 10$)	0.46 ± 0.04	0.44 ± 0.06****
ГК-2, 5 мг/кг ($n = 10$)	0.55 ± 0.06	0.21 ± 0.06

**** $p < 0.0001$ по сравнению с группой “Контроль” (one-way ANOVA, Dunnett test).

ческих потенциалов (фВПСП) визуально оценивали амплитуду, и соотношение пресинаптического ответа к постсинаптическому. Силу стимула перед экспериментом подбирали так, чтобы вызвать ответ, амплитуда которого составляла половину от максимальной амплитуды фВПСП, и давали ответу стабилизироваться в течение 10–20 мин перед началом экспериментального воздействия.

Статистический анализ. Статистическая обработка была проведена в компьютерных программах GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, USA) и Microsoft Excel (Microsoft, USA). Так как данные экспериментов были нормально распределены (тест Шапиро–Уилка) и по данным теста Левена дисперсии равны ($p = 0.1696$), для статистической обработки был использован однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA).

Данные на графиках и в таблицах представлены как среднее, разбросы обозначают стандартную ошибку среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поведенческие эксперименты. Ранее было показано, что ГК-2 в тесте распознавания нового объекта при остром введении в дозах 0.5 и 1.0 мг/кг не влияет на кратковременную память крыс и статистически значимо улучшает долговременную [16].

В соответствии с ранее полученными данными введение ГК-2 не оказало статистически значимого влияния на коэффициент дискриминации в тесте 1 (через 1 ч после ознакомления с объектами), не было выявлено межгрупповых различий по коэффициенту дискриминации ни в одной из исследованных доз.

В тесте 2 (через 24 ч после ознакомления с объектами) ГК-2 в дозе 0.5 мг/кг статистически значимо увеличивал коэффициент дискриминации по сравнению с контрольной группой, проявляя мнемоторный эффект (табл. 1). В дозах 0.1 и 5.0 мг/кг дипептид был неактивен.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что прокогнитивные эффекты ГК-2 зависят от дозы препарата, причем эта зависимость имеет колоколообразный характер (рис. 2): оптимальной для развития когнитотропного эффекта ока-

залась доза 0.5 мг/кг, повышение дозы до 5.0 мг/кг приводило к потере эффекта.

Колоколообразная зависимость “доза–эффект” характерна для многих биологических молекул, включая регуляторные пептиды [24]. Двухфазная или трехфазная реакция на увеличивающееся воздействие получила название гормезиса (hormesis) и является характеристикой многих биологических систем [25]. Концепция гормезиса получила широкое распространение в фундаментальных биологических и биомедицинских науках [26]. Колоколообразная зависимость эффектов от дозы ранее была показана для ГК-2 на моделях болезни Паркинсона [27] и диабета [28]. Интересно отметить, что подобная зависимость отмечается и для NGF, однако в случае с полноразмерным белком это связывают с активацией низкоаффинных рецепторов p75NTR, сопряженных с доменом смерти и стимулирующих апоптоз [29, 30].

Электрофизиология. Ранее нами были получены данные об отсутствии эффекта часовой инкубации переживающих срезов гиппокампа в растворе, содержащем ГК-2 в концентрации 1.5 мг/л, на длительную потенциацию синаптической передачи, рассматриваемую в качестве основного механиз-

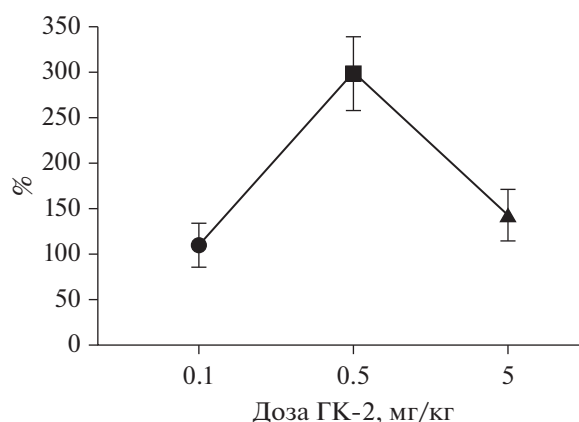


Рис. 2. Кривая “доза–эффект” миметика 4-й петли NGF ГК-2. Данные нормированы на контрольные значения.

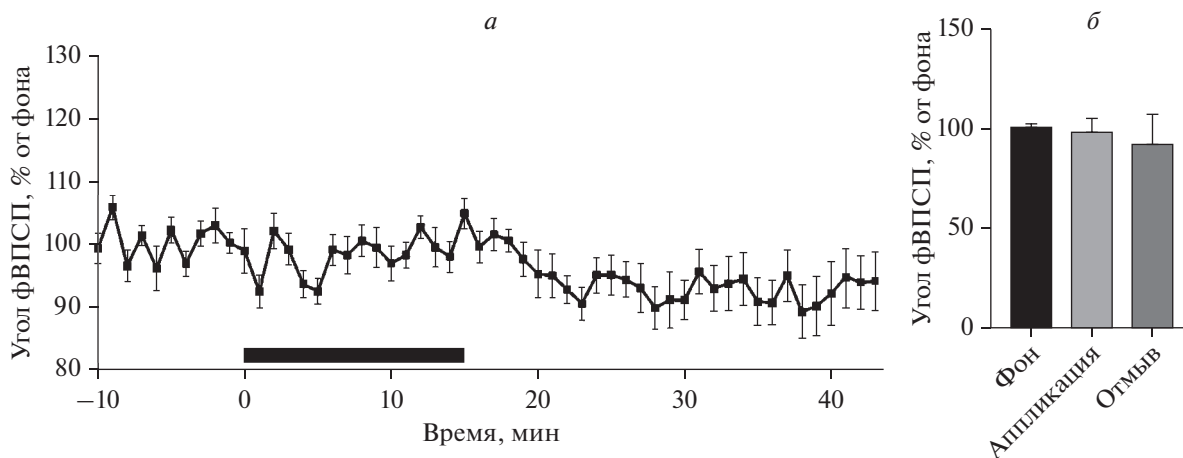


Рис. 3. Влияние аппликации 1 мг/л ГК-2 на фВПСП. *a* – динамика изменения угла наклона фВПСП в поле СА1 гиппокампа, аппликация показана черным прямоугольником. *б* – усредненные значения за 5 последних минут, $n = 10$.

ма улучшения кратковременной памяти в поведенческих тестах [31]. Однако, в этих экспериментах не была проведена оценка влияния острого эффекта миметика NGF ГК-2 на базовую синаптическую передачу в системе коллатерали Шаффера – пирамиды СА1. В данной работе были изучены эффекты острой аппликации ГК-2 на срезы гиппокампа. Аппликация ГК-2 в наиболее эффективной *in vitro* концентрации 1 мг/л [31] в течение 15 мин в перфузирующий раствор с последующим отмыванием стандартным перфузатом в течение 30 мин не оказала значимого влияния на скорость нарастания фВПСП. Величина наклона фВПСП за 10–15 мин аппликации составила $99.12 \pm 2.04\%$ от фонового уровня, а в 25–30 мин отмыва $93.08 \pm 4.56\%$ (рис. 3). Снижение ответа оказалось статистически незначимо ($p = 0.19$, repeated measures ANOVA, $N = 7$, $n = 10$).

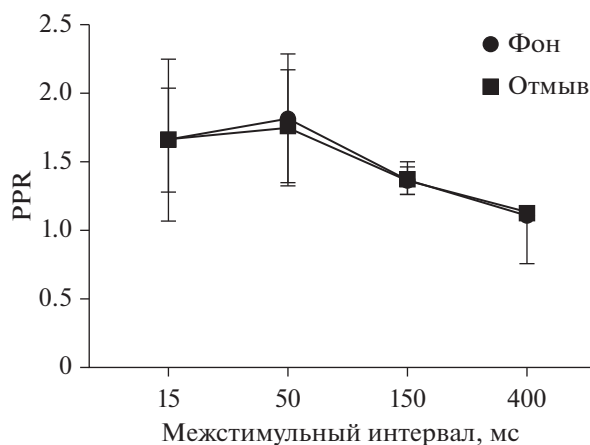


Рис. 4. Влияние аппликации 1 мг/л ГК-2 на величину PPR, $n = 9$.

Помимо длительных изменений синаптической передачи важной формой синаптической пластичности являются кратковременные изменения (или кратковременная пластичность) в пресинаптическом окончании, которая отражает изменения выброса нейромедиатора, продолжающееся от миллисекунд до нескольких секунд или минут. Стандартным подходом к оценке кратковременной пластичности является измерение отношения угла наклона второго вызванного ответа к углу наклона первого (paired-pulse ratio, PPR) при парной стимуляции с межстимульным интервалом до 500 мс [32]. Изменения в этом параметре означают вовлечение пресинаптического механизма выброса медиатора. Пары стимулов с интервалом в 15, 50, 150 и 400 мс вызывали практически идентичные PPR до аппликации ГК-2 (1 мг/л) и после 30-й мин отмывания вещества (repeated measures ANOVA, $p = 0.84$, $N = 7$, $n = 9$, рис. 4). Полученные данные позволяют сделать вывод об отсутствии влияния ГК-2 на базовую синаптическую передачу в поле СА1 гиппокампа, а также кратковременную пластичность при остром воздействии этого препарата *in vitro*.

В литературе описано влияние самого NGF, миметиком которого является исследуемый нами пептид ГК-2, на синаптическую передачу и пластичность в гиппокампе [33]. И хотя в исследованиях *in vitro* эффекта острой аппликации обнаружено не было, хорошо известно о выраженном влиянии NGF на синаптические процессы при хроническом воздействии пептида, которое, возможно, опосредованно его влиянием на отдаленные от самого гиппокампа структуры [3, 4]. Этим можно объяснить отсутствие эффекта миметика при краткосрочном воздействии непосредственно на срез гиппокампа. Однако стоит отметить, что миметик не в точности повторяет биохимический профиль активности полноразмерного NGF, в

частности, не активирует МАРК/ЕРК сигнальный путь [12, 13]. Потому при оценке его влияния на поведение возможны отличные от NGF воздействия на синаптическую передачу. В исследованиях влияния других нейротрофинов (BDNF и NT-3) на вызванную синаптическую активность, вопреки преобладающему мнению о медленном (часы-дни) проявлении их эффектов, было обнаружено почти мгновенное (минуты) и значительное изменение базовых свойств синаптической передачи – увеличение ответа и снижение PPR, сохраняющиеся часы [33]. В этом контексте наши данные показывают, что долговременные эффекты ГК-2, выявленные в поведенческих тестах в настоящем и ранее проведенных исследованиях [16] могут быть опосредованы несинаптическими механизмами или непрямыми эффектами ГК-2.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с ГОСТ 33216-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами”, а также согласно международным правилам, установленным Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей. Все процедуры одобрены Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова” (Протокол № 3 от 18.02.2021 г.) и Этическим Комитетом ФГБНУ “Научный центр неврологии” (Протокол № 10–8/21 от 17.11.2021 г.)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skaper S.D. // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 846. P. 1–12.
2. Aloe L., Rocco M.L., Bianchi P., Manni L. // *J. Transl. Med.* 2012. V. 10. № 1. P. 239.
3. Ivanov A.D., Tukhbatova G.R., Salozhin S.V., Markevich V.A. // *Neuroscience.* 2015. V. 289. P. 114–122.
4. Dobryakova Y.V., Spivak Y.S., Zaichenko M.I., Koryagina A.A., Markevich V.A., Stepanichev M.Y., Bolshakov A.P. // *Front. Neurosci.* 2021. V. 15.
5. Xu C.-J., Wang J.-L., Jin W.-L. // *Neurochem. Res.* 2016. V. 41. № 6. P. 1211–1218.
6. Manni L., Conti G., Chiaretti A., Soligo M. // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 12.
7. Allen S.J., Watson J.J., Shoemark D.K., Barua N.U., Patel N.K. // *Pharmacol. Ther.* 2013. V. 138. № 2. P. 155–175.
8. Xie Y., Tisi M.A., Yeo T.T., Longo F.M. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 38. P. 29868–29874.
9. Scarpi D., Cirelli D., Matrone C., Castronovo G., Rosini P., Occhiato E.G., Romano F., Bartali L., Clemente A.M., Bottegoni G., Cavalli A., De Chiara G., Bonini P., Calissano P., Palamara A.T., Garaci E., Torcia M.G., Guarna A., Cozzolino F. // *Cell Death Dis.* 2012. V. 3. № 7. P. e339–e339.
10. Jain P., Li R., Lama T., Saragovi H.U., Cumberlidge G., Meeroovitch K. // *Exp. Eye Res.* 2011. V. 93. № 4. P. 503–512.
11. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // Доклады Академии наук. 2010. Т. 434. № 4. С. 549–552.
12. Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Antipova T.A., Firsova Y.N., Konstantinopolsky M.A., Seredenin S.B. // *J. Biomed. Sci.* 2015. V. 22. № 1. P. 106.
13. Gudasheva T.A., Logvinov I.O., Nikolaev S.V., Antipova T.A., Povarnina P.Y., Seredenin S.B. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. V. 494. № 1. P. 244–247.
14. Антипова Т.А., Николаев С.В., Гудашева Т.А. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2014. Т. 77. № 2. С. 8–11.
15. Povarnina P.Y., Vorontsova O.N., Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U., Seredenin S.B. // *Acta Naturae.* 2013. V. 5. № 3. P. 84–91.
16. Волкова А.А., Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. // Химико-фармацевтический журнал. 2022. Т. 56. № 4. С. 3–6.
17. Collingridge G.L., Isaac J.T.R., Wang Y.T. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2004. V. 5. № 12. P. 952–962.
18. Milner B., Squire L.R., Kandel E.R. // *Neuron.* 1998. V. 20. № 3. P. 445–468.
19. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015. № 6. С. 63–70.
20. Gudasheva T.A., Povarnina P., Logvinov I.O., Antipova T.A., Seredenin S.B. // *Drug Des. Devel. Ther.* 2016. V. 10. P. 3545–3553.
21. Ennaceur A., Delacour J. // *Behav. Brain Res.* 1988. V. 31. № 1. P. 47–59.
22. Antunes M., Biala G. // *Cogn. Process.* 2011. V. 13. № 2. P. 93–110.
23. Beldjoud H., Barsegyan A., Roozendaal B. // *Front. Behav. Neurosci.* 2015. V. 9. P. 108.
24. Puzzo D., Privitera L., Palmeri A. // *Neurobiol. Aging.* 2012. V. 33. № 7. P. 1484.e15–1484.e24.
25. Calabrese E. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 10. P. 2871.
26. Calabrese E.J. // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2008. V. 66. № 5. P. 594–617.
27. Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А., Воронцова О.Н., Бондаренко Н.А., Середенин С.Б. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. Т. 151. № 6. С. 634–637.

28. Иванов С.В., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. // Химико-фармацевтический журнал. 2021. Т. 55. № 4. С. 11–15.
29. Kemp S.W.P., Webb A.A., Dhaliwal S., Syed S., Walsh S.K., Midha R. // Exp. Neurol. 2011. V. 229. № 2. P. 460–470.
30. Wang X., Bauer J.H., Li Y., Shao Z., Zetoune F.S., Cattaneo E., Vincenz C. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 36. P. 33812–33820.
31. Stelmashook E.V., Aleksandrova O.P., Rogozin P.D., Genrikhs E.E., Novikova S.V., Gudasheva T.A., Sharonova I.N., Skrebitsky V.G., Isaev N.K. // Bull. Exp. Biol. Med. 2020. V. 168. № 4. P. 474–478.
32. Regehr W.G. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012. V. 4. № 7. P. a005702–a005702.
33. Kang H., Schuman E. // J. Physiol. 1995. V. 89. № 1. P. 11–22.

Effect of Low Molecular Weight Nerve Growth Factor Mimetic GK-2 on Cognitive Function and Synaptic Transmission in Hippocampal Slices

A. A. Volkova^{a, c}, P. Yu. Povarnina^a, P. D. Rogozin^b, R. V. Kondratenko^b,
I. N. Sharonova^b, A. A. Kamensky^c, and V. G. Skrebitsky^b

^a Research Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, Russia

^b Research Center of Neurology, Moscow, Russia

^c Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia

Nerve growth factor (NGF) contributes to the proliferation, differentiation and maintenance of the viability and functioning of peripheral and central neurons. At the Research Zakusov Institute of Pharmacology a dimeric dipeptide mimetic of the NGF loop 4 bis(monosuccinyl-L-glutamyl-L-lysine) hexamethylenediamide (GK-2) was created. GK-2 activates PI3K/AKT and PLC- γ 1 signaling cascades, without affecting MAPK/ERK, and appears to have procognitive properties. In the present study, we investigated the mnemotropic effects of GK-2 with a single intraperitoneal dose of 0.1, 0.5 and 5.0 mg/kg in the novel object recognition test in rats. GK-2 at a dose of 0.5 mg/kg statistically significantly improved the long-term memory of animals. In experiments on the rat hippocampal acute slices, we evaluated the effects of GK-2 on synaptic transmission and its plastic properties in the synaptic system Schaffer collaterals – CA1 pyramidal cell.

Keywords: hippocampal slices, PPR, low molecular weight NGF mimetic, novel object recognition test