

# Нейропротекторное действие цикло- L-пролилглицина на моделях повреждения нейрональных клеток *in vitro*

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

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

**Резюме.** Исследовано нейропротекторное действие цикло-L-пролилглицина в экспериментах *in vitro*. Показано, что L-ЦПГ оказывает нейропротекторное действие в условиях оксидативного стресса, глутаматной и 6-гидроксидофаминовой токсичности.

**Ключевые слова:** нейропротекция, цикло-L-пролилглицин, оксидативный стресс, глутаматная токсичность, 6-гидроксидофаминовая токсичность

## Neuroprotective effect of L-cycloprolylglycine on models neuronal cells damage *in vitro*

Nikolaev S.V., Logvinov I.O., Antipov P.I., Kolyasnikova K.N., Antipova T.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

**Resume.** We have studied neuroprotective effect of L-cycloprolylglycine (L-CPG) *in vitro* experiments. It is shown that L-CPG has neuroprotective effect in the conditions an oxidative stress, glutamate and 6-hydroxydopamine toxicity.

**Keywords:** neuroprotection, L-cycloprolylglycine, oxidative stress, glutamate toxicity, 6-hydroxydopamine toxicity

Автор, ответственный за переписку:

Николаев Сергей Владимирович – научный сотрудник ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; e-mail: cergej.nikolajev@gmail.com

## Введение

Нейропептид цикло-L-пролилглицин (L-ЦПГ), синтезированный в ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» [1], был позже обнаружен в мозге крыс [2]. Ноотропный [3], анксиолитический [4], антигипоксический [5] эффекты L-ЦПГ при системном введении были схожи с таковыми при введении пираретама. Подобно пираретаму, ЦПГ является положительным модулятором AMPA-рецепторов [6]. Известно, что положительные AMPA-модуляторы обладают нейропротекторным действием на различных моделях *in vitro* [7]. Исходя из этих данных, можно было предположить наличие нейропротекторного действия и у L-ЦПГ.

Целью работы было выявление нейропротекторного действия L-ЦПГ на различных моделях повреждения *in vitro*: оксидативного стресса, глутаматной токсичности, клеточной модели болезни Паркинсона, индуцированной нейротоксином 6-гидроксидофамином.

## Материалы и методы исследования

L-ЦПГ синтезирован в отделе химии НИИ фармакологии им. В.В. Закусова [8]. Для экспериментов использовались реактивы: глутаминовая кислота (ICN), 6-гидроксидофамин и МТТ (Sigma Aldrich), ДМСО (Panreac), среда ДМЕМ (HyClone), фетальная бычья сыворотка FBS (Gibco).

Клетки культивировали в среде ДМЕМ в случае гиппокампальных клеток линии HT-22 с добавлением 5% FBS, в случае клеток нейробластомы человека

линии SH-SY5Y – 15% FBS при температуре 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

Глутаматную токсичность моделировали путём внесения в культуральную среду раствора глутаминовой кислоты в конечной концентрации 5 мМ. Через 24 ч среду заменяли на обычную. L-ЦПГ вносили за 24 ч до глутаминовой кислоты или сразу после смены среды. Жизнеспособность клеток измеряли методом МТТ-теста через 24 ч [9].

Оксидативный стресс моделировали путём внесения перекиси водорода в конечной концентрации 1,5 мМ. Спустя 30 мин среду заменяли на обычную. Ещё через 4 ч выполняли измерение жизнеспособности клеток методом МТТ-теста [10].

Клеточную модель болезни Паркинсона воспроизвели путём внесения раствора 6-гидроксидофамин в конечной концентрации 100 мкМ. Через 24 ч среду заменяли на обычную. Через 24 ч измеряли жизнеспособность клеток методом МТТ-теста [11].

L-ЦПГ вносили за 24 ч до повреждения или сразу после смены среды в концентрациях 10<sup>-5</sup> – 10<sup>-8</sup>М.

Жизнеспособность клеток измеряли с использованием МТТ-теста с добавлением 0,5% раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ). Для растворения кристаллов формазана использовали ДМСО и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Multiscan EX при длине волны 600 нм [12].

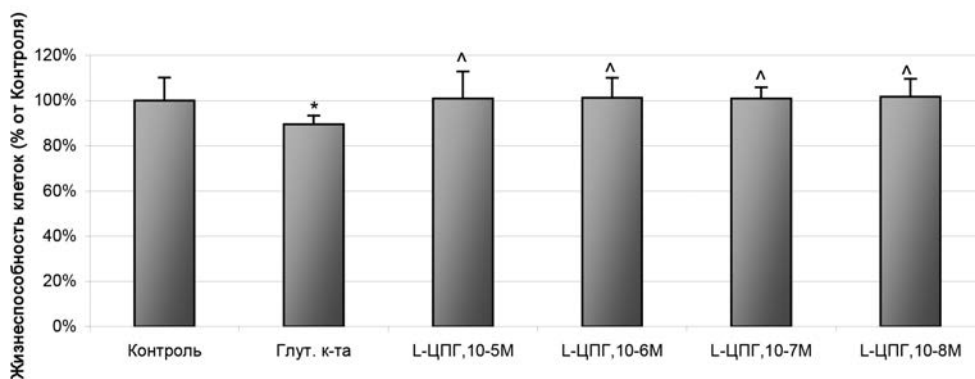
Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Краскела-Уоллеса с последующим тестом по Данну (ANOVA). Данные представлены в виде  $m \pm s.d.$

### Результаты и их обсуждение

На модели глутаматной токсичности нами показано, что L-ЦПГ в культуре клеток НТ-22 в концентрациях  $10^{-5}$ – $10^{-8}$  моль/л оказывал нейропротекторное действие, но только в схеме внесения за 24 ч до повреждения. При внесении после глутаминовой кислоты нейропротекторное действие выявлено не было (рис. 1).

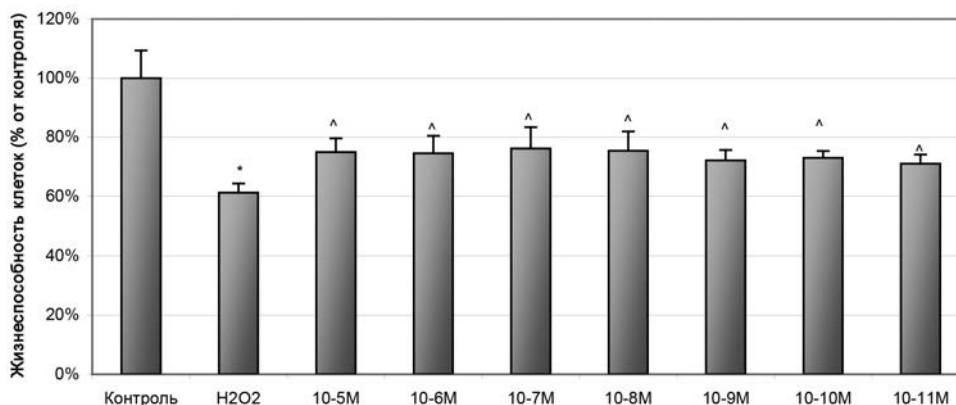
При моделировании оксидативного стресса путём добавления к культуре клеток НТ-22 перекиси водорода L-ЦПГ оказывал защитное действие как при внесении за 24 часа до перекиси в концентрациях от  $10^{-5}$  моль/л до  $10^{-8}$  моль/л, так и при внесении после перекиси, но только в концентрации до  $10^{-7}$  моль/л (рис. 2, 3).

На клеточной модели болезни Паркинсона в культуре клеток SH-SY5Y с использованием 6-ги-



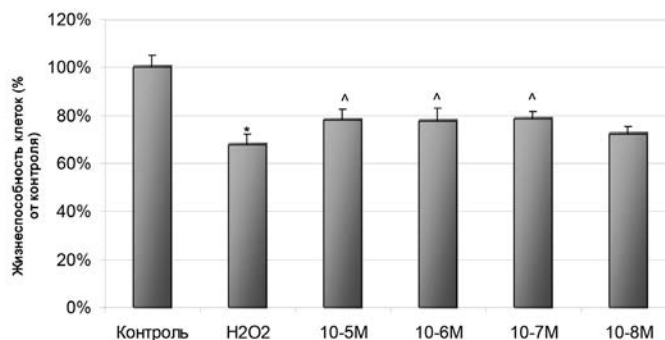
**Рис. 1.** Нейропротекторное действие ЦПГ на модели глутаматной токсичности (результат МТТ-теста)

**Примечание:** Внесение L-ЦПГ за 24 ч до глутаминовой кислоты ( $p < 0,05$  по критерию Краскела-Уоллеса). \* – достоверность отличия от контроля; <sup>^</sup> – от глутаминовой кислоты



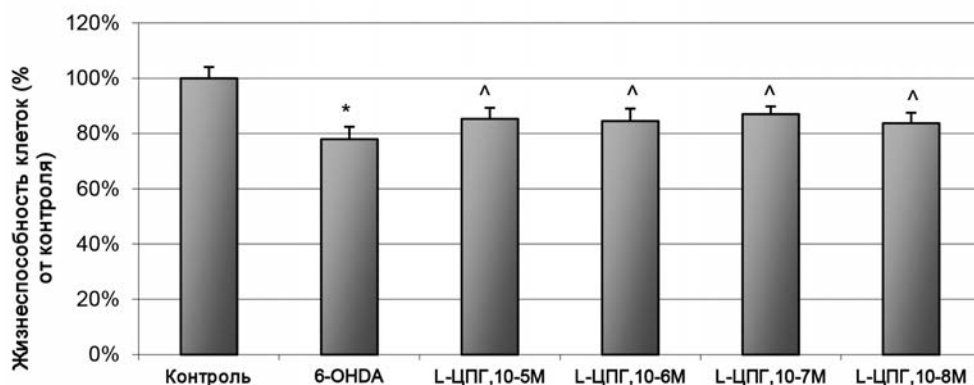
**Рис. 2.** Нейропротекторное действие ЦПГ на модели оксидативного стресса

**Примечание:** Внесение L-ЦПГ за 24 часа до перекиси водорода ( $p < 0,05$  по критерию Краскела-Уоллеса). \* – достоверность отличия от контроля; <sup>^</sup> – от перекиси водорода



**Рис. 3.** Нейропротекторное действие ЦПГ на модели оксидативного стресса

**Примечание:** Внесение L-ЦПГ после перекиси водорода ( $p < 0,05$  по критерию Краскела-Уоллеса). \* – достоверность отличия от контроля; <sup>^</sup> – от перекиси водорода



**Рис. 4.** Нейропротекторное действие ЦПГ на модели 6-гидроксидоаминового повреждения.

**Примечание:** Внесение L-ЦПГ после 6-гидроксидоамина ( $p < 0,05$  по критерию Краскела-Уоллеса). \* – достоверность отличия от контроля; <sup>^</sup> – от 6-гидроксидоамина

доксидамина, L-ЦПГ в концентрациях  $10^{-5}$ – $10^{-8}$  моль/л, как и в случае глутаматной токсичности, нейропротекторное действие обнаруживалось только при добавлении пептида за 24 часа до токсина в концентрациях  $10^{-5}$ – $10^{-8}$  моль/л (рис. 4).

Таким образом, нами показано наличие нейропротекторного действия L-ЦПГ на моделях повреждения нейронов *in vitro*, наблюдавшееся преимущественно при внесении препарата до начала действия повреждающего агента. Эти результаты согласуются с данными литературы о наличии протекторного эффекта у L-ЦПГ на моделях кислородно-глюкозной депривации на первичной культуре гиппокампальных нейронов [13], а также майтотоксин-индуцированного некроза и апоптоза, индуцированного сульфатом железа (II) в зёрнах мозжечка [14]. Защитный эффект L-ЦПГ отсутствовал в схеме внесения после повреждения на модели травматического повреждения кокультуры нейрональных и глиальных клеток, а также апоптоза, индуцированного стауроспорином в культуре зёрен мозжечка [14], и NMDA-эксайтотоксичности на гиппокампальных нейронах [15].

Одним из ключевых звеньев механизма действия L-ЦПГ является его способность к положительной

модуляции AMPA-рецепторов [16], что, как известно, приводит к усилению синтеза нейротрофинов, являющихся эндогенными нейропротекторами [7]. Поэтому наличие нейропротекторного эффекта только при внесении за 24 ч можно объяснить, исходя из предположения о том, что L-ЦПГ осуществляет своё защитное действие через положительную модуляцию AMPA-рецепторов и последующий синтез нейротрофинов, на который требуется интервал времени 18–24 ч [17]. Выявленное защитное действие L-ЦПГ в обеих схемах эксперимента на модели оксидативного стресса может быть обусловлено его антиоксидантными свойствами [14] и за счёт возможного влияния на систему антиоксидантной защиты клеток.

## Выводы

Цикло-L-пролилглицин оказывает нейропротекторное действие в экспериментах *in vitro* и это согласуется с литературными данными о его защитном действии в других модельных системах *in vitro* и *in vivo*. Полученные результаты согласуются с литературными данными о наличии у положительных модуляторов AMPA-рецепторов нейропротекторных свойств.

## Литература

1. Гудашева Т.А., Василевич Н.И., Золотов Н.Н., Лезина В.П., Розенберг С.Г., Кравченко Е.В., Островская Р.У., Воронина Т.А., Розанцев Г.Г., Сколдинов А.П. О механизме ноотропного действия топологических аналогов пирacetama на основе пролина. Хим.-фарм.ж.. 1991; 6: 25:12–16.
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., Островская Р.У., Трофимов С.С., Воронина Т.А., Сколдинов А.П., Середин С.Б. Новый эндогенный дипептид цикло-пролилглицин подобен пирacetamu по селективности мнемоторного эффекта. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999; 10: 128: 411–413.

4. Гудашева Т.А., Константинопольский М.А., Островская Р.У., Середин С.Б. Анксиолитическая активность эндогенного ноотропа цикло-пролилглицина в тесте приподнятого крестообразного лабиринта стереоселективна. Бюлл. эксп. биол. и мед.. 2001; 5: 131: 545–550.

5. Колясникова К.Н., Гудашева Т.А., Назарова Г.А., Антипов П.И., Николаев С.В., Антипова Т.А., Воронина Т.А., Середин С.Б. Сходство цикло-пролилглицина с пирacetamom по антигипоксическому и нейропротекторному эффектам. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2012; 9: 75:3–6.

6. Гудашева Т.А., Григорьев В.В., Колясникова К.Н., Замойский В.Л., Середин С.Б. Нейропептид циклопролилглицин является эндогенным положительным модулятором AMPA-рецепторов. Доклады Академии наук. 2016; 1: 471:106–108.

7. Joudi H., Hsu Y.-T., Zhou M., Qin Q., Bi X., Baudry M. Positive AMPA Receptor Modulation Rapidly Stimulates BDNF Release and Increases Dendritic mRNA Translation. Journal of Neuroscience. 2009; 8: 29: 8688–8697.

8. Гудашева Т.А., Василевич Н.И., Островская Р.У., Трофимов С.С., Воронина Т.А., Сколдинов А.П., Розанцев Г.Г. Синтез и ноотропная активность пирролидино [1,2-а] диазациклоалканонов. Хим.-фарм. ж. 1996; 9: 30: 12–17.
9. Tan S., Wood M., Maher P. Oxidative Stress Induces a Form of Programmed Cell Death with Characteristics of Both Apoptosis and Necrosis in Neuronal Cells. *Journal of Neurochemistry*. 1998; 1: 71: 95–105.
10. Jackson G.R., Werrbach-Perez K., Ezell E.L., Post J.F.M., Perez-Polo J.R. Nerve growth factor effects on pyridine nucleotides after oxidant injury of rat pheochromocytoma cells. *Brain Research*. 1992; 592: 239–248.
11. Riveles K. Huang L.Z., Quik M. Cigarette smoke, nicotine and cotinine protect against 6-hydroxydopamine-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *NeuroToxicology*. 2008; 29: 421–427.
12. Twentyman P.R., 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
13. DRA. María Teresa García López, el potencial terapéutico del tripéptido n-terminal del *delif-1* y de sus miméticos como fármacos neuroprotectores, 2007.
14. Prakash K.R.C., Tang Y., Kozikowski A.P., Flippen-Anderson J.L., Knobloch S.L., Fadenc A.I. Synthesis and Biological Activity of Novel Neuroprotective Diketopiperazines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2002; 10: 3043–3048.
15. Burgos-Ramos E., Martos-Moreno G.A., López M.G., Herranz R., Aguado-Llera D., Egea J., Frechilla D., Cenarruzabeitia E., León R., Arilla-Ferreiro E., Argente J., Barrios V. The N-terminal tripeptide of insulin-like growth factor-1 protects against beta-amyloid-induced somatostatin depletion by calcium and glycogen synthase kinase 3 beta modulation. *Journal of neurochemistry*. 2009; 109: 360–370.
16. 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; 4: 469:492–495.
17. Tabakman R., Lecht S., Sephanova S., Arien-Zakay H., Lazarovici P. Interactions between the cells of the immune and nervous system: neurotrophins as neuroprotection mediators in CNS injury. *Interactions between the cells of the immune and nervous system: neurotrophins as neuroprotection mediators in CNS injury*. 2007; 146: 385–401.