НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

К МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ НООПЕПТА: СНИЖЕНИЕ АКТИВНОСТИ СТРЕСС-ИНДУЦИРУЕМЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ И АКТИВАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ НЕЙРОТРОФИНОВ

Р. У. Островская[1], Ю. В. Вахитова[2], М. Х. Салимгареева[2], Р. С. Ямиданов[2], С. В. Садовников[2], И. Г. Капица[1], С. Б. Середенин[1]

Исследовали влияние оригинального дипептидного препарата ноопепт (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролинглицина, ГВС-111), сочетающего ноотропные и нейропротекторные свойства, на активность митоген-активируемых протеинкиназ и уровень экспрессии генов и белков нейротрофических факторов — NGF и BDNF во фронтальной коре, гиппокампе и гипоталамусе крыс. Показано, что ноопепт в условиях длительного введения (28 дней по 0,5 мг/кг/день внутрибрюшинно) снижает активность стресс-идуцируемых киназ SAPK/JNK 46/54 и pERK1/2 в гиппокампе крыс. Длительное введение ноопепта приводит к увеличению уровня мРНК гена BDNF в гипоталамусе и гиппокампе крыс. В гипоталамусе выявляется также некоторое увеличение содержания белкового продукта данного нейротрофического фактора. В свете представлений об активации стресс-индуцируемых киназ как важном факторе амилоидогенеза и отложения тау-белков в мозговой ткани и роли дефицита нейротрофических факторов в развитии нейродегенеративных процессов полученные данные о снижении уровня стресс-активируемых МАП-киназ и усилении экспрессии BDNF позволяют предположить у ноопепта наличие специфического эффекта в отношении патогенетических механизмов болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: ноопепт, митоген-активируемые протеинкиназы, ERK1/2, SAPK/JNK, пептидомиметики, нейротрофины, NGF, BDNF

ВВЕДЕНИЕ

Эффективный ноотропный и нейропротекторный препарат ноопепт создан в НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН на основании оригинального подхода, состоящего в дизайне дипептидов, имитирующих структуру непептидного нейротропного средства и активного фрагмента нейропептида с соответствующей нейротропной активностью [8]. Дизайн ноотропных дипептидов, основанный на структуре пирацетама и вазопрессина, привел к созданию серии ацилпролилсодержащих дипептидов [13]. Из этой серии соединений был отобран этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролинглицина (ГВС-111, ноопепт), обладающий ноотропной активностью в дозах, в 1000 раз меньших, чем дозы пирацетама, и превосходящий последний по спектру ноотропной и нейропротекторной активности, продемонстрированной в условиях целого организма и экспериментах *in vitro* [5]. Из механизмов ноотропного действия ноопепта в настоящее время можно считать установленными такие компоненты как способность образовывать циклопролилглицин — циклический дипептид, аналогичный эндогенному метаболиту с антиамнестическим эффектом [9] и усиливать холинергическую передачу [4]. В качестве механизмов нейропротекторного действия выявлены следующие: предотвращение избыточного накопления свободнорадикального кислорода, снижение высвобождения глутамата, блокада потенциал-зависимых кальциевых и калиевых каналов и противовоспалительный эффект [5].

Известно, что важным фактором выживаемости нейронов, подвергнутых различного рода повреждающим воздействиям, является активность суперсемейства митоген-активируемых внутриклеточных систем сигнальной трансдукции, МАП-киназ, к основным компонентам которого относятся стресс-активируемые протеинкиназы и c-Jun N-terminal протеинкиназы (SAPK/JNK), а также экстрацеллюлярные сигнал-регулируемые киназы (ERK) [7]. Важной мишенью действия ноотропов и нейропротекторов является также система нейротрофинов. Ее основные представители NGF и BDNF являются ключевыми факторами нормального функционирования зрелых нейронов. Их дефицит играет важнейшую роль в процессах дегенерации и гибели нервных клеток при различных патологических процессах [6].

[1] ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.
[2] Учреждение РАН Институт биохимии и генетики УфНЦ РАН, Уфа.

Данная работа является продолжением предыдущих исследований по уточнению механизма действия ноопепта. В ее задачи входило исследование его влияния на активность митоген-активируемых протеинкиназ, а также уровень экспрессии генов и белков нейротрофических факторов — NGF и BDNF.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на крысах-самцах Вистар массой 280 – 330 г, полученных из питомника Столбовая. При работе с животными авторы руководствовались Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных от 22.06 1998 (N 86-ФЗ). Эксперименты были поставлены на двух группах крыс (по 8 животных в каждой группе). Крысам контрольной группы в течение 28 дней вводили внутрибрюшинно физиологический раствор, а опытной — ноопепт (0,5 мг/кг в день, внутрибрюшинно). Крыс забивали декапитацией. Мозг препарировали на холоду, отделяли кору большого мозга, гиппокамп и гипоталамус, которые сразу помещали в жидкий азот. Выделение суммарных препаратов РНК, получение кДНК и количественную ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводили по методам, описанным ранее [1].

Выделение белков цитоплазмы проводили в экстрагирующем буфере, содержащем 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 1 мМ ДТТ, 1 мМ PMSF, 250 мМ сахарозы, 10 мМ ЭДТА, 3 % поливинилпирролидона, ингибиторы протеаз и фосфатаз (Protease Inhibitor Cocktail, Phosphatase Inhibitor Cocktail I, II, “Sigma”, США). Количество белка определяли спектрофотометрически по методу Брэдфорда. Электрофорез белков проводили в полиакриламидном геле (ПААГ) с 0,1 % ДДС-Na в линейном градиенте концентрации акриламида (6 – 16 %). Электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в буфере, содержащем 25 мМ трис, 192 мМ глицина, 20 % этанола. Гибридизацию с антителами проводили в соответствии с протоколами фирм-производителей (“Cell Signaling”; “Abcam”, США). Белки выявляли методом усиления хемилюминесценции с использованием набора Ummun-Star Chemiluminescent Protein Detection Systems (“BioRad”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из данных, представленных на рис. 1, ноопепт в условиях его длительного введения вызывает значительное снижение уровня фосфорилированных киназ SAPK/JNK 46/54 в гиппокампе крыс, тогда как в коре и гипоталамусе отмечается лишь незначительная тенденция к их понижению. Влияние ноопепта на уровень pERK1/2 имеет близкий характер: снижение уровня фосфорилированных ERK1/2 в гиппокампе при отсутствии влияния на этот показатель в коре и гипоталамусе. Таким образом, на фоне длительного введения ноопепта происходит выраженное снижение уровня эффекторных киназ МАП-зависимого сигнального каскада pSAPK/JNK 46/54 и pERK1/2 в гиппокампе и незначительное снижение уровня исследованных киназ в коре и гипоталамусе крыс.

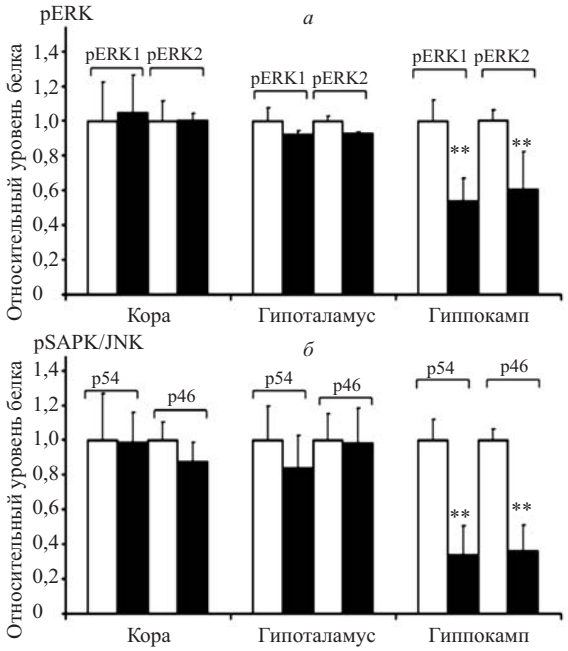

Рис. 1. Влияние ноопепта на уровень pERK1/2 (*а*) и pSAPK/JNK (*б*) в ткани гипоталамуса, гиппокампа и фронтальной коры крыс.

По оси ординат — относительный уровень соответствующих киназ (к контрольному, принятому за единицу). Светлые столбики — показатели для контрольной группы (физиологический раствор внутрибрюшинно в течение 28 дней), черные — опытная группа (животные, которым вводили ноопепт в дозе 0,5 мг/кг внутрибрюшинно в течение 28 дней). ** — $p < 0{,}005$ — отличие опытной группы от контрольной.

Анализ влияния ноопепта на уровень мРНК NGF и BDNF и содержание их белковых продуктов показал, что длительное введение ноопепта приводит к увеличению уровня мРНК гена BDNF в гипоталамусе и гиппокампе крыс (на 49 % и 124 % соответственно), тогда как в коре происходит некоторое снижение уровня мРНК этого гена (рис. 2). В гипоталамусе и гиппокампе выявляется также некоторое увеличение содержания белкового продукта данного нейротрофического фактора: в гипоталамусе оно составляет 70 % для NGF и 60 % для BDNF; в гиппокампе прирост уровня белка BDNF составляет лишь 15 %. При этом увеличение содержания белкового продукта NGF наблюдается только в гипоталамусе крыс.

Известно, что SAPK/JNK-зависимые протеинкиназы активируются в ответ на различные стрессовые воздействия, в частности, УФ облучение, оксидативный стресс, гипоксию, ишемию, действие провоспалительных цитокинов. Имеются многочисленные экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что усиление свободнорадикальных процессов в нейронах приводит к активации SAPK/JNK и p38-киназ, а специфические ингибиторы этих киназ предотвращают

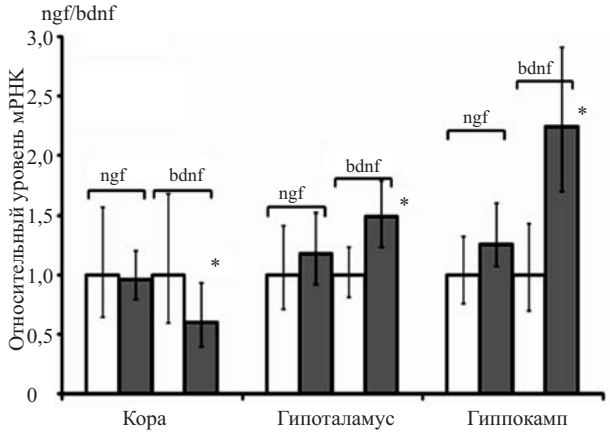

Рис. 2. Влияние ноопепта на экспрессию мРНК BDNF и NGF в гипоталамусе, гиппокампе и фронтальной коре крыс.

По оси ординат — относительный уровень мРНК (к контрольному, принятому за единицу). Светлые столбики — показатели для контрольной группы, темные — для опытной. * — $p < 0,05$ — отличие опытной группы от контрольной.

гибель клеток в условиях окислительного стресса [7]. Усиление активности стресс-индуцируемых киназ ведет к усилению амилоидогенеза и отложения tau-белка [14]. Полученные нами данные позволяют предположить, что ингибирующее влияние ноопепта на SAPK/JNK-киназы может рассматриваться как важный механизм его нейропротекторного действия.

Наши исследования выявили определенную "регионарную" специфичность действия ноопепта в отношении нейротрофических факторов. Препарат оказывает выраженное влияние на экспрессию нейротрофических факторов в гипоталамусе, поскольку увеличивает NGF и BDNF на уровне как мРНК, так и белка. В свете положения, сформулированного Т. А. Гудашевой о том, что дипептиды, содержащие пироглутамат либо ацил-пролин, представляют собой структурно-конформационные аналоги метаболита вазопрессина АВП 4 – 5 [9], можно предположить, что повышение уровня мРНК генов NGF и BDNF и соответствующих белков в гипоталамусе крыс является следствием высокой тропности ноопепта к рецепторам вазопрессина, локализованным в гипоталамусе. Известно, что АВП, синтезирующийся нейронами супрахиазматического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса, облегчает обучаемость и память, а его основной метаболит $АВП_{4-9}$, также обладающий мнемотропным эффектом, усиливает экспрессию нейротрофинов NGF и BDNF [15]. Аналогичное действие для pGlu-Asn-NH2, соответствующего N-концевому фрагменту основного метаболита вазопрессина [3].

Следует подчеркнуть, что влияние ноопепта на активность BDNF и NGF проявлялось также и в отношении гиппокампа. В свете известных представлений о ключевой роли гиппокампа в контроле когнитивных функций и о том, что дефицит нейротрофических факторов именно в гиппокампе играет ведущую роль в развитии когнитивной недостаточности [12], можно полагать, что повышение под влиянием ноопепта экспрессии нейротрофических факторов в гиппокампе является одним из механизмов его позитивного мнемотропного действия.

В целом полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что ноопепт в условиях его повторного введения снижает активность стресс-индуцируемых МАП-киназ и повышает экспрессию нейротрофинов в гипоталамусе и гиппокампе. Такая совокупность эффектов может участвовать в реализации ноотропного и нейропротекторного действия ноопепта при любого рода повреждениях мозга — травме, ишемии, интоксикациях. Но особый интерес эти свойства ноопепта могут представлять с точки зрения профилактики нейродегенеративных заболеваний, поскольку имеются убедительные доказательства вовлеченности JNK/SAPK- и ERK-зависимых сигнальных путей и нейротрофических факторов в регуляцию клеточных процессов при болезни Альцгеймера (БА) [7, 10].

В настоящее время сформировалось представление о мягком когнитивном нарушении (МКН), как промежуточной стадии между нормальным старением и начальной фазой болезни Альцгеймера [12]. Известно, что уже на этапе МКН в мозговой ткани имеет место развитие целого ряда патоморфологических изменений, выраженность которых нарастает по мере прогрессирования МКН и перехода в развитую болезнь Альцгеймера (таблица).

Действие ноопепта потенциально адресовано ко всем этим изменениям. Снижая активность стресс-индуцируемых киназ, препарат может замедлять отложе-

Континуум патологических изменений при переходе нормального старения в мягкие когнитивные нарушения и начальные фазы спорадической болезни Альцгеймера (модифицировано из статьи [12])

Признаки	Старение	МКН	Начальная стадия БА
Нейрофибриллярные клубочки в энториальной коре и гиппокампе	+ до ++	+++	++++
Амилоидные бляшки	Нет или очень мало	Немного в височной коре и гиппокампе	Много бляшек в височно-теменной и лобной коре, гиппокампе
Дефицит ацетилхолина	Незначительный в гиппокампе	Значительный в гиппокампе	Резко выраженный в гиппокампе и коре (височно-теменная и лобная доли)
Дефицит NGF, BDNF в гиппокампе и коре	Нет	Начальный	Выраженный

ние амидоида и тау-протеинов; этому способствует и описанное нами ранее усиление выработки антител к агрегированым амилоидам [11]. Проявляя холино-позитивное действие и стимулируя экспрессию нейротрофических факторов, ноопепт ослабляет характерные для БА проявления холинергического дефицита и сопряженного с ним дефицита нейротрофических факторов. Полученные результаты позволяют заключить, что эту дипептидную молекулу следует рассматривать как препарат с множественными мишенями. Низкая токсичность ноопепта, обусловленная способностью метаболизироваться до эндогенных веществ (циклопролилглицин, фенилуксусная кислота), и биодоступность per os делают возможным его длительное превентивное применение. Предварительное клиническое исследование ноопепта, выполненное в НЦПЗ РАМН [2], выявило его эффективность у пациентов с генотипом ApoE4+, относящихся к группе высокого риска по развитию болезни Альцгеймера. Полученные в настоящей работе данные являются аргументом в пользу дальнейшего исследования эффекта превентивного применения этого дипептида с целью предотвращения перехода мягких когнитивных нарушений в болезнь Альцгеймера.

ВЫВОДЫ

1. Нейропротекторный дипептид ноопепт в условиях длительного введения снижает активность стресс-идуцируемых киназ SAPK/JNK 46/54 и pERK1/2 в гиппокампе крыс, тогда как в коре и гипоталамусе отмечается незначительная тенденция к их понижению.

2. Длительное введение ноопепта приводит к увеличению уровня мРНК гена BDNF в гипоталамусе и гиппокампе крыс. В гипоталамусе и гиппокампе выявляется также некоторое увеличение содержания белкового продукта данного нейротрофического фактора.

Работа поддержана Программой РАН “Мозг: фундаментальные и прикладные проблемы”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. В. Вахитова, Р. С. Ямиданов, В. А. Вахитов, С. Б. Середенин, *Молекуляр. биология*, **39**(2), 276 – 285 (2005).
2. С. И. Гаврилова, И. В. Колыхалов, Я. Б. Фёдорова и др., *Современная терапия психических расстройств*, № 1, 27 – 32 (2008).
3. Т. А. Зенина, Т. А. Гудашева, Я. С. Букреев, С. Б. Середенин, *Бюл. экспер. биол.*, **144**, 424 – 426 (2007).
4. Р. У. Островская, Т. Х. Мирзоев, Ф. А. Фирова и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(2), 11 – 14 (2001).
5. Р. У. Островская, Т. А. Гудашева, Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(5), 66 – 72 (2002).
6. E. Castrén, *Mol Neurobiol.*, **29**(3), 289 – 302 (2004).
7. A. Colombo, A. Bastone, C. Ploia, et al., *Neurobiol Dis.*, **33**(3), 518 – 25 (2009).
8. T. A. Gudasheva, T. A. Voronina, R. U. Ostrovskaya, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **31**(2), 151 – 157 (1996).
9. T. A. Gudasheva, S. S. Bojko, V. Ch. Akparov, et al., *FEBS lett.*, **391**, 149 – 151 (1996).
10. F. M. Longo and S. M. Massa, *J. Alzheimers Dis*, **6**, 13 – 17(2004).
11. R. U. Ostrovskaya, M. A. Gruden, N. A. Bobkova, et al., *J. of Psychopharmacol.*, **21**, 611 – 619 (2007).
12. R. Peterson, R. Doody, A. Kurz, et al., *Arch. Neurol.*, **58**, 1985 – 1992 (2001).
13. S. B. Seredenin, T. A. Voronina, T. A. Gudasheva, et al., *US patent*, № 5.439.930 (1995).
14. C. Shen, Y. Chen, H. Liu, et al., *J. Biol. Chem.*, **283**(25), 17721 – 30 (2008).
15. A. W. Zhou, W. X. Li, J. Guo, Y. C. Du, *Peptides*, **18**(8), 1179 – 87 (1997).

Поступила 15.04.10

ON THE MECHANISM OF NOOPEPT ACTION: DECREASE IN ACTIVITY OF STRESS-INDUCED KINASES AND INCREASE IN EXPRESSION OF NEUTROPHINES

R. U. Ostrovskaya[1], Yu. V. Vakhitova[2], M. Kh. Salimgareeva[2], R. S. Yamidanov[2], S. V. Sadovnikov[2], I. G. Kapitsa[1], and S. B. Seredenin'

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

[2] Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, prosp. Oktyabrya 69, Ufa, Bashkortostan, 450054 Russia

The influence of noopept (N-phenylacetyl-*L*-prolylglycine ethyl ester, GVS-111) – a drug combining the nootrope and neuroprotector properties – on the activity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and the level of NGF and BDNF gene and protein expression in the frontal cortex, hippocampus, and hypothalamus has been studied in rats. Under conditions of chronic administration (28 days, 0.5 mg/day, i.p.), noopept decreased the activity of stress-induced kinases (SAPK/JNK 46/54 and pERK1/2) in rat hippocampus and increases the level of mRNA of the BDNF gene in both hypothalamus and hippocampus. The content of BDNF protein in the hypothalamus was also somewhat increased. In the context of notions about the activation of stress-induced kinases, as an important factor of amyloidogenesis and tau-protein deposition in brain tissue, and the role of deficiency of the neurotrophic factors in the development of neurodegenerative processes, the observed decrease in the activity of stress-activated MAPKs and increased expression of BDNF as a result of noopept administration suggest that this drug has a specific activity with respect to some pathogenetic mechanisms involved in the Alzheimer disease.

Key words: Noopept, mitogen-activated protein kinases, ERK1/2, SAPK/JNK, peptidomimetics, neurotrophins, NGF, BDNF