

## ИЗУЧЕНИЕ ВОВЛЕЧЕННОСТИ АМРА-РЕЦЕПТОРОВ В АНТИГИПОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕЙРОПЕПТИДА ЦИКЛО-ПРОЛИЛГЛИЦИНА

**К.Н. Колясникова**

к.б.н., ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (Москва)

**А.Г. Аляева**

мл. науч. сотрудник, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (Москва)

**О.Н. Воронцова**

к.б.н., ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (Москва)

**Т.А. Гудашева**

д.б.н., профессор, член-корр. РАН,

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (Москва)

E-mail: tata-sosnovka@mail.ru

**Актуальность.** Цикло-пролилглицин (ЦПГ) сконструирован и синтезирован в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова в качестве топологического аналога ноотропа пирацетама и позже открыт как эндогенное соединение в мозге крыс. Он обладает спектром фармакологической активности, характерной для пирацетама, включая антигипоксическую. Однако однозначных данных о механизме действия этого нейропептида до сих пор нет. Поэтому выяснение механизма действия ЦПГ является актуальным.

**Цель работы.** Выявить вовлеченность АМРА-рецепторов в антигипоксическое действие нейропептида ЦПГ.

**Материал и методы.** Использован метод ингибиторного фармакологического анализа с применением селективного антагониста АМРА-рецепторов соединения DNQX. Антигипоксическую активность оценивали на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией на мышах линии BALB/c.

**Результаты.** Антигипоксический эффект ЦПГ в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно полностью снимался специфическим блокатором АМРА-рецепторов соединением DNQX в дозе 10 мг/кг внутрибрюшинно.

**Выводы.** Впервые показано, что АМРА-рецепторы вовлечены в антигипоксический эффект нейропептида цикло-пролилглицина.

**Ключевые слова:** цикло-пролилглицин, антигипоксическая активность, АМРА, DNQX.

**Для цитирования:** Колясникова К.Н., Аляева А.Г., Воронцова О.Н., Гудашева Т.А. Изучение вовлеченности АМРА-рецепторов в антигипоксическое действие нейропептида цикло-пролилглицина. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020; 23(9):42–45. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-09-06>

На основании оригинальной гипотезы о пептидергическом механизме действия классического ноотропа пирацетама (N-карбамидометилпиirroлидона-2) в 1989 г. в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова был сконструирован и синтезирован его дипептидный топологический аналог цикло-пролилглицин (ЦПГ), у которого обнаружена ноотропная активность [1]. В 1996 г. ЦПГ был идентифицирован в мозге крыс как эндогенное соединение в микромолярной концентрации [2]. Кроме ноотропной, у ЦПГ выявлены и другие характерные для пирацетама виды фармакологической активности (анксиолитическая [3] нейропротекторная [4], антигипоксическая [5] и пр.) в интервале концентраций 0,1–1,0 мг/кг при системном введении.

Новозеландские исследователи показали, что ЦПГ *in vivo* образуется при процессинге инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) из его N-концевого трипептида GPE [4] и определяется в плазме крови и молоке млекопитающих [6]. Гуан и сотр., развивая IGF-1-ергический механизм действия ЦПГ, установили, что ЦПГ регулирует гомеостаз функции IGF-1, а соотношение ЦПГ/IGF-1 определяет биоактивность IGF-1 *in vitro* и *in vivo* [4], а также показали способность ЦПГ регулировать концентрацию активного несвязанного IGF-1 через обратимое связывание с IGF-1-связывающим белком IGFBP-3 [4].

В экспериментах *in vitro* обнаружено, что ЦПГ является положительным модулятором глутаматных АМРА-рецепторов [7]; и подобно дру-

гим ампакинам, он усиливает синтез нейротрофина BDNF [8], который является ключевой молекулой нейропластичности и процессов обучения и памяти. Испанские ученые в 2019 г. показали, что ЦПГ защищает нейроны гиппокампа от  $\beta$ -амилоидной токсичности, что сопряжено с увеличением уровня мРНК BDNF и активацией ERK сигнального пути [9].

**Ц е л ь р а б о т ы** – выявление вовлеченности AMPA-рецепторов в антигипоксическое действие ЦПГ методом ингибиторного фармакологического анализа с применением селективного антагониста AMPA-рецепторов соединения DNQX [10].

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Вещества.** Цикло-пролилглицин синтезирован в отделе химии НИИ фармакологии им. В.В. Закусова (т.пл. 204–207 °С,  $[\alpha]_{D}^{20}$  -202° (с 1, вода), ПМР спектр (DMCO-d<sub>6</sub> + CF<sub>3</sub>COOD),  $\delta$ , м.д.: 1,8–2,2 (4H, м, C <sup>$\gamma$</sup> H<sub>2</sub>(Pro), C <sup>$\beta$</sup> H<sub>2</sub>(Pro)), 3,37 (2H, м, C <sup>$\delta$</sup> H<sub>2</sub>(Pro)), 3,54 и 4,0 (2H, 2 д, C <sup>$\alpha$</sup> H<sub>2</sub>(Gly)), 4,11 (1H, д.д., C <sup>$\alpha$</sup> H(Pro)), 8,09 (1H, уш с, NH)). Соединение DNQX (6,7-динитрохиноксалин-2,3(1H, 4H)-дион) получено из «Sigma-Aldrich» (США); DMCO «х.ч.» – из ТД «Химмед» (Россия); вода с сопротивлением 19 МОм – на установке Милли-Q («Миллипор», США).

**Животные.** Исследование выполнено на мышах-самцах линии BALB/c массой 20–24 г, полученных из ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА», филиал «Столбовая». Животных содержали по 5 особей в клетке в условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени

В.В. Закусова» при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному гранулированному корму (ГОСТ Р 50258-92) и воде в течение 7 суток до начала тестирования, согласно приказу МЗ РФ № 199н от 23.08.2010 «Об учреждении Правил лабораторной практики». Все эксперименты с животными выполняли в соответствии с международными правилами (European Communities Council Directive of November 24,1986 (86/609/ЕЕС)), а также с «Правилами работы с животными», утвержденными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Хендлинг осуществляли дважды в неделю (совместно с чисткой). Эксперименты проводили с 10 до 16 ч.

**Антигипоксическая активность** исследована на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией («баночная» гипоксия), согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [11]. Нормобарическая гипоксия развивается в результате постепенного увеличения содержания углекислого газа в воздухе за счет дыхания (гипоксия с гиперкапнией в гермообъеме). Ингибитор DNQX растворяли в 1%-ном DMCO и вводили внутривентриально (в/б) в дозе 10 мг/кг [10]. Циклопролилглицин вводили в дозе 1 мг/кг в/б [5] в виде раствора в дистиллированной воде через 15 мин после DNQX. Далее через 1 ч животных помещали по одному в герметически закрытые сосуды вместимостью 250 мл (высота 10 см, диаметр 5,8 см) и фиксировали наступление смерти по времени последнего агонального вдоха. Все животные были рандомизированы по массе и разделены на 4 группы: контроль (DMCO + вода), 8 животных; группа DNQX (DNQX + вода), 10 животных; группа ЦПГ (DMCO + ЦПГ), 10 животных; группа DNQX и ЦПГ (DNQX + ЦПГ), 11 животных. Животные контрольной группы получали эквивалентный объем раствора 1%-ного DMCO и воды. Схема эксперимента представлена на рис. 1.

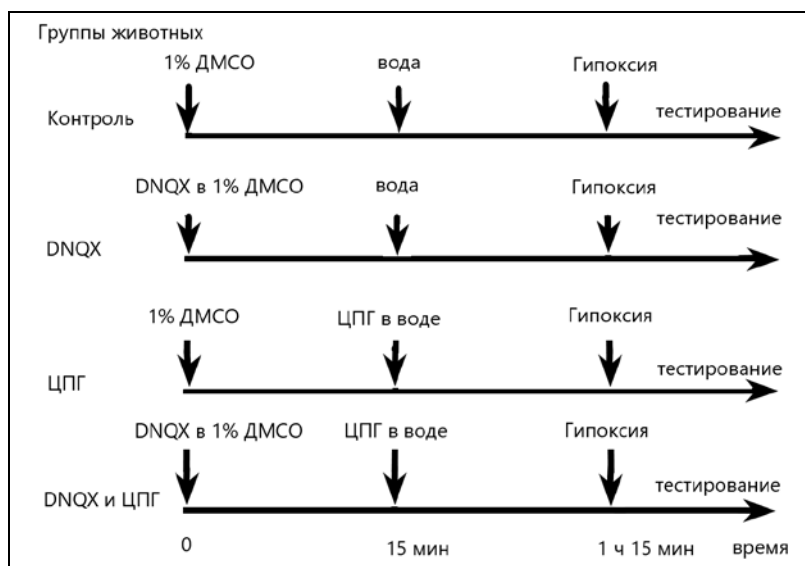


Рис. 1. Схема эксперимента

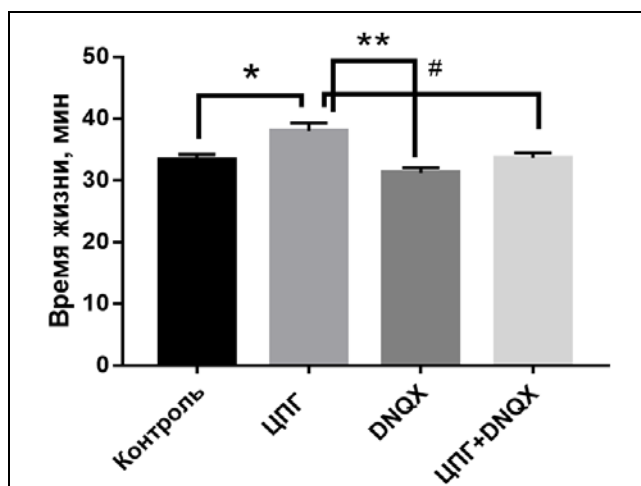
рандомизированы по массе и разделены на 4 группы: контроль (DMCO + вода), 8 животных; группа DNQX (DNQX + вода), 10 животных; группа ЦПГ (DMCO + ЦПГ), 10 животных; группа DNQX и ЦПГ (DNQX + ЦПГ), 11 животных. Животные контрольной группы получали эквивалентный объем раствора 1%-ного DMCO и воды. Схема эксперимента представлена на рис. 1.

**Статистический анализ.** Межгрупповые различия оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим использованием критерия Тьюки для множественных сравнений. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее авторами было показано, что антигипоксический эффект ЦПГ является генетически зависимым. Он проявляется на мышах линии BALB/c с низким содержанием эндогенного ЦПГ и не проявляется у мышей линии C57Black/6 с более высоким содержанием циклопептида [5]. Поэтому эксперименты проводили на мышах BALB/c. Нейропептид ЦПГ в дозе 1 мг/кг в/б, выбранной на основании ранее проведенных экспериментов [6], достоверно ( $p = 0,01$ ) увеличивал продолжительность жизни мышей в условиях гипоксии с  $33,4 \pm 0,8$  до  $38,0 \pm 1,3$  мин. Антагонист AMPA-рецепторов DNQX на время жизни мышей в условиях гипоксии не влиял: различие между контрольной группой ( $33,4 \pm 0,8$ ) и группой с DNQX ( $31,2 \pm 0,8$ ) было недостоверным. Введение 10 мг/кг DNQX за 15 мин до ЦПГ в дозе 1 мг/кг привело к полному исчезновению антигипоксического эффекта ЦПГ: время жизни животных в опыте (33,6 мин) не отличалось от времени жизни (33,4 мин) в контроле (рис. 2).

Ранее [9] было показано, что ЦПГ в физиологической концентрации достоверно усиливает трансмембранные токи AMPA клеток Пуркинью мозжечка крыс. Этот факт позволил предположить, что ЦПГ является эндогенным положительным модулятором AMPA-рецепторов. Полученные в данном исследовании результаты свидетельствуют в пользу данного предположения.



**Рис. 1.** Влияние антагониста глутаматных AMPA-рецепторов DNQX (10 мг/кг в/б) на антигипоксическое действие ЦПГ в дозе 1 мг/кг в/б на модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией на мышах линии BALB/c; \* –  $p=0,01$  по сравнению с группой Контроль; # –  $p=0,01$  по сравнению с группой ЦПГ; \*\* –  $p<0,001$  по сравнению с группой ЦПГ

## ВЫВОДЫ

На модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией на мышах показано, что антигипоксический эффект цикло-пролилглицина полностью снимается блокатором AMPA-рецепторов. Этот факт позволяет заключить, что антигипоксическое действие ЦПГ опосредовано AMPA-рецепторами.

*Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант 20-015-00102 «Выявление роли глутаматергического и BDNF-ергического механизмов в фармакологических эффектах нейропептида цикло-пролилглицина».*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гудашева Т.А., Островская Р.У., Максимова Ф.В., Чупин А.В., Трофимов С.С., Лезина В.П., Воронина Т.А., Сколдинов А.П. Топологические аналоги пирacetama на основе пролина и их ноотропная активность. Химико-фармацевтический журнал. 1989; 23(3): 276–281.
2. Gudasheva T.A., Boyko S.S., Akparov V.Kh., Ostrovskaya R.U., Skoldinov A.P., Rozantsev G.G., Voronina T.A., Zherdev V.P., Seredenin S.B. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain. FEBS Letters. 1996; 391: 149–152.
3. Гудашева Т.А., Константинопольский М.А., Островская Р.У., Середенин С.Б. Анксиолитическая активность эндогенного ноотропа цикло-пролилглицина в тесте приподнятого крестообразного лабиринта стереоселективна. Бюл. exper. биол. мед. 2001; 131(5): 547–550.
4. Guan J., Gluckman P., Yang P. et al. Cyclic glycine-proline regulates IGF-1 homeostasis by altering the binding of IGFBP-3 to IGF-1. Scientific reports. 2014. 4: 4388.
5. Колясникова К.Н., Гудашева Т.А., Назарова Г.А. и др. Сходство цикло-пролилглицина с пирacetамом по антигипоксическому и нейропротекторному эффектам. Экспер. клин. фармакол. 2012; 75(9): 3–6.
6. Guan J., Singh-Mallah G., Liu K. et al. The role for cyclic Glycine-Proline, a biological regulator of insulin-like growth factor-1 in pregnancy-related obesity and weight changes // J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 2018;32(3):465–478.
7. Гудашева Т.А., Григорьев В.В., Колясникова К.Н., Замойский В.Л., Середенин С.Б. Нейропептид цикло-пролилглицин является эндогенным положительным модулятором AMPA-рецепторов. Доклады Академии наук. 2016; 471(1):106–108.
8. Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Нейропептид циклопролилглицин увеличивает содержание мозгового нейротрофического фактора в нейрональных клетках. Доклады Академии наук. 2016; 469(4): 492–495.
9. Aguado-Llera D., Canelles S., Fernandez-Mendivil C. et al. Improvement in inflammation is associated with the protective effect of Gly-Pro-Glu and cycloprolylglycine against A $\beta$ -induced depletion of the hippocampal somatostatinergic system. Neuropharmacology. 2019. 151. 112–126.
10. Rial D., Takahashi R.N., Morato G.S. Aniracetam and DNQX affect the acquisition of rapid tolerance to ethanol in mice. Pharmacol Biochem Behav. 2009; 92(1): 32–38. DOI: 10.1016/j.pbb.2008.10.006.

11. Воронина, Т.А. Островская Р.У., Гарибова Т.Л. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия. В кн. Руководство по проведению доклинических исследо-

ваний лекарственных средств. Под общ. ред. А.Н. Мирнова. Часть 1, М.: Гриф и К, 2012; с. 276–296.

Поступила 15 мая 2020 г.

## STUDY OF THE INVOLVEMENT OF AMPA RECEPTORS IN THE ANTIHYPOXIC EFFECT OF THE NEUROPEPTIDE CYCLO-PROLYL-GLYCINE

© Authors, 2020

**K.N. Koliashnikova**

Ph.D. (Biol.), FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology» (Moscow)

**A.G. Alyaeva**

Junior Research Scientist, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology» (Moscow)

**O.N. Vorontsova**

Ph.D. (Biol.), FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology» (Moscow)

**T.A. Gudasheva**

Dr.Sc. (Biol.), Professor, Corr. Member RAS, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology» (Moscow)

E-mail: tata-sosnovka@mail.ru

**Relevance.** Cyclo-prolyl-glycine (CPG) was designed and synthesized at the Zakusov Research Institute of Pharmacology as a topological analogue of the nootropic drug piracetam and was later discovered as an endogenous compound in the rat brain. It had a spectrum of pharmacological characteristics of piracetam, including antihypoxic activity. However, there is still no evident data of the mechanism of action of this neuropeptide. Therefore, clarification of the mechanism of action of CPG is relevant.

**Objective.** Purpose of the study is to reveal the involvement of AMPA receptors in the antihypoxic effect of the neuropeptide CPG.

**Material and methods.** The method of inhibitory pharmacological analysis using a selective antagonist of AMPA receptors of the compound DNQX was used. Antihypoxic activity was evaluated on a normobaric hypoxia model with hypercapnia in BALB/c mice.

**Results.** The antihypoxic effect of CPG at the dose of 1 mg/kg intraperitoneally was completely removed by a specific blocker of AMPA receptors, compound DNQX, at the dose of 10 mg/kg intraperitoneally.

**Conclusions.** For the first time it was shown that AMPA receptors are involved in the antihypoxic effect of the neuropeptide cyclo-prolyl-glycine.

**Key words:** *cyclo-prolyl-glycine, antihypoxic activity, AMPA, DNQX.*

**For citation:** Koliashnikova K.N., Alyaeva A.G., Vorontsova O.N., Gudasheva T.A. Study of the involvement of AMPA receptors in the antihypoxic effect of the neuropeptide cyclo-prolyl-glycine. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020; 23(9): 42–45. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-09-06>

### REFERENCES

- Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U., Maksimova F.V., Chuppin A.V., Trofimov S.S., Lezina V.P., Voronina T.A., Skoldinov A.P. Topologicheskie analogi piracetama na osnove prolina i ih nootropnaya aktivnost'. Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 1989; 23(3): 276–281.
- Gudasheva T.A., Boyko S.S., Akparov V.Kh., Ostrovskaya R.U., Skoldinov A.P., Rozantsev G.G., Voronina T.A., Zherdev V.P., Seredenin S.B. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain. FEBS Letters. 1996; 391: 149–152.
- Gudasheva T.A., Konstantinopol'skij M.A., Ostrovskaya R.U., Seredenin S.B. Anksioliticheskaya aktivnost' endogennogo nootropa ciklo-prolilglicina v teste pripodnyatogo krestobraznogo labirinta stereoselektivna. Byul. eksper. biol. med. 2001; 131(5): 547–550.
- Guan J., Gluckman P., Yang P., et al. Cyclic glycine-proline regulates IGF-1 homeostasis by altering the binding of IGFBP-3 to IGF-1. Scientific reports. 2014. 4: 4388.
- Kolyashnikova K.N., Gudasheva T.A., Nazarova G.A. i dr. Skhodstvo ciklo-prolilglicina s piracetamom po antigipoksicheskomu i nejroprotektornomu efektam. Eksp. klin. farmakol. 2012; 75(9): 3–6.
- Guan J., Singh-Mallah G., Liu K., et al. The role for cyclic Glycine-Proline, a biological regulator of insulin-like growth factor-1 in pregnancy-related obesity and weight changes. J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 2018; 32(3): 465–478.
- Gudasheva T.A., Grigor'ev V.V., Kolyashnikova K.N., Zamojskij V.L., Seredenin S.B. Neuropeptid ciklo-prolilglicin yavlyaetsya endogennym polozhitel'nyim modulyatorom AMRA-receptorov. Doklady Akademii nauk. 2016; 471(1): 106–108.
- Gudasheva T.A., Kolyashnikova K.N., Antipova T.A., Seredenin S.B. Neuropeptid cikloprolilglicin uvelichivaet sodержание mozgovogo nejrotroficheskogo faktora v nejronal'nykh kletkah. Doklady Akademii nauk. 2016; 469(4): 492–495.
- Aguado-Llera D., Canelles S., Fernandez-Mendivil C., et al. Improvement in inflammation is associated with the protective effect of Gly-Pro-Glu and cycloprolylglycine against A $\beta$ -induced depletion of the hippocampal somatostatinergic system. Neuropharmacology. 2019. 151. 112–126.
- Rial D., Takahashi R.N., Morato G.S. Aniracetam and DNQX affect the acquisition of rapid tolerance to ethanol in mice. Pharmacol Biochem Behav. 2009; 92(1): 32–38. DOI: 10.1016/j.pbb.2008.10.006.
- Voronina, T.A. Ostrovskaya R.U., Garibova T.L. Metodicheskie rekomendacii po doklinicheskomu izucheniyu lekarstvennykh sredstv s nootropnym tipom dejstviya. V kn. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv. Pod obsch. red. A.N. Mironova. Chast' 1, M.: Grif i K, 2012; s. 276–296.