

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

СХОДСТВО ЦИКЛО-ПРОЛИЛГЛИЦИНА С ПИРАЦЕТАМОМ ПО АНТИГИПОКСИЧЕСКОМУ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНОМУ ЭФФЕКТАМ

К. Н. Колясникова, Т. А. Гудашева, Г. А. Назарова, П. И. Антипов, С. В. Николаев, Т. А. Антипова, Т. А. Воронина, С. Б. Середенин¹

Изучено антигипоксическое действие эндогенного циклического дипептида цикло-пролилглицина (ЦПГ) на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией на мышцах и его нейропротекторная активность на модели клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y с повреждением дофаминергических нейронов нейротоксином 6-OHDA. Показано, что ЦПГ проявляет антигипоксическую активность в дозах 0,5 и 1 мг/кг внутривенно на мышцах беспородных и линии BALB/c, но не C57BL/6. Нейропротекторная активность выявляется в интервале концентраций 10^{-5} – 10^{-8} М при внесении ЦПГ за 24 ч до токсина. Полученные данные подтверждают предположение, что пирацетам является миметиком эндогенного нейропептида цикло-пролилглицина.

Ключевые слова: цикло-пролилглицин; пирацетам; пептидомиметик; антигипоксическая активность; нейропротекторная активность

ВВЕДЕНИЕ

С 1985 г. в НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН развивается концепция о сходстве механизмов действия ряда нейротропных средств, рецепторное связывание которых не выявлено, с эндогенными нейропептидами [8]. Последние, как известно, могут иметь свои рецепторы или участки связывания, осуществляя либо модулируя синаптическую передачу [1]. Подтверждением выдвинутой гипотезы служит цикл работ с ноотропным препаратом пирацетамом [9, 15, 23]. Вначале был сконструирован его предполагаемый эндогенный аналог — цикло-L-пролилглицин (ЦПГ), проявивший в фармакологических исследованиях способность стимулировать когнитивные функции [5]. Однако наиболее значимым подтверждением концепции явилось обнаружение ЦПГ в качестве эндогенного соединения у интактных животных [16]. Идентификация ЦПГ была подтверждена в работах зарубежных авторов [24]. Спектры ноотропной активности пирацетама и ЦПГ совпадали [6]. Для ЦПГ была показана и анксиолитическая активность [7], характерная для пирацетама. Но для пирацетама были также установлены противогипоксический и нейропротекторный эффекты [3]. Для дополнительного подтверждения подобия фармакологической активности пирацетама и ЦПГ и развития концепции о пирацетама как миметике эндогенного ЦПГ в настоящей работе

изучены противогипоксические и нейропротекторные свойства ЦПГ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вещества. Циклический дипептид цикло-L-пролилглицин (т. пл. 200 – 202 °С, $[\alpha]_D^{20}$ – 206° (с 1, вода)) синтезирован в отделе химии НИИ фармакологии имени В. В. Закусова РАМН. Эмбриональная бычья сыворотка (FBS) получена в фирме “Gibco” (США). Гидробромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) — в фирме “Sigma-Aldrich Inc.” (США). Используются L-глутамин производства фирмы ICN, культуральная среда DMEM фирмы “Thermo Scientific” и 6-оксидофамин (6-OHDA) фирмы “Fluka”.

Животные. Опыты выполнены на мышцах-самцах линий C57BL/6, BALB/c и беспородных массой 25 – 29 г, полученных из питомника “Столбовая” РАМН. Животных содержали в виварии при свободном доступе к пище и воде и естественной смене светового режима. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 351.000.3-96 и 51000.4-96), приказу МЗ РФ №276 от 19.06.2003 г. Эксперименты проводили с 10 до 16 ч.

Антигипоксическая активность была изучена на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией (“баночная” гипоксия), согласно “Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ” [2]. Исследования проводили на животных одинаковой массы (разброс в

¹ ФГБУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

группах не более 2 г). Каждая группа состояла из 9 – 10 животных. ЦПГ вводили внутрибрюшинно в виде раствора в 0,9 % NaCl за 5, 15, 30 мин или 1 ч до начала эксперимента. Антигипоксическую активность ЦПГ изучали в дозах 0,1; 0,5; 1,0; 2,5 и 5 мг/кг внутрибрюшинно. Животные контрольной группы получали эквивалентный объем физиологического раствора. Далее животных помещали по одному в банки объемом 200 см³ и герметически закрывали. Гибель животного регистрировали по последнему агональному дыханию.

Нейропротекторная активность in vitro была изучена на клеточной модели повреждения дофаминергических нейронов нейротоксином 6-OHDA с использованием клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y.

Клетки линии SH-SY5Y рассеивали с плотностью 10 тыс. клеток в лунку в 96-луночные планшеты в среде DMEM, содержащей 15% FBS и 2мМ L-глутамин и инкубировали при 37 °С и 5 % CO₂ до образования монослоя. Для индукции 6-гидроксидофаминовой токсичности в культуральную среду вносили 6-OHDA в конечной концентрации 100 мкМ и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С в 5 % CO₂. После этого заменяли среду и культивировали в течение 24 ч в тех же условиях [21]. ЦПГ вносили за 24 ч до или сразу после повреждающего воздействия в диапазоне конечных концентраций от 10⁻⁵ до 10⁻⁸ М.

Для определения жизнеспособности клеток использовали МТТ-тест [18]. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Multiscan EX (“Thermo”) при длине волны 600 нм.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Данные представляли как среднее значение по группам. Для оценки статистически значимых различий между экспериментальными и контрольными группами животных использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Результаты МТТ-теста анализировали с

помощью *t*-критерия Стьюдента. Результаты оценивали как значимые при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении антигипоксической активности ЦПГ в диапазоне доз от 0,1 до 5 мг/кг в опытах на беспородных белых мышах на модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией установлен дозозависимый эффект. Продолжительность жизни животных в условиях гипоксии постепенно увеличивалась при повышении дозы от 0,1 до 1 мг/кг, достигая максимума в дозе 1 мг/кг, а при дальнейшем повышении дозы до 5 мг/кг уменьшалось. Статистически достоверный антигипоксический эффект ЦПГ выявлялся в дозах 0,5 и 1 мг/кг (таблица).

При исследовании латентного периода и продолжительности антигипоксического действия ЦПГ регистрацию эффекта осуществляли через различные интервалы времени (5, 15, 30 и 60 мин) после введения вещества в дозе 1 мг/кг. Установлено, что противогипоксический эффект выявляется уже через 5 мин после введения ЦПГ, усиливается через 15 мин и сохраняется на уровне достоверности через 30 и 60 мин после введения ЦПГ (рис. 1). Таким образом, ЦПГ обладает быстро наступающим и продолжительным антигипоксическим эффектом.

Пирацетам в дозах 300 и 600 мг/кг (внутрибрюшинно) не оказывал антигипоксического эффекта на модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией в опытах на беспородных белых мышах и только в дозе 900 мг/кг статистически достоверно увеличивал продолжительность жизни мышей в условиях гипоксии (таблица). Полученные данные согласуются с результатами других исследователей, согласно которым пирацетам проявляет антигипоксическую активность на модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией в дозе 1000 мг/кг и более [4].

Антигипоксическая активность ЦПГ и пирацетама при однократном внутрибрюшинном введении на модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией в опытах на мышах

Линия мышей/вещество	Доза, мг/кг	Время жизни, мин		Активность в % от контроля
		контроль	вещество	
Белые беспородные мыши/ЦПГ	0,1	20,89 ± 0,64	20,20 ± 0,77	97
	0,5	20,89 ± 0,64	24,00 ± 0,71*	115 [#]
	1	20,89 ± 0,64	25,00 ± 1,56**	120 ^{##}
	2,5	29,43 ± 3,61	29,86 ± 1,08	101
	5	29,43 ± 3,61	28,71 ± 1,19	98
Белые беспородные мыши/пирацетам	300	26,14 ± 2,29	24,11 ± 5,18	92
	600	25,56 ± 3,76	26,32 ± 2,83	102
	900	24,38 ± 2,17	28,52 ± 2,14	117 [#]
C57BL/6/ЦПГ	1	29,14 ± 1,33	28,00 ± 1,05	96
BALB/c/ЦПГ	1	28,14 ± 0,91	31,71 ± 0,80*	113 [#]

Примечание. Различия достоверны по U-критерию Манна-Уитни: * — с контролем при $p < 0,05$, ** — с контролем при $p < 0,01$; по критерию χ^2 : [#] — с контролем при $p < 0,05$, ^{##} — с контролем при $p < 0,01$.

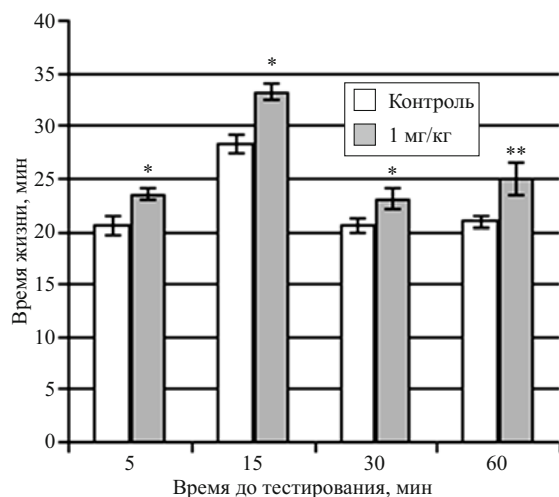


Рис. 1. Продолжительность антигипоксического действия ЦПГ (1 мг/кг) на модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией в опытах на беспородных мышах с регистрацией эффекта через различные интервалы после введения вещества.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ относительно контроля по U-критерию Манна-Уитни.

Таким образом, ЦПГ в опытах на беспородных белых мышах обладает выраженным антигипоксическим действием, что выражается в способности вещества увеличивать продолжительность жизни животных в условиях гипоксической гипоксии с гиперкапнией. По антигипоксической активности ЦПГ значительно (на 3 порядка доз) превосходит пирацетам. Полученные данные о сохранности в течение 1 ч антигипоксического эффекта ЦПГ после однократного введения свидетельствуют о его стабильности в условиях эксперимента *in vivo*, что соответствует представлениям об устойчивости циклических пептидов к действию протеолитических ферментов [11].

Ранее для пирацетама были установлены межлинейные различия в проявлении ноотропной активности, которая обнаруживалась на мышах линии BALB/c и отсутствовала на мышах линии C57BL/6 [13]. Не исключено, что это связано с различным содержанием эндогенного соединения, эффекты которого имитирует пирацетам, т.к. межлинейные различия были обнаружены и для ЦПГ при изучении его анксиолитической активности [10]. Активность была выявлена только на мышах линии BALB/c, но не у C57BL/6. В дальнейшем было показано, что содержание ЦПГ в мозге мышей линии C57BL/6 в 1,5 раза выше, чем у мышей BALB/c [10]. Поэтому антигипоксическое действие ЦПГ также изучено в фармакогенетическом эксперименте.

Исследование антигипоксической активности ЦПГ на мышах линий C57BL/6 и BALB/c было проведено при использовании вещества в дозе 1 мг/кг, т.е. в дозе, когда ЦПГ проявил максимальный эффект в опытах на беспородных мышах.

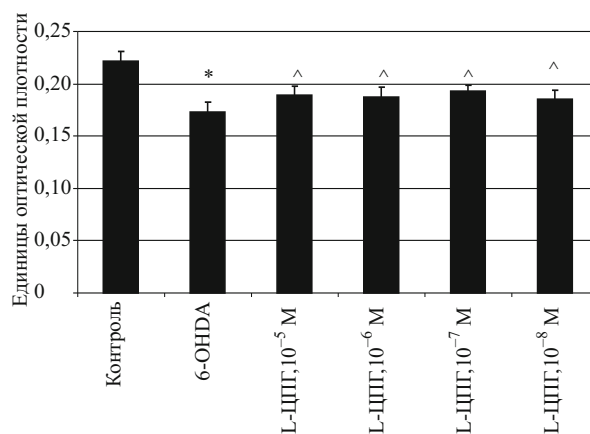


Рис. 2. Нейропротекторная активность ЦПГ, внесенного за 24 ч до 6-оксидофамина, на клетках SH-SY5Y (данные МТТ-теста).

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем, ^ $p < 0,05$ относительно 6-OHDA, *t*-критерий Стьюдента.

Установлено, что антигипоксический эффект ЦПГ проявляется только у мышей линии BALB/c с более низким содержанием эндогенного ЦПГ и не проявляется на мышах линии C57BL/6 (таблица).

Для пирацетама недавно была выявлена нейропротекторная активность на культуре клеток SH-SY5Y в условиях 6-оксидоаминовой нейротоксичности, которую препарат проявляет в миллимолярной концентрации [17]. В настоящем исследовании с целью выявления сходства в эффектах ЦПГ и пирацетама было изучено нейропротекторное действие ЦПГ на этой же модели. Эффект ЦПГ был изучен как при внесении ЦПГ за 24 ч до 6-оксидофамина, так и сразу после токсина.

Установлено, что ЦПГ при использовании всего диапазона концентраций (10^{-5} – 10^{-8} М) проявлял нейропротекторную активность, но только при внесении за 24 ч до токсина (рис. 2) и не оказывал эффекта при его использовании непосредственно после повреждения. Нейропротекторная активность ЦПГ несколько лет назад была показана и зарубежными исследователями *in vitro* и *in vivo* [14, 20].

Одним из ключевых компонентов механизма действия пирацетама является его способность оказывать положительное модулирующее влияние на AMPA-рецепторы [12], которое, как известно, приводит к усилению синтеза нейротрофинов, являющихся эндогенными нейропротекторными агентами [19]. В связи с этим наличие эффекта при внесении только за 24 ч можно объяснить, если предположить, что ЦПГ также осуществляет свой нейропротекторный эффект через положительную модуляцию AMPA-рецепторов с последующим синтезом нейротрофина, для проявления действия которого, связанного с синтезом белков *de novo*, требуется как раз интервал времени 18 – 24 ч [22].

Таким образом, выявленное в настоящем исследовании сходство в эффектах ЦПГ и пирацетама под-

тверждает высказанную нами ранее гипотезу о том, что ЦПГ представляет эндогенный прототип пиретама, или, другими словами, пиретам является миметиком эндогенного нейропептида цикло-пролилглицина.

ВЫВОДЫ

1. Цикло-пролилглицин (0,5 и 1 мг/кг) обладает выраженным дозозависимым антигипоксическим действием, что выражается в его способности увеличивать продолжительность жизни животных в условиях гипоксической гипоксии с гиперкапнией и значительно (на 3 порядка доз) превосходит по активности пиретам.

2. Антигипоксический эффект цикло-пролилглицина (1 мг/кг) является быстро наступающим (через 5 мин) и продолжительным (более 1 ч).

3. Антигипоксический эффект цикло-пролилглицина генетически зависим и выявляется на мышах линии BALB/c, но не на мышах линии C57BL/6.

4. Цикло-пролилглицин (10^{-5} – 10^{-8} М) проявляет нейропротекторную активность в опытах *in vitro* на модели 6-оксидоаминовой токсичности при его использовании за 24 ч до нейротоксина и не оказывает влияния при его введении после нейротоксина.

5. Выявленное сходство в антигипоксическом и нейропротекторном эффектах цикло-пролилглицина и пиретама подтверждает гипотезу о том, что цикло-пролилглицин является не только структурным, но и функциональным аналогом пиретама.

ЛИТЕРАТУРА

- И. П. Ашмарин, *Рос. физиол. журн.*, **87**(11), 1471 – 1476 (2001).
- Т. А. Воронина, Р. У. Островская, *Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Хабриев Р. У. (ред.) Москва (2005)*, сс. 308 – 320.

- Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **70**(4), 44 – 58 (2007).
- В. Г. Граник, Т. В. Головкин, Р. Г. Глушков и др., *Хим.-фарм. журн.*, **23**(10), 1186 – 1193 (1989).
- Т. А. Гудашева, Н. И. Василевич, Н. Н. Золотов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **25**(6), 12 – 16 (1991).
- Т. А. Гудашева, Р. У. Островская, С. С. Трофимов и др., *Бюл. экспер. биол.*, **116**(10), 411 – 413 (1999).
- Т. А. Гудашева, М. А. Константинопольский, Р. У. Островская и др., *Бюл. экспер. биол.*, **131**(5), 547 – 550 (2001).
- Т. А. Гудашева, *Вестн. РАМН*, № 7, 8 – 16 (2011).
- Р. У. Островская, Т. А. Гудашева, Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(5), 66 – 72 (2002).
- С. Б. Середенин, Т. А. Гудашева, С. С. Бойко и др., *Бюл. экспер. биол.*, **133**(4), 417 – 419 (2002).
- Х. Д. Якубке, Х. Ешкайт, *Аминокислоты, пептиды, белки*, Мир, Москва (1985).
- A. H. Ahmed, R. E. Oswald, *J. Med. Chem.*, **53**(5), 2197 – 2203 (2010).
- M. Ammassari-Teule, C. Castellano, *Neural Plasticity*, **11**(3 – 4), 205 – 216 (2004).
- M. T. García López, *El descubrimiento de nuevos fármacos en 2006*, Madrid (2007), 15 – 34.
- T. A. Gudasheva, T. A. Voronina, R. U. Ostrovskaya, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **31**(2), 151 – 157 (1996).
- T. A. Gudasheva, S. S. Boyko, V. Kh. Akparov, et al., *FEBS Letters*, **391**, 149 – 152 (1996).
- P. Goswami, S. Swarnkar, M. S. Harsoliya, et al., *Journal of Pharmacy Research*, **4**(6), 1716 – 1719 (2011).
- G. R. Jackson, K. Werrbach-Perez, E. L. Ezell, et al., *Brain Res.*, **592**(1 – 2), 239 – 248 (1992).
- H. Jourdi, Y.-T. Hsu, M. Zhou, et al., *J. Neurosci.*, **29**(27), 8688 – 8697 (2009).
- K. R. C. Prakash, Y. Tang, A. P. Kozikowski, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 3043 – 3048 (2002).
- K. Riveles, L. Z. Huang, M. Quik, *Neurotoxicology*, **29**(3), 421 – 427 (2008).
- R. Tabakman, H. Jiang, E. Schaefer, et al., *J. Mol. Neurosci.*, **22**(3), 237 – 250 (2004).
- S. B. Seredenin, T. A. Voronina, T. A. Gudasheva, et al., US Patent № 5 439 930 (1995).
- L. H. Tran, US Patent Appl. 2003 / 0109531 (2003).

Поступила 09.04.12

SIMILARITY OF CYCLOPROLYLGLYCINE TO PIRACETAM IN ANTIHYPOXIC AND NEUROPROTECTIVE EFFECTS

K. N. Kolyasnikova, T. A. Gudasheva, G. A. Nazarova, P. I. Antipov, S. V. Nikolaev, T. A. Antipova, T. A. Voronina, and S. B. Seredenin

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

The antihypoxic activity of the endogenous cyclic dipeptide cycloprolyl glycine (CPG) has been studied on a model of normobaric hypoxia with hypercapnia and its neuroprotective activity has been studied on a model of human neuroblastoma SH-SY5Y cell damage by 6-hydroxydopamine. It is established that CPG exhibits the antihypoxic activity at doses of 0.5 and 1.0 mg/kg (i.p.) on outbred and BALB/c mice, but not on C57BL/6 mice. The neuroprotective activity of CPG was detected in 10^{-5} – 10^{-8} M concentration range only when the treatment was carried out 24h before toxin introduction. The obtained data confirm the hypothesis that piracetam is a mimetic of the endogenous CPG neuropeptide.

Key words: Cycloprolyl glycine, piracetam, peptidomimetic, antihypoxic activity, neuroprotective activity