Исследование стереоспецифичности нейропротекторного действия дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 на модели оксидативного стресса в культуре гиппокампальных клеток линии НТ-22

Логвинов И.О., Тарасюк А.В., Антипов П.И., Антипова Т.А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», г. Москва

Резюме. Исследована стереоспецифичность нейропротекторнного действия димерного дипептидного миметика 4-й петли BDNF – ГСБ-106. Для этого изучена активность его диастереомеров ГТ-106DL (гексаметилендиамид бис-моносукцинил-D-серил-L-лизина) и ГТ-106LD (гексаметилендиамид бис-моносукцинил-L-серил-D-лизина) на гиппокампальных клетках линии НТ-22 в условиях оксидативного стресса. Оба диастереомера были не активны. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о зависимости эффекта от конфигурации аминокислотных остатков в структуре ГСБ-106.

Ключевые слова: нейропротекция, оксидативный стресс, BDNF, ГСБ-106, стереоспецифичность

A study of neuroprotective effect stereospecificity of dipeptide mimetic of the Brain-derived neurotrophic factor GSB-106 on the model oxidative stress in the culture hippocampal cell line HT-22

Logvinov I.O., Tarasiuk A.V., Antipov P.I., Antipova T.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. In the present work, the neuroprotective effect stereospecificity of dimeric dipeptide mimetic of the 4th loop of BDNF-GSB-106 is studied. Activity of its diastereomers GT-106DL (hexamethylenediamide bis-monosuccinyl-D-seryl-L-lysine) and GT-106LD (hexamethylenediamide bis-monosuccinyl-L-seryl-D-lysine) in hippocampal HT-22 cells under conditions of oxidative stress is for this purpose studied. Both diastereomers were inactive. Thus, the obtained data indicate dependence of effect on the configuration of amino acid residues in the structure of GSB-106.

Keywords: Neuroprotection, oxidative stress, BDNF, GSB-106, stereospecificity

Автор, ответственный за переписку:

Логвинов Илья Олегович – научный сотрудник ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; e-mail: logvinov_ilya@mail.ru

Введение

Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) относится к семейству нейротрофинов, которое включает в себя фактор роста нервов, нейротрофин-3 и нейротрофин-4/5. Благодаря своей способности увеличивать выживаемость нейронов, нейротрофины рассматриваются как эндогенные нейропротекторы. BDNF особенно привлекателен в этом отношении, так как он улучшает выживание и предупреждает дегенерацию популяций нейронов, вовлечённых в такие заболевания, как болезнь Альцгеймера (базальные холинергичекие нейроны переднего мозга), Паркинсона (дофаминергические нейроны черной субстанции), Хантингтона [1, 2]. Особый интерес к BDNF определяется его участием в патогенезе депрессий [3].

Однако применение BDNF при системном введении ограничено такими факторами, как биодеградация, низкая способность проникать через гематоэнцефалический барьер и наличием нежелательных побочных эффектов [4, 5].

Ранее в ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» был получен димерный дипептидный миметик 4-й петли BDNF – ГСБ-106LL (гексаметилендиамид бис-моносукцинил-L-серил-L-лизина) на основе гипотезы о том, что фармакофорными участками нейротрофинов являются бета-изгибы их шпилькообразных петель [6].

ГСБ-106, аналогично BDNF, проявлял нейропротекторную активность на модели оксидативного стресса в культуре гиппокампальных нейронов линии НТ-22 в интервале концентраций 10^{-5}—10^{-8} М [7].

С целью развития новой группы нейропротекторов на основе димерных дипептидных миметиков BDNF в настоящей работе исследована связь структуры и активности в ряду аналогов ГСБ-106. Для этого были синтезированы два новых диастереомера ГСБ-106 – ГТ-106DL (замена *L*-Ser на *D*-Ser) и ГТ-106LD (замена *L*-Lys на *D*-Lys), и изучена их нейропротекторная активность *in vitro*.

Материалы и методы

Культура гиппокампальных клеток линии НТ-22

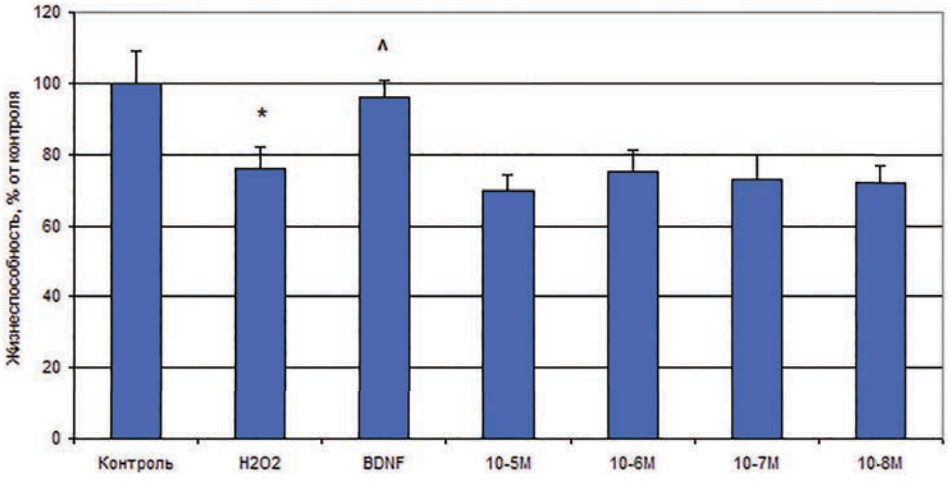
Иммортализованные клетки гиппокампа мыши линии НТ-22 рассеивали на 96-луночные планшеты обработанные поли-Д-лизином (BD Biosciences, San Jose, USA; 5 мкг/см^2), с плотностью 3,5 тыс. на лунку в среде ДМЕМ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), содержащей 5% телячьей эмбриональной сыворотки (Gibco Life Technologies, New York, USA) и 2 мМ *L*-глутамина (ICN, Eschwege, Germany), и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO_2.

Модель оксидативного стресса

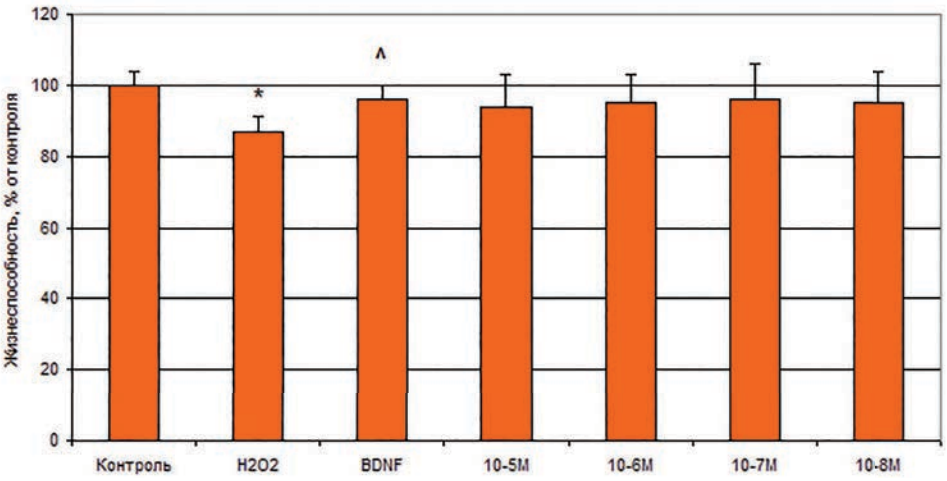
Оксидативный стресс моделировали путём внесения в клеточную среду культивирования раствора перекиси водорода (H_2O_2) в конечной концентрации 1,5 мМ. Клетки с H_2O_2 инкубировали в атмосфере 5% CO_2 при 37 °С 30 мин. Далее среду заменяли на нормальную и через 4 ч определяли жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста (бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5 дифенилтетразолия (МТТ) (Sigma, США)) [8]. В качестве положительного контроля использовали BDNF (BD Bioscience, Великобритания) в конечной концентрации 50 нг/мл. ГТ-106DL и ГТ-106LD вносили в конечных концентрациях 10^{-5}–10^{-8}М за 24 ч до повреждения клеток и после отмывки H_2O_2. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре “Multiscan EX” (Thermo, США) при длине волны 600 нм.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA). Данные представлены в виде m ± s.d.



а



б

Рис. 1. Влияние различных концентраций ГТ-106DL (*а*) и ГТ-106LD (*б*) на жизнеспособность гиппокампальных нейронов линии НТ-22 на модели оксидативного стресса (результаты МТТ-теста). Внесение пептидов за 24 ч до перекиси водорода
Примечание: * – $p \le 0,05$ по сравнению с контролем; ^ – $p \le 0,05$ по сравнению с перекисью водорода

Результаты и их обсуждение

Для выявления нейропротекторного действия димерных дипептидных стереоизомеров ГСБ-106 была использована модель окисидативного стресса. Оксидативный стресс является одним из центральных звеньев нейродегенеративных процессов. Индукция этого стресса в культуре клеток является одной из самых популярных моделей для исследования повреждений нейронов при ишемии и других нейродегенеративных заболеваний. Последовательность событий, происходящих при этом в клетке, достаточно хорошо изучена. Поэтому эта модель особенно интересна с точки зрения исследования действия новых потенциальных нейропротекторов.

Полученные результаты показывают, что внесение перекиси водорода приводило к достоверному снижению жизнеспособности клеток HT-22. BDNF защищал клетки от гибели в обеих схемах эксперимента. ГТ-106DL и ГТ-106LD не оказывали нейропротекторного действия ни в одной из исследуемых концентраций как при внесении в культуру гиппокампальных нейронов линии HT-22 за 24 ч до оксидативного стресса (рис. 1), так и после повреждения перекисью водорода (рис. 2).

Таким образом, показано исчезновение нейропротекторного эффекта при замене остатка L-серина на D-серин (ГТ-106DL), а также при замене L-лизина на D-лизин (ГТ-106LD). Полученные результаты свидетельствуют о ключевой роли L-конфигурации как для остатка лизина, так и для остатка серина, в проявлении нейропротекторной активности стереоизомеров ГСБ-106.

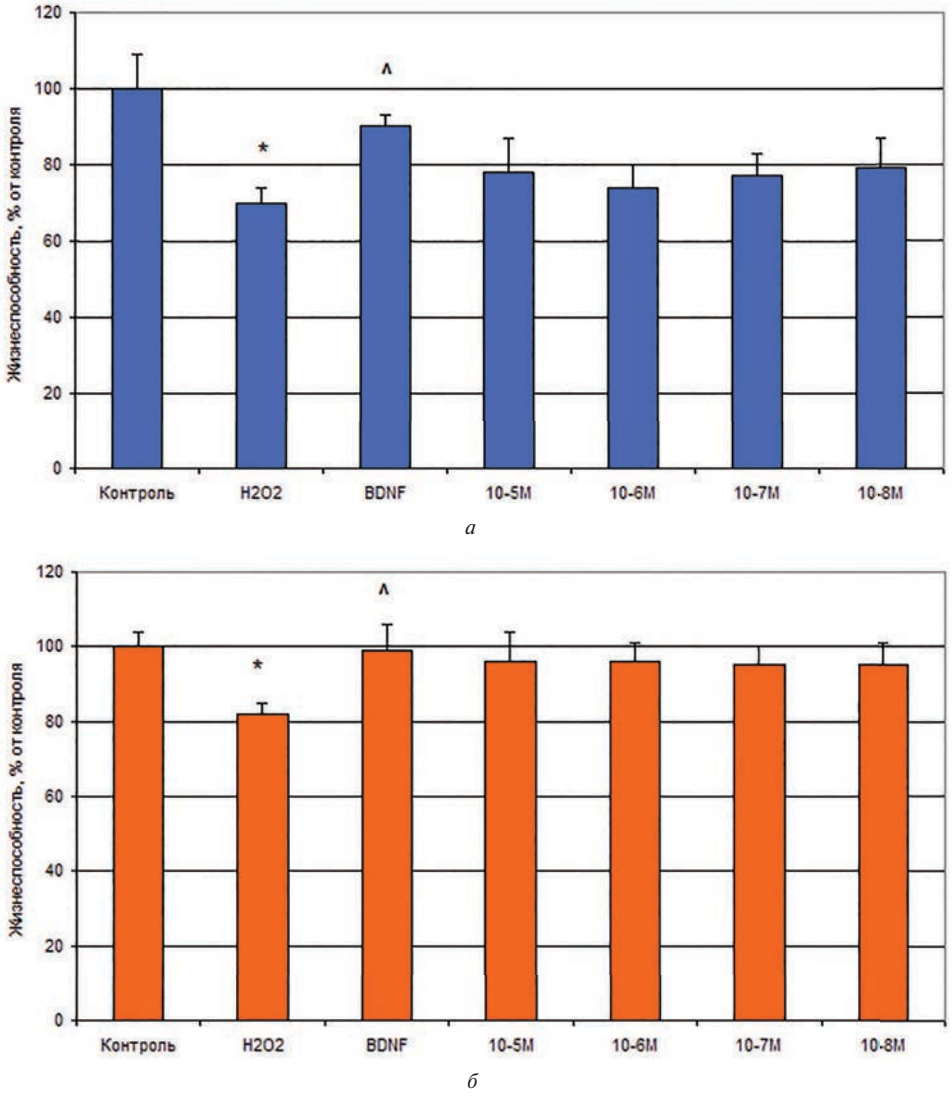


Рис. 2. Влияние различных концентраций ГТ-106DL (*а*) и ГТ-106LD (*б*) на жизнеспособность гиппокампальных нейронов линии HT-22 на модели оксидативного стресса (результаты МТТ-теста). Внесение пептидов сразу после отмывки перекиси водорода

Примечание: * – $p \le 0,05$ по сравнению с контролем; ^ – $p \le 0,05$ по сравнению с перекисью водорода

Литература

1. *Zuccato C., Cattaneo E.* Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. Nature reviews. Neurology 2009; 5: 311–322.
2. *Schmidt H.D., Duman R.S.* Peripheral BDNF Produces Antidepressant-Like Effects in Cellular and Behavioral Models. Neuropsychopharmacology 2010; 35: 2378–2391.
3. *Castren E., Rantamaki T.* The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. Dev. Neurobiol. 2010; 70: 5: 289–297.
4. BDNF Study Group (Phase III). Neurology. 1999; 52: 1427–1433.
5. *Poduslo J.F., Curran G.L.* Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. Brain Res. Mol. Brain Res. 1996; 36: 280–286.
6. *Середенин С.Б., Гудашева Т.А.* Дипептидные миметики нейротрофинов NGF и BDNF: Патент РФ №2410392. Б.И. 2011; 3.
7. *Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В., Логвинов И.О., Поварнина П.Ю., Антипова Т.А., Середенин С.Б.* Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора. Биоорган. химия 2012; 38: 3: 280–290.
8. *Jackson G.R., Werrbach-Perez K., Ezell E.L., Post J.F., Perez-Polo J.R.* Nerve growth factor effects on pyridine nucleotides after oxidant injury of rat pheochromocytoma cells. Brain Res. 1992; 592: 1–2: 239–248.