

УДК 577.112.6:615.252.349.7

АНТИДИАБЕТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ НОВОГО ОРИГИНАЛЬНОГО ДИПЕПТИДНОГО МИМЕТИКА NT-3

© 2023 г. С. С. Ягубова^{1,*}, М. А. Чернышевская¹, Р. У. Островская¹,
член-корреспондент РАН Т. А. Гудашева¹, академик РАН С. Б. Середенин¹

Поступило 02.05.2023 г.

После доработки 23.05.2023 г.

Принято к публикации 24.05.2023 г.

Ранее установлено, что оригинальный дипептидный миметик 4-й петли NT-3 гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-аспарагинил-L-аспарагина) (ГТС-301) обладает выраженным нейропротективным эффектом *in vitro* в концентрациях 10^{-5} – 10^{-12} М. В настоящем исследовании в экспериментах на стрептозотоциновой модели диабета у мышей линии C57Bl/6 установлено, что ГТС-301 при 32-дневном внутрибрюшинном введении в дозах 0.1 и 0.5 мг/кг обладает антидиабетической активностью по показателям снижения гипергликемии, полидипсии и увеличения выживаемости животных. Полученные результаты подтверждают концепцию сходства нейрорхимических механизмов регуляции функций нейронов и β -клеток.

Ключевые слова: NT-3, низкомолекулярный миметик, дипептид, ГТС-301, стрептозотозин, диабет, антидиабетическая активность, мыши C57Bl/6

DOI: 10.31857/S2686738923700336, **EDN:** PUTHWA

На основе конструирования N-ацил-дипептидных миметиков наиболее экспонированных бета-поворотных фрагментов петель NGF и BDNF в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова созданы соединения, воспроизводящие эффекты нейротрофинов. В модельных опытах *in vitro* ряд соединений по-разному активировали пост-рецепторные сигнальные пути Trk-рецепторов; выявлены особенности их фармакологических эффектов. Изучение связи структуры и активности низкомолекулярных миметиков NGF по нейропротективному и антидиабетическим эффектам позволило отобрать в качестве соединения лидера дипептид ГК-2. В ряду миметиков BDNF комплекс нейропротективных и антидепрессант-подобных свойств зарегистрирован у миметика ГСБ-106 [1].

В развитие стратегии создания низкомолекулярных миметиков нейротрофинов выполнен дизайн и изучены свойства миметиков нейротрофина-3 (NT-3). NT-3, подобно NGF и BDNF, играет важную роль в регуляции пролиферации, дифференцировки, миелинизации, сохранении фенотипической стабильности нейронов. Отличие

NT-3 от других нейротрофинов состоит в активации преимущественно TrkC, с меньшей аффинностью TrkB и с еще более низкой – TrkA.

Для полноразмерной молекулы NT-3, как и для других нейротрофинов, характерны низкая энзиматическая устойчивость и неудовлетворительные фармакокинетические свойства, что определяет целесообразность создания и выявления фармакологических свойств его низкомолекулярных системно-активных миметиков. Как и в предыдущих работах, для конструирования миметика NT-3 был выбран наиболее экспонированный фрагмент 4-й петли – Glu⁹²–Asn⁹³–Asn⁹⁴–, на основе которого синтезирован димерный дипептидный миметик – гексаметилендиамид бис-(N-моно-сукцинил-L-аспарагинил-L-аспарагина) (ГТС-301) [2]. Для этого миметика показана активация, как и для полноразмерной молекулы, преимущественно TrkC рецепторов. Нейропротекторная активность *in vitro* установлена в пикомолярных концентрациях. В опытах *in vivo* обнаружен антидепрессант-подобный эффект при внутрибрюшинном введении в дозах 10–40 мг/кг [2].

Исходя из ранее предложенной концепции сходства нейрорхимических механизмов регуляции функций нейронов и β -клеток [3, 4], в настоящей работе изучена антидиабетическая активность соединения ГТС-301.

Исследование проведено на стрептозотоциновой модели диабета на мышах C57Bl/6. Мышей

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова”, Москва, Россия

*e-mail: syagubova@yandex.com

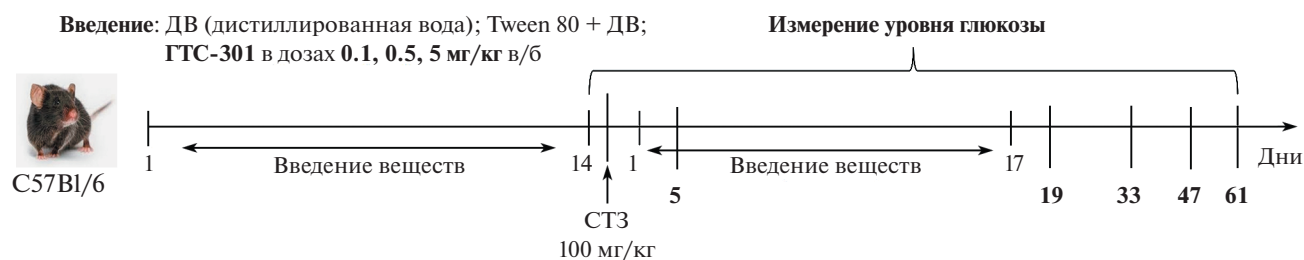


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

делили на следующие группы: Контроль, Диабет, Диабет + ГТС-301 (0.1 мг/кг), Диабет + ГТС-301 (0.5 мг/кг), Диабет + ГТС-301 (5 мг/кг). Диабет моделировали однократным внутривенным (в/б) введением стрептозотоцина (СТЗ) в дозе 110 мг/кг. Группе Контроль в/б на протяжении 32 дней вводили дистиллированную воду (ДВ) или 1% раствор Tween 80 в ДВ. Группе Диабет вводили ДВ или 1% раствор Tween 80 в/б в течение 14 дней, на 15-й день – СТЗ, а затем продолжали введение ДВ или 1% раствора Tween 80 в течение последующих 17 дней. ГТС-301 в 1% растворе Tween 80 вводили в дозах 0.1, 0.5 или 5 мг/кг в/б в течение 14 дней до введения СТЗ и в течение 17 дней после введения СТЗ (см. рис. 1). Все вещества вводили в/б из расчета 0.01 мл на 1 г массы животного. Измерение уровня глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены мышей, проводили при помощи глюкометра One Touch Select Plus Flex до введения и на разные сроки после введения СТЗ. Ежедневно проводили измерение потребления воды.

Профилактическое введение (до СТЗ) дипептида ГТС-301 в течение 14 дней в дозах 0.1, 0.5 и 5 мг/кг не вызывало изменений уровня глюкозы в крови животных.

Введение СТЗ в дозе 110 мг/кг вызывало выраженное (~ в 3 раза) повышение уровня глюкозы в крови у животных группы Диабет, которое сохранялось после индукции диабета до 61-го дня (табл. 1).

Последующее (превентивное + лечебное) введение ГТС-301 в дозах 0.1 и 0.5 мг/кг в/б оказывало антигипергликемический эффект, который отсутствовал в дозе 5 мг/кг (табл. 1). В дозе 0.1 мг/кг статистически значимое снижение глюкозы в крови было выявлено с 19-х по 61-е сутки после СТЗ. В дозе 0.5 мг/кг снижение глюкозы проявилось с 5-х по 47-е сутки после введения СТЗ. Таким образом, ГТС-301 оказывает пролонгированный лечебный эффект.

Одним из важных индикаторов сахарного диабета является полидипсия [6]. В группе Диабет наблюдалось выраженное повышение количества

Таблица 1. Уровень глюкозы в крови мышей (ммоль/л)

Группа	Сутки после введения СТЗ				
	5-е	19-е	33-е	47-е	61-е
Контроль	8.35 ± 0.34	8.23 ± 0.27	8.67 ± 0.32	7.97 ± 0.23	8.18 ± 0.25
Диабет	22.41 ± 2.11 *	21.80 ± 1.97 *	21.55 ± 2.76 *	22.66 ± 2.29 *	25.79 ± 2.88 *
Диабет+ГТС-301 (0.1 мг/кг)	17.69 ± 2.87 *	16.39 ± 2.33 *#	14.72 ± 1.91 *#	17.22 ± 2.64 *#	17.24 ± 2.88 *#
Диабет+ГТС-301 (0.5 мг/кг)	15.79 ± 2.33 *#	20.65 ± 1.21 *	16.04 ± 1.60 *#	16.95 ± 1.51 *#	21.20 ± 2.29 *
Контроль	8.60 ± 0.30	8.93 ± 0.30	8.15 ± 0.39	8.03 ± 0.36	7.28 ± 0.26
Диабет	22.55 ± 2.13 *	19.92 ± 2.06 *	15.87 ± 2.18 *	17.04 ± 2.56 *	14.41 ± 2.26 *
Диабет+ГТС-301 (5 мг/кг)	24.26 ± 2.25 *	27.79 ± 1.47 *	23.34 ± 2.78 *#	25.31 ± 2.75 *#	23.17 ± 3.79 *#

Заболевшими считались животные с уровнем глюкозы в крови ≥ 13 ммоль/л [5]. Поскольку эксперименты с разными дозами ГТС-301 проводились в разные дни, для каждой из двух серий эксперимента представлены свои значения для групп Контроль и Диабет. Данные представлены в виде средних значений по группе с указанием стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). Статистические отличия групп (однофакторный ANOVA с последующими попарными межгрупповыми сравнениями с помощью теста Дункана, $p < 0.05$): * от группы Контроль; # от группы Диабет.

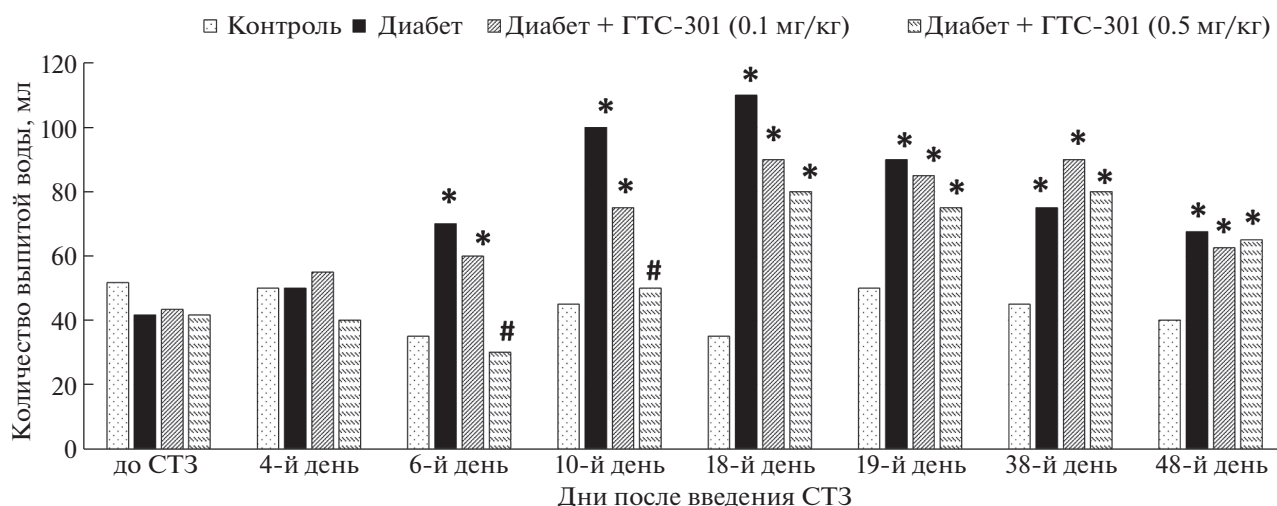


Рис. 2. Динамика потребления воды. Статистические отличия групп (точный тест Фишера, $p < 0.05$): * — от группы Контроль; # — от группы Диабет. Данные представлены в виде количества выпитой воды (мл) в сутки.

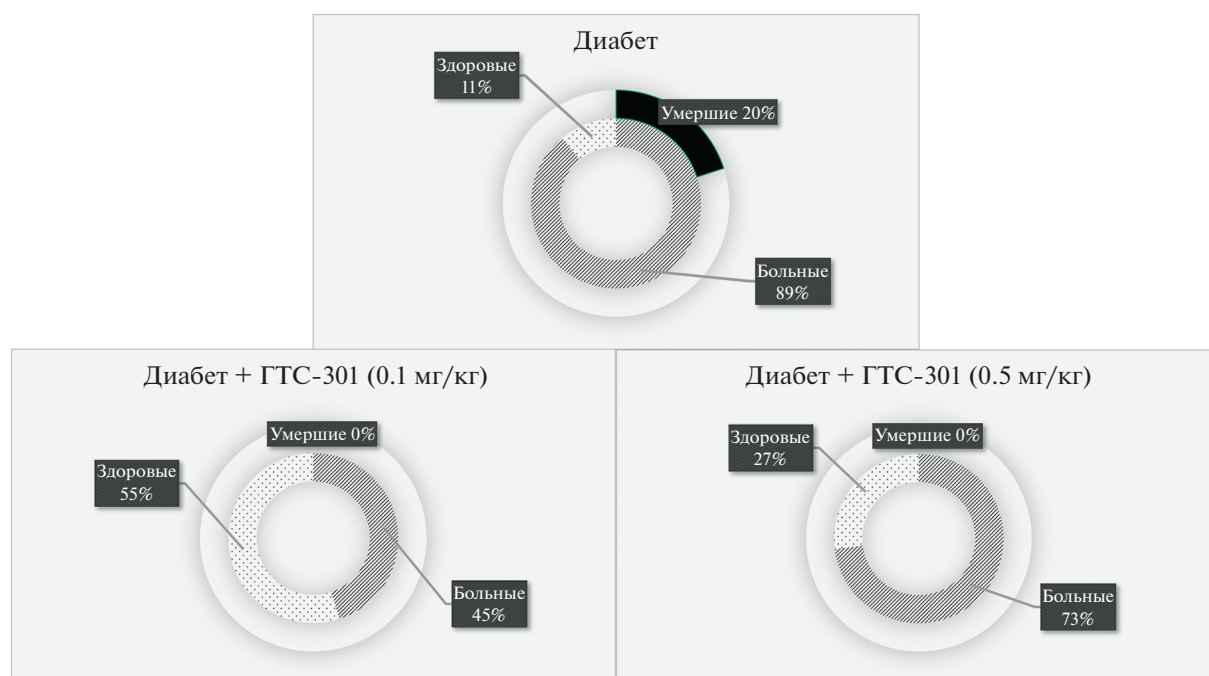


Рис. 3. Заболеваемость и смертность на 61-е сутки после введения СТЗ.

выпитой жидкости (рис. 2), которое проявлялось с 6 суток после индукции диабета и сохранялось до окончания регистрации данного показателя (48 дней). ГТС-301 в дозе 0.5 мг/кг в/б ослаблял полидипсию на 50–57% до 18-го дня после индукции диабета (рис. 2).

ГТС-301 в дозах 0.1 и 0.5 мг/кг также достоверно уменьшал число животных с повышенным (≥ 13 ммоль/л) уровнем глюкозы в крови и полностью предотвращал их гибель (рис. 3). Так, в группе животных, получавших ГТС-301 в дозе

0.1 мг/кг, количество животных с гипергликемией на 5-е и 61-е сутки составило 45% по сравнению с 90% в группе Диабет ($p < 0.05$, критерий хи-квадрат). В дозе 0.5 мг/кг эффект ГТС-301 был менее выражен.

Таким образом, в настоящей работе, при моделировании стрептозотоцинового диабета, впервые выявлена антидиабетическая активность соединения ГТС-301 по показателям снижения гипергликемии, полидипсии и увеличения выживаемости животных.

Известно, что NT-3 представлен не только в мозговой ткани, но и в периферических органах, в некоторых из них его содержание существенно превышает таковое для структур мозга. Так, если содержание NT-3 в мозжечке составляет 0.71 нг/г, в гиппокампе 6.3 нг/г, то в печени 45 нг/г, а в поджелудочной железе уровень NT-3 достигает 892 нг/г [7]. Для β -клеток поджелудочной железы характерна экспрессия TrkC [8]. Несмотря на наличие этих данных, вопрос о возможном антидиабетическом эффекте полноразмерной молекулы ранее практически не изучался. При тщательном анализе литературы мы обнаружили только одну публикацию [9], которая была выполнена на диабетической генетической модели — мышах линии db/db. В этой работе отмечалось, что подкожное введение NT-3 в дозе 20 мг/кг ведет к снижению содержания сахара в крови db/db мышей с 20 до 8 мг/дл, однако этот эффект был кратковременным — через 24 ч было отмечено восстановление исходного, гипергликемического уровня.

В качестве перспективных свойств ГТС-301 можно отметить малые эффективные дозы (0.1 и 0.5 мг/кг) и наличие выраженного эффекта последствий. Важнейшей особенностью изученного миметика является возможность применения при системном введении.

В то же время применение полноразмерной молекулы NT-3 требует сложных и инвазивных методов введения [10]. Так, в экспериментах по изучению эффекта NT-3 на модели диабетической нейропатии этот нейротрофин доставлялся интратекально в спинной мозг [11]. Применялось нанесение рекомбинантного NT-3 непосредственно на место хирургического повреждения головного мозга крысы с помощью гелевой пены [12], а также использовалась инъекционная композиция, состоящая из биоразлагаемых полимерных наночастиц, диспергированных в гиалурон-метилцеллюлозном геле для интратекального введения NT-3 в спинной мозг [13]. В исследованиях использовались также биоактивные каркасы (из желатиновой губки, фиброина шелка, хитозана) с NT-3 [14–16].

Тот факт, что низкомолекулярный миметик NT-3, дипептид ГТС-301, для которого была выявлена выраженная нейропротективная активность [2], проявляет, как было впервые установлено в приведенных выше экспериментах, также и антидиабетический эффект, является важным свидетельством в пользу развиваемой нами концепции сходства механизмов защиты нейронов и β -клеток поджелудочной железы [3, 4]. Установленное наличие у миметика NT-3 антидиабетического эффекта представляет также практический интерес в аспекте возможной разработки нового оригинального средства лечения диабета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Tarasiuk A.V., et al. Low-molecular mimetics of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor: Design and pharmacological properties // *Med Res Rev.* 2021. V. 41. № 5. P. 2746–2774.
2. Гудашева Т.А., Сазонова Н.М., Тарасюк А.В. и др. Первый дипептидный миметик нейротрофина-3: дизайн и фармакологические свойства // *Доклады Российской Академии наук. Науки о жизни.* 2022. Т. 505. С. 54–60.
3. Островская Р.У., Ягубова С.С. Общие механизмы в патогенезе болезни Альцгеймера и диабета: пути фармакологической коррекции // *Психиатрия.* 2014. Т. 61. № 1. С. 35–43.
4. Ostrovskaya R.U., Ivanov S.V. Neuroprotective Substances: Are they Able to Protect the Pancreatic Beta-Cells Too? // *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets.* 2022. V. 22. P. 834–841.
5. Watcho P., Stavniichuk R., Tane P., et al. Evaluation of PMI-5011, an ethanolic extract of *Artemisia dracunculus* L., on peripheral neuropathy in streptozotocin-diabetic mice // *Int J Mol Med.* 2011. V. 27. № 3. P. 299–307.
6. Hakim Z.S., Patel B.K., Goyal R.K. Effects of chronic ramipril treatment in streptozotocin-induced diabetic rats // *Indian J Physiol Pharmacol.* 1997. V. 41. № 4. P. 353–360.
7. Katoh-Semba R., Kaisho Y., Shintani A., et al. Tissue distribution and immunocytochemical localization of neurotrophin-3 in the brain and peripheral tissues of rats // *J Neurochem.* 1996. V. 66. № 1. P. 330–337.
8. Tazi A., Le Bras S., Lamghitnia H., et al. Neurotrophin-3 Increases Intracellular Calcium in a Rat Insulin-secreting Cell Line through Its Action on a Functional TrkC Receptor // *J Biol Chem.* 1996. V. 271. № 17. P. 10154–60.
9. Ono M., Ichihara J., Nonomura T., et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Reduces Blood Glucose Level in Obese Diabetic Mice but Not in Normal Mice // *Biochem Biophys Res Commun.* 1997. V. 238. № 2. P. 633–637.
10. El Ouaamari Y., Van den Bos J., Willekens B., et al. Neurotrophic Factors as Regenerative Therapy for Neurodegenerative Diseases: Current Status, Challenges and Future Perspectives // *Int J Mol Sci.* 2023. V. 24. № 4. P. 3866.
11. Christianson J.A., Ryals J.M., Johnson M.S., et al. Neurotrophic modulation of myelinated cutaneous innervation and mechanical sensory loss in diabetic mice // *Neuroscience.* 2007. V. 145. № 1. P. 303–313.
12. Akyol O., Sherchan P., Yilmaz G., et al. Neurotrophin-3 provides neuroprotection via TrkC receptor dependent pErk5 activation in a rat surgical brain injury model. // *Exp Neurol.* 2018. V. 307. P. 82–89.
13. Donaghue I.E., Tator C.H., Shoichet M.S. Sustained delivery of bioactive neurotrophin-3 to the injured spinal cord. // *Biomater Sci.* 2015. V. 3. № 1. P. 65–72.
14. Ji W.C., Li M., Jiang W.T., et al. Protective effect of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 overexpression by adipose-derived stem cells combined

- with silk fibroin/chitosan scaffold in spinal cord injury. // *Neurol Res.* 2020. V. 42. № 5. P. 361–371.
15. Sun X., Zhang C., Xu J., et al. Neurotrophin-3-Loaded Multichannel Nanofibrous Scaffolds Promoted Anti-Inflammation, Neuronal Differentiation, and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. // *ACS Biomater Sci Eng.* 2020. V. 6. № 2. P. 1228–1238.
16. Oudega M., Hao P., Shang J., et al. Validation study of neurotrophin-3-releasing chitosan facilitation of neural tissue generation in the severely injured adult rat spinal cord. // *Exp Neurol.* 2019. V. 312. P. 51–62.

ANTIDIABETIC EFFECT OF A NEW ORIGINAL NT-3 DIPEPTIDE MIMETIC

S. S. Yagubova^{a, #}, M. A. Chernyshevskaya^a, R. U. Ostrovskaya^a,

Corresponding Member of the RAS T. A. Gudasheva^a, and Academician of the RAS S. B. Seredenin^a

^a*Federal State Budgetary Institution "Research Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: syagubova@yandex.com*

It was previously established that the original dipeptide mimetic of the 4th loop of NT-3, hexamethylenediamide bis-(N-monosuccinyl-L-asparaginyl-L-asparagine) (GTS-301), has a pronounced neuroprotective effect *in vitro* at concentrations of 10^{-5} – 10^{-12} M. In the present study, experiments on the streptozotocin-induced diabetes model in C57Bl/6 mice showed that GTS-301, administered intraperitoneally for 32 days at doses of 0.1 and 0.5 mg/kg, has antidiabetic activity manifested in the reduction of hyperglycemia, polydipsia, and in the increase of animal survival. The results obtained confirm the concept of the similarity of neurochemical mechanisms underlying the regulation of neurons and β -cells functions.

Keywords: NT-3, low-molecular-weight mimetic, dipeptide, GTS-301, streptozotocin, diabetes, antidiabetic activity, C57Bl/6 mice