

Нейропротекторные свойства *in vitro* новых глипролинов, замещённых по N-концу

Николаев С. В., Логвинов И. О., Колясникова К. Н.,
Кузнецова Е. А., Антипов П. И., Антипова Т. А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Аннотация. В работе была исследована нейропротекторная активность аналогов замещённого глипролина ГЗК-111 по N-концу *in vitro*. Окислительный стресс, вызванный H₂O₂ (1,5 мМ) приводил к достоверному снижению жизнеспособности гиппокампальных клеток линии HT-22. Этиловый эфир N-фенилпропионил-глицил-L-пролина (ГЗК-45) защищал клетки от гибели при внесении как за 24 часа до, так и сразу после повреждения в концентрации 10⁻⁵–10⁻⁶М. Соединения с ацетильным (ГЗК-49) и капроноильным (ГЗК-46) остатками по N-концу не обладали защитным действием ни в одной из схем эксперимента. ГЗК-45 также был эффективен на модели индуцированного 6-гидроксидофамином повреждения клеток нейроblastомы человека линии SH-SY5Y.

Ключевые слова: цикло-L-пролилглицин; окислительный стресс; 6-гидроксидофамин; HT-22; SH-SY5Y; ГЗК-45; ГЗК-46; ГЗК-49

Для цитирования:

Николаев С.В., Логвинов И.О., Колясникова К.Н., Кузнецова Е.А., Антипов П.И., Антипова Т.А. Нейропротекторные свойства *in vitro* новых глипролинов, замещённых по N-концу // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2020. – № 2. – С. 4–10. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-2-4-10

The *in vitro* neuroprotective activity of analogues of N-terminus substituted glyprolines

Nikolaev SV, Logvinov IO, Koliashnikova KN, Kuznetsova EA, Antipov PI, Antipova TA
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. In this work investigated the neuroprotective activity of analogues of substituted glyproline GZK-111 at the N-terminus *in vitro*. Oxidative stress caused by H₂O₂ (1.5 mM) led to significant decrease in the hippocampal cells HT-22 viability. The ethyl ester N-phenylpropionyl-glycyl-proline (GZK-45) was effective at the concentrations up to 10⁻⁶M in both experimental schemes. The compounds with N-acetyl (GZK-49) and N-capronoyl (GZK-46) fragments did not protective effect in both experimental schemes. GZK-45 also had protective effect in the 6-hydroxydopamine induced damage of SH-SY5Y neuroblastoma cells.

Keywords: cyclo-L-prolylglycine; oxydative stress; 6-hydroxydopamine; HT-22; SH-SY5Y; GZK-45; GZK-46; GZK-49

For citations:

Nikolaev SV, Logvinov IO, Koliashnikova KN, Kuznetsova EA, Antipov PI, Antipova TA. The *in vitro* neuroprotective activity of analogues of N-terminus substituted glyprolines. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2020;(2):4–10. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-2-4-10

Введение

В 1996 г. в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова был открыт эндогенный пептид циклопролилглицин (ЦПГ) [1], у которого были выявлены ноотропные [2], анксиолитические [3], антигипоксические [4] и нейропротекторные свойства [5]. Было показано, что ЦПГ по структуре и фармакологической активности подобен пирacetаму [2–5]. Недавно было обнаружено, что ЦПГ аналогично пирacetаму оказывает положительное модулирующее действие на глутаматные AMPA-рецепторы [6] и усиливает синтез нейротрофина BDNF [7].

Нами был сконструирован линейный замещённый глипролин ГЗК-111, этиловый эфир N-фенилацетил-глицил-L-пролина, химическая структура которого предполагает возможность превращения его в ЦПГ в биологических средах. Действительно, ГЗК-111 *in vitro* в плазме крови крысы превращается в ЦПГ и проявляет весь спектр фармакологической активности, характерный для последнего [8, 9]. Ранее нами с целью изучения связи структуры и активности был синтезирован ряд аналогов ГЗК-111 с замещением по C-концу (амид, метиламид,

кислота) и показано, что нейрорепродуктивное действие проявляет только амид (соединение ГЗК-113), что, вероятно, связано с предполагаемой способностью этого соединения, как и ГЗК-111 (эфир), метаболизироваться с образованием ЦПГ [9].

Для дальнейшего выявления зависимости «структура–действие» в ряду аналогов ГЗК-111 в настоящей работе синтезирован ряд N-замещённых глипролинов и изучена их нейропротекторная активность *in vitro* на модели окислительного стресса и 6-гидроксидофамин-индуцированного повреждения нейронов.

Материалы и методы

Экспериментальная химическая часть

В работе использовали коммерческие аминокислоты и их производные (Sigma, Reanal). Используемые растворители очищали и сушили стандартными методами. Температуру плавления определяли в открытых капиллярах на приборе Optimelt MPA100 (Stanford Research Systems, США) и не корректировали. ПМР-спектры регистрирова-

ли в растворах диметилсульфоксида- d_6 (ДМСО- d_6) или CDCl_3 в шкале δ , м.д. (J , Гц) на спектрометре Fourier 300 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 300 МГц. В качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан. Удельное оптическое вращение измеряли на поляриметре ADP 440 Polarimeter (Bellingham + Stanley Ltd., Англия). ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 G/F254 (Merck, Германия) в системах диоксан — вода 9:1 (А), хлороформ — метанол 9:1 (Б) и бензол — уксусная кислота — вода 3:1:1 (В). Соединения с амидными группами обнаруживали в парах йода, соединения с открытой карбоксильной группой — бромкрезоловым зелёным, содержащие ароматические группы — в УФ-лучах. Элементный анализ проводили на приборе для определения углерода и водорода с четырьмя электрическими печами (600–900 °С, тип МА-Г/6Р, завод ЛЭТО, Россия) в токе кислорода и на аппарате для определения азота с тремя такими же электрическими печами в токе углекислого газа. Данные элементного анализа соединений относительно процентного содержания С, Н и N отклоняются от теоретических не более чем на 0,4 %.

Этиловый эфир *N*-фенилпропионил-глицил-*L*-пролина ($\text{C}_6\text{H}_5-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-\text{Gly}-\text{L}-\text{Pro}-\text{OC}_2\text{H}_5$, ГЗК-45). Получали аналогично [8]. Т.пл. 111–112 °С; $[\alpha]^{23}_D -83^\circ$ (c 1, этанол); R_f 0,8 (В).

Этиловый эфир *N*-капроил-глицил-*L*-пролина ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(\text{O})-\text{Gly}-\text{L}-\text{Pro}-\text{OC}_2\text{H}_5$, ГЗК-46). К охлаждённому до -10°C раствору 3,5 г (20 ммоль) *N*-капроилглицина в 20 мл ДМФА при интенсивном перемешивании одновременно прибавляли 2,63 мл (20 ммоль) изобутилхлорформиата и 2,56 мл (20 ммоль) *N*-этилморфолина. После 2–3 мин перемешивания прикапывали раствор 3,95 г (22 ммоль) гидрохлорида этилового эфира пролина и 2,8 мл (22 ммоль) *N*-этилморфолина в 20 мл ДМФА. Реакционную смесь перемешивали ещё 30 мин при -10°C и 1 ч при комнатной температуре. Осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, остаток растворяли в CHCl_3 . Раствор последовательно промывали 3 % NaHCO_3 , водой, 1М раствором HCl и вновь водой, высушивали безводным сульфатом натрия и упаривали. Полученное масло перекристаллизовывали из этилацетата и гексана и получали 4,1 г (68 %) этилового эфира *N*-капроил-глицил-*L*-пролина в виде кристаллического продукта. Т.пл. 53–54 °С; $[\alpha]^{23}_D -96,68^\circ$ (c 1, метанол); R_f 0,75 (хлороформ:метанол (9:1)). ПМР-спектр (ДМСО- d_6) δ , м.д.: 0,85 (т, J 6,7 Гц, 3Н, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$), 1,17–1,24 (м, 7Н, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 1,48 (м, 2Н, $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 1,6–1,97 (м, 3Н, $\text{C}^{\beta}\text{H}_1\text{ Pro}$, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2\text{ Pro}$), 2,0–2,29 (м, 3Н, $\text{C}^{\beta}\text{H}_1\text{ Pro}$, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2$), 3,51 (м, 2Н, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2\text{ Pro}$), 3,72–4,2 (м, 4Н, $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2\text{ Gly}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4,25 (д.д., 1Н, $\text{C}^{\alpha}\text{H Pro}$, мажорный конформер), 4,68 (д.д., 1Н, $\text{C}^{\alpha}\text{H Pro}$, минорный конформер), 7,92 (уш.с., 1Н, NH Gly). Элементный анализ: вычислено, %: С 60,37; Н 8,78; N 9,39; найдено, %: С 60,89; Н 8,62 $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$.

Этиловый эфир *N*-ацетил-глицил-*L*-пролина ($\text{CH}_3-\text{C}(\text{O})-\text{Gly}-\text{L}-\text{Pro}-\text{OC}_2\text{H}_5$, ГЗК-49).

К охлаждённому до -10°C раствору 2,35 г (20 ммоль) *N*-ацетилглицина в 30 мл ДМФА при интенсивном перемешивании одновременно прибавляли 2,6 мл (20 ммоль) изобутилхлорформиата и 2,6 мл (20 ммоль) *N*-этилморфолина. После 2–3 мин перемешивания прикапывали раствор 4 г (22 ммоль) гидрохлорида этилового эфира пролина и 2,8 мл (22 ммоль) *N*-этилморфолина в 20 мл ДМФА. Реакционную смесь перемешивали ещё 30 мин при -10°C и 1 ч при комнатной температуре. Осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, остаток растворяли в CHCl_3 . Раствор последовательно промывали 3 % NaHCO_3 , водой, 1М раствором HCl и вновь водой, высушивали безводным сульфатом натрия и упаривали. Получали 1,9 г (81 %) этилового эфира *N*-ацетил-глицил-*L*-пролина в виде кристаллического продукта. Т.пл. 48–50 °С; R_f 0,82 (хлороформ : метанол (9:1)). ПМР-спектр (CDCl_3) δ , м.д.: 1,27 (м, 3Н, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 2,02–2,21 ((м, 7Н, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2\text{ Pro}$, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2\text{ Pro}$, $\text{CH}_3(\text{Ac})$), 3,49–3,59 (м, 2Н, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2\text{ Pro}$), 4,02–4,2 (м, 4Н, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2\text{ Gly}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4,47 (д.д., 1Н, $\text{C}^{\alpha}\text{H Pro}$, мажорный конформер), 4,51 (д.д., 1Н, $\text{C}^{\alpha}\text{H Pro}$, минорный конформер), 6,56 (уш.с., 1Н, NH Gly) [10].

Эксперименты *in vitro*

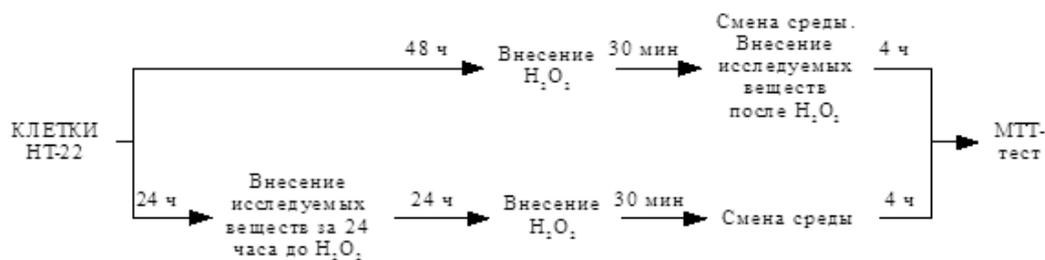
Исследование проводили с использованием клеток линии НТ-22 (иммortalизованные клетки гиппокампа мышцы) и линии SH-SY5Y (клетки нейробластомы человека). Для эксперимента клетки рассеивали на 96-луночные культуральные планшеты, обработанные поли-D-лизинном (Corning, США; 5 мкг/см²) с плотностью 20 тыс./см² и инкубировали в среде DMEM (HyClone, Финляндия), содержащей 2 мМ L-глутамин (MP Bioscience, Китай) и 5 % (для клеток линии НТ-22) или 10 % (для клеток линии SH-SY5Y) эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) при температуре 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO_2 до образования монослоя.

Окислительный стресс моделировали путём внесения перекиси водорода в конечной концентрации 1,5 мМ [11]. Спустя 30 мин среду заменяли на обычную. Через 4 ч выполняли измерение жизнеспособности клеток.

Для индукции гибели клеток 6-гидроксидофамином его вносили в культуральную среду в конечной концентрации 100 мкМ [12]. Спустя 24 ч среду заменяли на обычную. Измерение жизнеспособности клеток выполняли спустя сутки (рис. 1А).

Жизнеспособность клеток измеряли с использованием МТТ-теста с добавлением 0,5 % раствора бромидо-3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия (МТТ). Для растворения образующихся кристаллов формазана использовали ДМСО. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Multiscan EX при длине волны 600 нм [13] (рис. 1Б).

А



Б

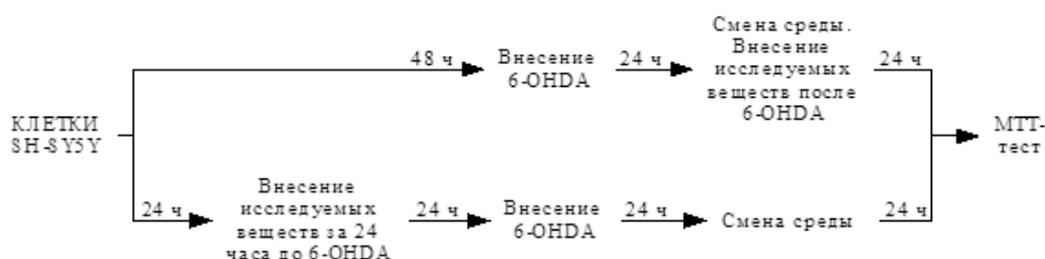


Рис. 1. Схемы экспериментов по установлению нейропротекторного действия замещённых глипролинов на моделях окислительного стресса, индуцированного перекисью водорода (А) и 6-гидроксидофамином (Б)

Исследуемые соединения (ГЗК-45, ГЗК-46 и ГЗК-49) растворяли в деионизированной воде и вносили за 24 ч до перекиси водорода или 6-OHDA либо сразу после смены среды в конечных концентрациях 10^{-5} – 10^{-8} М.

Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Краскела—Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA). Данные считались достоверными при $p \leq 0,05$ и представлены в виде $m \pm s.d.$

Результаты и обсуждение

Для изучения влияния природы *N*-ацильного заместителя ГЗК-111 на его биологическую активность нами были сконструированы и синтезированы его аналоги: этиловый эфир *N*-фенилпропионил-глицил-*L*-пролина (ГЗК-45), гомолог с удлинённым фенилалканоильным радикалом; этиловый эфир *N*-капроил-глицил-*L*-пролина (ГЗК-46), аналог с алифатическим ацильным фрагментом, в котором сохранено число сигма-связей, и эфир *N*-ацетил-глицил-*L*-пролина (ГЗК-49) с удалением из фенилацильного фрагмента фенила. Структурные аналоги ГЗК-111 представлены на рис. 2.

Этиловые эфиры *N*-ацилглицилпролинов (ГЗК-45, ГЗК-46, ГЗК-49) получали (рис. 3) методом смешанных ангидридов с использованием изобутилхлорформиата в условиях Андерсона [14]. В качестве карбоксильной

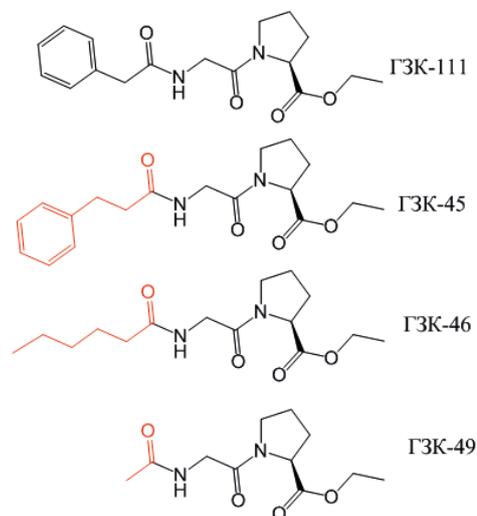


Рис. 2. ГЗК-111 и его аналоги

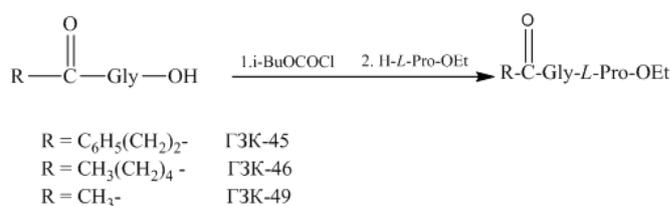


Рис. 3. Схема синтеза замещённых глипролинов

компоненты для получения ГЗК-45 и ГЗК-46 использовали *N*-фенилалканойлглицин, синтезированный из глицина и хлорангирида соответствующей фенилалкановой кислоты по Шоттен–Бауману [15], для получения ГЗК-49 — коммерческий ацетилглицин (Reanal). В качестве аминоконпоненты использовали этиловый эфир пролина, полученный этерификацией

пролина абсолютным этанолом в присутствии хлористого тионила по методу Бреннера [16].

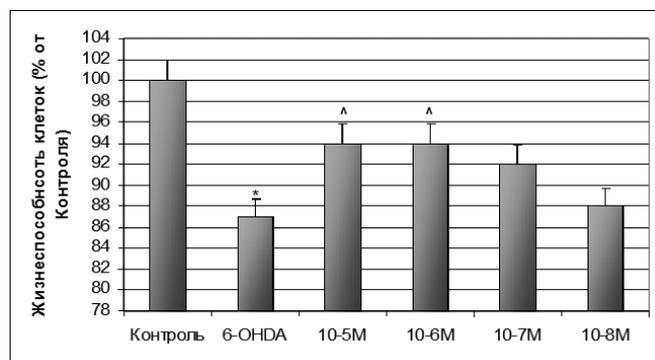
При внесении в культуру клеток НТ-22 перекись водорода в концентрации 1,5 мМ вызывает быструю гибель клеток из-за активации свободнорадикальных процессов [17]. Окислительный стресс, вызванный H₂O₂, приводил к достоверно-

Таблица 1

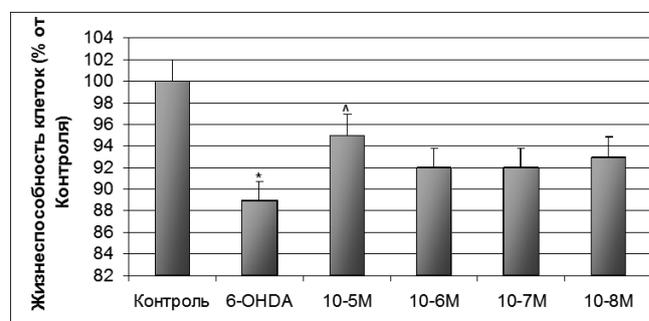
Нейропротекторная активность замещённых глипролинов в модели окислительного стресса на культуре нейронов НТ-22

Группа, n = 16	Концентрация, М	Внесение за 24 ч до H ₂ O ₂ (n = 16)		Внесение после H ₂ O ₂ (n = 16)	
		Данные МТТ-теста, % от контроля	Нейропротекторная активность А, %	Данные МТТ-теста, % от контроля	Нейропротекторная активность А (%)
Контроль	0	100 ± 7	100	100 ± 6	100
H ₂ O ₂	1,5·10 ⁻⁶	65 ± 4	0	67 ± 2	0
ГЗК-45	10 ⁻⁵	76 ± 4*	31*	74 ± 4*	21*
	10 ⁻⁶	78 ± 5*	37*	78 ± 3*	33*
	10 ⁻⁷	69 ± 5	11	75 ± 4*	24*
	10 ⁻⁸	66 ± 4	3	73 ± 3*	18*
Контроль	0	100 ± 6	100	100 ± 3	100
H ₂ O ₂	1,5·10 ⁻⁶	66 ± 3	0	70 ± 7	0
ГЗК-46	10 ⁻⁵	70 ± 4	12	72 ± 3	7
	10 ⁻⁶	66 ± 3	0	73 ± 3	10
	10 ⁻⁷	63 ± 1	-9	73 ± 6	10
	10 ⁻⁸	65 ± 3	-3	66 ± 2	-13
Контроль	0	100 ± 10	100	100 ± 4	100
H ₂ O ₂	1,5·10 ⁻⁶	54 ± 4	0	70 ± 3	0
ГЗК-49	10 ⁻⁵ М	60 ± 2	-8	72 ± 2	10
	10 ⁻⁶ М	63 ± 3	0	73 ± 4	13
	10 ⁻⁷ М	60 ± 3	-8	73 ± 2	-7
	10 ⁻⁸ М	62 ± 3	-3	66 ± 1	-13

Примечания: * — $p \leq 0,05$ — от H₂O₂ (критерий Краскела–Уоллиса с последующим тестом по Данну. Нейропротекторную активность пептидов вычисляли по формуле: $A_{\max} = \frac{D_{\text{в-во}} - D_{\text{H}_2\text{O}_2}}{D_{\text{к}} - D_{\text{H}_2\text{O}_2}} \cdot 100\%$, где: D — оптическая плотность раствора.



А



Б

Рис. 4. Нейропротекторное действие ГЗК-45 на модели повреждения клеток нейробластомы линии SH-SY5Y, индуцированного 6-гидроксидофамином. Внесение за 24 ч до 6-6-OHDA (А) и сразу после смены среды (Б). Данные МТТ-теста.

Примечания: * — $p \leq 0,05$ — от Контроля; ^ — $p \leq 0,05$ от H₂O₂ (критерий Краскела–Уоллиса с последующим тестом по Данну.

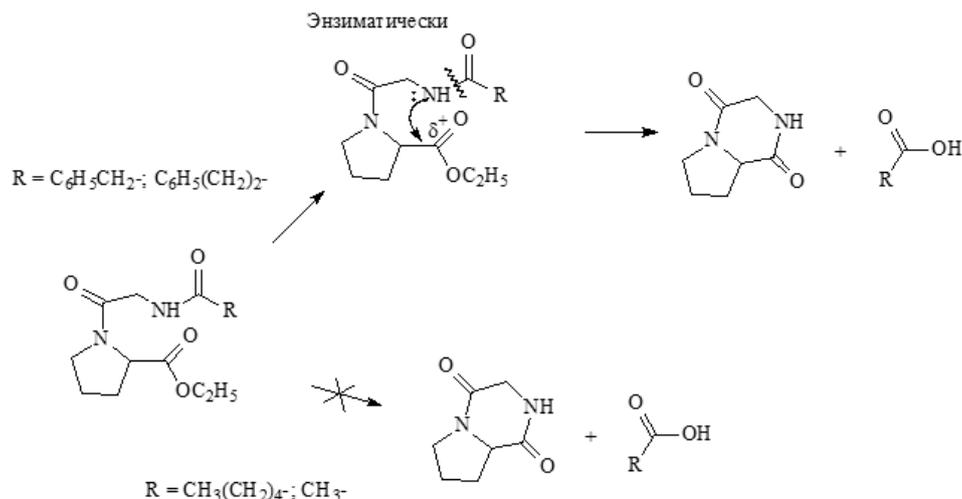


Рис. 5. Гипотетическая схема образования ЦПГ в результате метаболизма замещённых глипропинов

му снижению жизнеспособности гиппокампальных клеток линии HT-22. ГЗК-45 защищал клетки от повреждения H₂O₂ в концентрациях 10⁻⁵–10⁻⁸ М как при внесении за 24 ч до перекиси водорода, так и при внесении соединения после неё. ГЗК-46 и ГЗК-49 не оказывали защитного действия в обеих схемах внесения (табл. 1).

Далее изучалась способность ГЗК-45 защищать клетки нейробластомы человека SH-SY5Y на клеточной модели болезни Паркинсона с использованием 6-гидроксидофамина в концентрации 100 мМ [12]. 6-гидроксидофамин достоверно снижал жизнеспособность клеток, ГЗК-45 оказывал достоверное защитное действие как при внесении за 24 ч до 6-гидроксидофамина в концентрации 10⁻⁵–10⁻⁶ М, так и после повреждения в концентрации 10⁻⁵ М (рис. 4).

Ранее было показано, что ГЗК-111 может метаболизироваться до ЦПГ. Можно предположить, что ГЗК-45 имеет такую же возможность, так как его фенилпропаноильный заместитель гомологичен фенилацетилю, в то время как соединения с алканоильными радикалами ГЗК-46 и ГЗК-49, по-видимому, не способны метаболизироваться до ЦПГ (рис. 5).

Таким образом, активность проявляют только соединения, потенциально способные метаболизироваться до ЦПГ.

Выводы

1. Сравнительная оценка показала, что из трёх исследуемых соединений только одно – ГЗК-45 обладает нейропротекторным действием, у ГЗК-46 и ГЗК-49 оно отсутствует.
2. Активность проявляют только соединения, потенциально способные метаболизироваться до ЦПГ.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ

Конфликт интересов. Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Участие авторов. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Николаев Сергей Владимирович
 Автор, ответственный за переписку
 e-mail: sergej.nikolajev@gmail.com
 ORCID ID: 0000-0003-4584-746X
 SPIN-код: 7723-6008

н. с. лаборатории фармакологии
 нейропротекции ФГБНУ «НИИ фармакологии
 имени В.В. Закусова», Россия, Москва

Nikolaev Sergey V.
 Corresponding author
 e-mail: sergej.nikolajev@gmail.com
 ORCID ID: 0000-0003-4584-746X
 SPIN code: 7723-6008

Research Scientist, Neuroprotection pharmacology laboratory FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Russia, Moscow

Логвинов Илья Олегович

ORCID ID: 0000-0001-6101-1035

SPIN-код: 9909-9630

н. с. лаборатории фармакологии нейротекции ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Россия, Москва

Logvinov Ilya O.

ORCID ID: 0000-0001-6101-1035

SPIN code: 9909-9630

Research Scientist, Neuroprotection pharmacology laboratory FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Russia, Moscow

Колясникова Ксения Николаевна

ORCID ID: 0000-0001-6797-692X

SPIN-код: 5682-2035

н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Россия, Москва

Koliasnikova Ksenia N.

ORCID ID: 0000-0001-6797-692X

SPIN code: 5682-2035

Research Scientist, Laboratory of peptide bioregulators, Department of medicinal chemistry, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Russia, Moscow

Кузнецова Елена Александровна

ORCID ID: 0000-0001-9228-0596

к. х. н., с. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Россия, Москва

Kuznetsova Elena A.

ORCID ID: 0000-0001-9228-0596

PhD, Senior Research Scientist, Laboratory of fine organic synthesis, Department of medicinal chemistry, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Russia, Moscow

Антипов Пётр Иванович

ORCID ID: 0000-0002-6093-8805

SPIN-код: 2591-3379

к. х. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Россия, Москва

Antipov Petr I.

ORCID ID: 0000-0002-6093-8805

SPIN code: 2591-3379

PhD, Senior Research Scientist, Laboratory of peptide bioregulators, Department of medicinal chemistry, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Russia, Moscow

Антипова Татьяна Алексеевна

ORCID ID: 0000-0002-9309-4872

SPIN-код: 7723-6008

к. б. н., заведующая лабораторией фармакологии нейротекции ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Россия, Москва

Antipova Tatyana A.

ORCID ID: 0000-0002-9309-4872

SPIN-код: 7723-6008

PhD, Head Neuroprotection pharmacology laboratory, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Russia, Moscow

Литература / References

- Gudasheva TA, Boyko SS, Akparov VKh et al. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain. *FEBS Letters*. 1996;391:149–152. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00722-3
- Гудашева Т.А., Островская Р. У., Трофимов С.С. и др. Новый эндогенный дипептид циклопролилглицин подобен пирацетаму по селективности мнемотропного эффекта // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 1999. – Т. 128 – № 10. – С. 411–413. [Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Trofimov SS et al. New endogenous dipeptide cycloprolyl-glycine is similar to Piracetam by its mnemotropic selectivity. *Bulletin Of Experimental Biology And Medicine*. 1999;128(4):1012–1014. (In Russ).]

- Гудашева Т.А., Константинопольский М.А., Островская Р.У., Середенин С.Б., Анксиолитическая активность эндогенного ноотропа цикло-пролилглицина в тесте приподнятого крестообразного лабиринта // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2001. – Т. 131. – № 5. – С. 547–550. [Gudasheva TA, Konstantinopol'skii MA, Ostrovskaya RU, Seredenin SB. Anxiolytic activity of endogenous nootropic dipeptide cycloprolylglycine in elevated plus-maze test. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2001;131(5):464–466. (In Russ).] DOI: 10.1023/A:1017928116025

- Колясникова К.Н., Гудашева Т.А., Назарова Г.А. и др. Сходство цикло-пролилглицина с пирацетамом по антигипоксическому и нейротекторному эффектам // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2012. – Т. 75. – № 9. – С. 3–6. [Kolyasnikova KN, Gudasheva TA, Nazarova GA et al. Similarity of Cycloprolylglycine to

Piracetam in Antihypoxic and Neuroprotective Effects. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2012;75(9);3–6. (In Russ.)]

5. Поварнина П.Ю., Колясникова К.Н., Николаев С.В. и др. Нейропептид циклопролилглицин проявляет нейропротективную активность при системном введении на модели неполной глобальной ишемии у крыс и в условиях глутаматной нейротоксичности *in vitro* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2015. – Т. 160. – № 11. – С. 600–603. [Povarnina PY, Kolyasnikova KN, Gudasheva TA et al. Neuropeptide cyclopropylglycine exhibits neuroprotective activity after systemic administration to rats with modeled incomplete global ischemia and *in vitro* modeled glutamate neurotoxicity. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016;160(5):653–655. (In Russ.)] DOI: 10.1007/s10517-016-3241-5

6. Гудашева Т.А., Григорьев В.В., Колясникова К.Н. и др. Нейропептид циклопролилглицин является эндогенным положительным модулятором AMPA-рецепторов // *Доклады Академии наук*. – 2016. – Т. 471. – № 1. – С.106–108. [Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Seredenin SB, et al. Neuropeptide cyclopropylglycine is an endogenous positive modulator of AMPA receptors. *Doklady akademii nauk*. 2016;471(1):106–108. (In Russ.)] DOI: 10.7868/s0869565216310273

7. Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., и др. Нейропептид циклопролилглицин увеличивает содержание мозгового нейротрофического фактора в нейрональных клетках // *Доклады Академии наук*. – 2016 – Т. 469 – № 4 – С.492–495. [Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, et al. Neuropeptide cyclopropylglycine is an endogenous positive modulator of AMPA receptors. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2016;471(1):387–389. (In Russ.)] DOI: 10.1134/s160767291606003x

8. Антипова Т.А., Колясникова К.Н., Волкова Ю.С., и др. Нейропротекторные свойства *in vitro* новых замещённых глипролинов // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018 – № 3. – С. 31–36. [Antipova TA, Kolyasnikova KN, Volkova YS, et al. Neuroprotective properties of novel substituted glyprolines *in vitro*. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;(3):31–36. (In Russ.)] DOI:10.24411/2587-7836-2018-10021

9. Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Кузнецова Е.А. и др. Этиловый эфир *N*-фенилацетил-глицил-*L*-пролина метаболизируется до цикло-*L*-пролилглицина, проявляя сходный спектр нейropsychотропной активности // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2016. – Т. 50. – № 11. – С. 3–8. [Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Kuznetsova EA, et al. *N*-Phenylacetyl-glycyl-*L*-Proline Ethyl Ester converts into Cyclo-*L*-Prolylglycine showing a similar spectrum of neuropsychotropic activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2017; 50(11);705–710. (In Russ.)] DOI: 10.1007/s11094-017-1516-4

10. Gardner RR, Gellman SH. Secondary Effects in Flexible Hydrogen Bonding Networks. *Pergamon*. 1997;29:9881-9990. DOI:10.1021/ja00146a038

11. Jackson GR, Werbach-Perez K, Ezell EL, et al. Nerve growth factor effects on pyridine nucleotides after oxidant injury of rat pheochromocytoma cells. *Brain Research*. 1992;592(1-2):239–248. DOI:10.1016/0006-8993(92)91681-4

12. Riveles K, Luping ZH, Quik M. Cigarette smoke, nicotine and cotinine protect against 6-hydroxydopamine-induced toxicity in SH-SY5Y cells, *Neurotoxicology*. 2008;29(3):421–427. DOI: 10.1016/j.neuro.2008.02.001

13. Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British journal of cancer*. 1987;56:279–285. DOI:10.1038/bjc.1987.190

14. Anderson GW, Zimmerman JE, Callahan FM. Reinvestigation of the mixed carbonic anhydride method of peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1967;89:5012–5017. DOI: 10.1021/ja00995a032

15. Baumann E. Ueber eine einfache Methode der Darstellung von Benzoësäureäthern. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1886;19:3218–3222. DOI:10.1002/CBER.188601902348

16. Brenner M, Huber W. Herstellung von α -Aminosäureestern durch Alkoholyse der Methylester. *Helv. Chim. Acta*. 1953;36:1109–1115. DOI:10.1002/hlca.19530360522

17. Wyrsch P, Blenn C, Bader J, et al. Cell death and autophagy under oxidative stress: roles of poly(ADP-ribose) polymerases and Ca²⁺. *Molecular and Cell Biology*. 2012;17:3541–3553. DOI:10.1128/MCB.00437-12

Статья поступила в июне 2020 г.