

УДК 577.112

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ НЕЙРОПЕПТИДА ЦИКЛОПРОЛИЛГЛИЦИНА ЗАВИСИТ ОТ АКТИВАЦИИ АМРА- И TRK-РЕЦЕПТОРОВ

© 2022 г. Член-корреспондент РАН Т. А. Гудашева^{1,*}, К. Н. Колясникова¹, А. Г. Аляева¹,
С. В. Николаев¹, Т. А. Антипова¹, академик РАН С. Б. Середенин¹

Поступило 20.06.2022 г.

После доработки 18.07.2022 г.

Принято к публикации 20.07.2022 г.

Ранее нами было показано, что эндогенный нейропептид циклопролилглицин (ЦПГ) является положительным модулятором АМРА-рецепторов, выявлена зависимость анксиолитического и антигипоксического действия циклопептида от BDNF/Trk сигналинга. В настоящей работе в экспериментах *in vitro* с применением блокаторов АМРА-рецепторов DNQX и GYKI 52466 и блокатора Trk-рецепторов K252a впервые выявлено, что нейропротекторный эффект ЦПГ зависит от активации как АМРА, так и Trk рецепторов.

Ключевые слова: циклопролилглицин, нейропротекторная активность, мозговой нейротрофический фактор (BDNF), Trk, АМРА

DOI: 10.31857/S2686738922060099

Циклопролилглицин (ЦПГ), эндогенный циклопептид, теоретически предполагался в качестве топологического пептидного аналога классического ноотропа пирацетама (N-карбамидометилпирролидона-2) [1], а в дальнейшем был идентифицирован в головном мозге грызунов [2], в плазме крови, цереброспинальной жидкости и головном мозге человека [3]. Установлено, что ЦПГ подобен по структуре пирацетаму, и обладает сходным спектром фармакологических эффектов, включая ноотропную, антигипоксическую, нейропротекторную и анксиолитическую активности [4, 5].

В электрофизиологических экспериментах на изолированных клетках Пуркинье мозжечка крыс выявлена способность ЦПГ положительно модулировать токи АМРА-рецепторов [6]. Подобно другим ампаминам [7, 8], ЦПГ повышает содержание мозгового нейротрофического фактора (brain derived neurotrophic factor, BDNF) в нейрональных культурах [9]. При этом важно, что спектр фармакологической активности ЦПГ, включая нейропротекторную, прокогнитивную, антидепрессивную, анальгетическую [10], близок к имеющемуся у BDNF [11, 12]. На основе этих

данных нами сформулирована гипотеза, что фармакологические эффекты ЦПГ обусловлены стимуляцией BDNF/TrkB сигналинга вследствие активации АМРА-рецепторов, что было подтверждено введением блокатора Trk-рецепторов K252a или конкурентного антагониста АМРА-рецепторов, соединения DNQX, которые препятствовали проявлению анксиолитического [13] и антигипоксического [5] эффектов ЦПГ.

Логично предположить, что и другие фармакологические эффекты ЦПГ также обусловлены стимуляцией АМРА/BDNF/TrkB каскада. Поэтому в настоящей работе мы изучили влияние конкурентного и неконкурентного антагонистов АМРА-рецепторов, DNQX [14] и GYKI 52466 [15] соответственно, и блокатора Trk-рецепторов K252a [16] на нейропротекторную активность ЦПГ на клеточной модели окислительного стресса.

Модель окислительного стресса на культуре гиппокампальных нейронов линии НТ-22 воспроизводили согласно [17]. Концентрация ЦПГ 10^{-6} М была выбрана как наиболее активная в электрофизиологических экспериментах на клетках Пуркинье [6], она также соответствует содержанию эндогенного ЦПГ в мозге у грызунов [2]. Окислительный стресс моделировали путем внесения перекиси водорода в конечной концентрации 1.5 мМ в течение 30 мин, затем среду заменяли на обычную. Через 4 ч выполняли измерение

¹ ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

*e-mail: tata-sosnovka@mail.ru

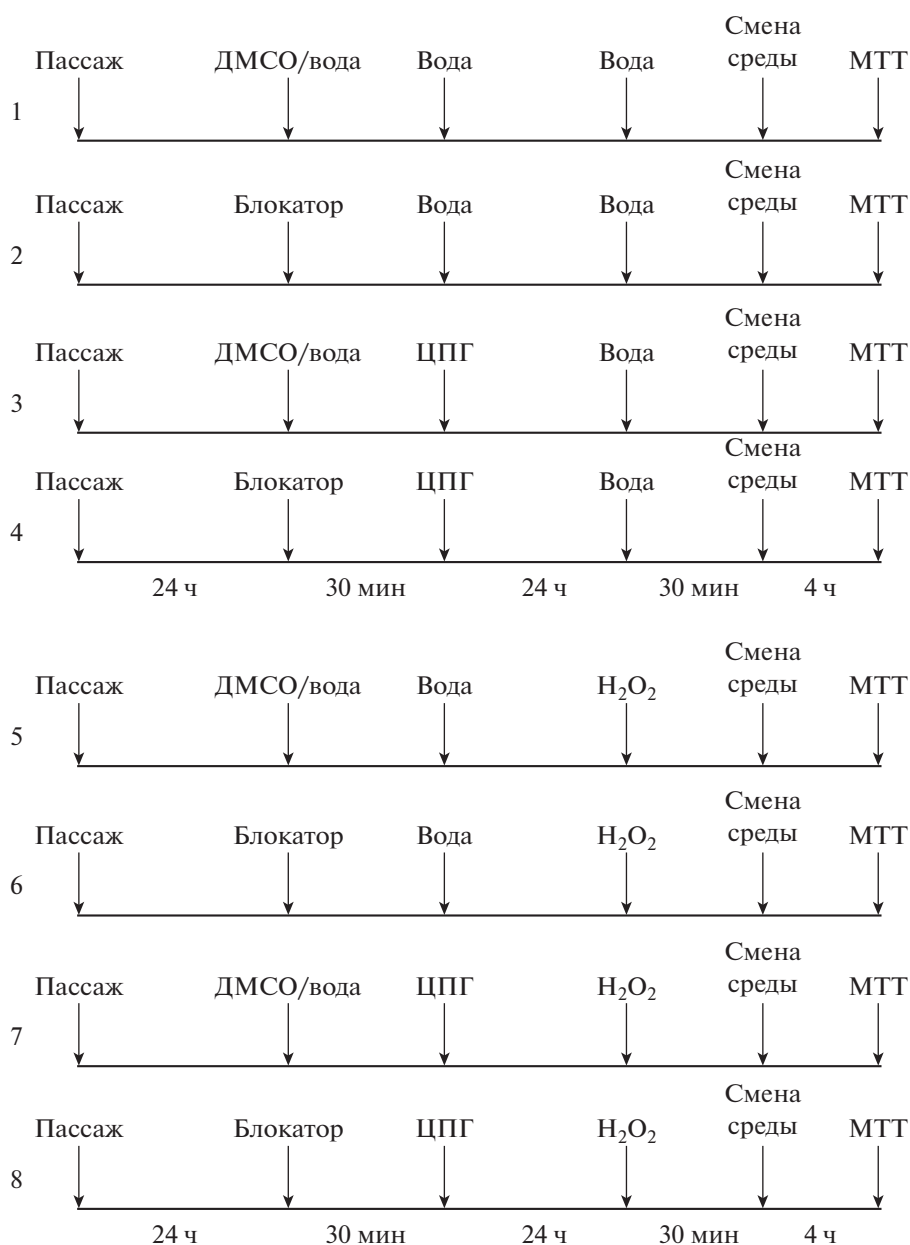


Рис. 1. Схема эксперимента. Группы: 1 – контроль, 2 – блокатор, 3 – ЦПГ, 4 – блокатор+ЦПГ, 5 – H₂O₂, 6 – блокатор + H₂O₂, 7 – ЦПГ + H₂O₂, 8 – блокатор + ЦПГ + H₂O₂.

жизнеспособности клеток методом МТТ-теста с использованием 0.5% водного раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия [18], измеряя оптическую плотность при 600 нм. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Краскела–Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA) или U-критерия Манна–Уитни. Данные представлены в виде $m \pm s.d.$

ЦПГ, растворенный в стерильной деионизованной воде в конечной концентрации 10^{-6} М, вносили в культуру клеток за 24 ч до окислитель-

ного стресса. Все блокаторы вносили за 30 мин до ЦПГ через 24 ч после пассажа. При этом K252a в 0.2% ДМСО вносили в конечной концентрации 0.2 мкМ [19], DNQX, также растворенный в 0.2% ДМСО, вносили в конечной концентрации 20 мкМ [20], блокатор GYKI 52466, растворенный в воде, вносили в конечной концентрации 100 мкМ [21]. Схема эксперимента по группам представлена на рис. 1.

Внесение конкурентного антагониста АМРА-рецепторов DNQX, или ЦПГ, или обоих соединений в культуру гиппокампальных клеток НТ-22

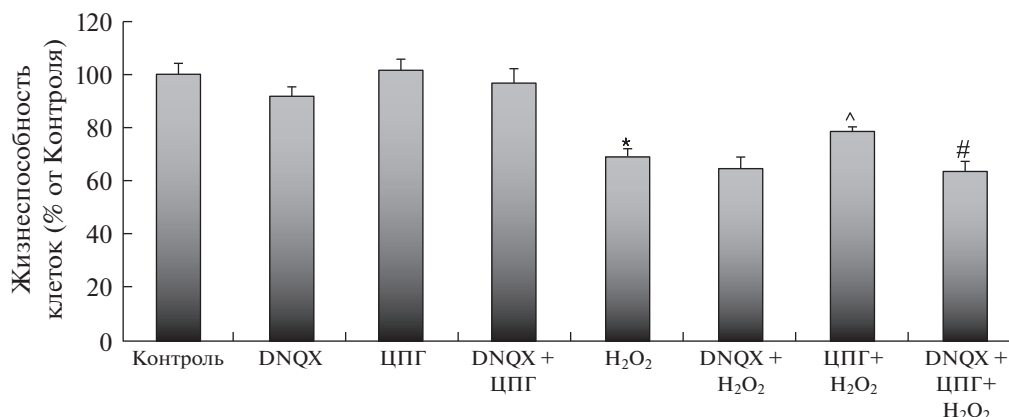


Рис. 2. Конкурентный антагонист AMPA-рецепторов DNQX снимает нейропротекторное действие ЦПГ на модели окислительного стресса. *— $p < 0.05$ по сравнению с группой “Контроль”, ^— $p < 0.05$ по сравнению с группой “H₂O₂”, #— $p < 0.05$ по сравнению с группой “ЦПГ+H₂O₂” (с использованием критерия Краскела–Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA)). Данные представлены в виде $m \pm s.d.$

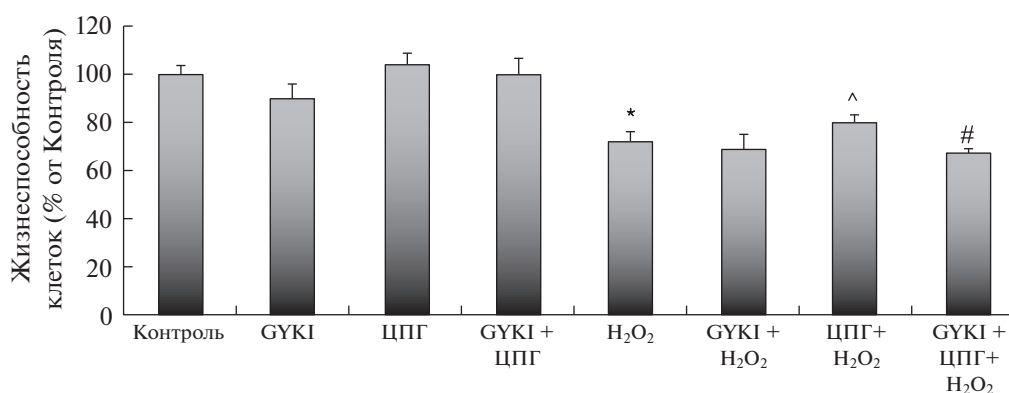


Рис. 3. Неконкурентный антагонист AMPA-рецепторов GYKI 52466 снимает нейропротекторное действие ЦПГ на модели окислительного стресса. *— $p < 0.05$ по сравнению с группой “Контроль”, ^— $p < 0.05$ по сравнению с группой “H₂O₂”, #— $p < 0.05$ по сравнению с группой “ЦПГ+H₂O₂” (с использованием критерия Краскела–Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA)). Данные представлены в виде $m \pm s.d.$

при отсутствии повреждающего агента не оказывало статистически значимого влияния на жизнеспособность нейронов (рис. 2). Внесение H₂O₂ снижало жизнеспособность клеток достоверно по сравнению с контролем. Внесение DNQX не влияло на повреждающий эффект перекиси водорода. ЦПГ достоверно восстанавливал жизнеспособность клеток, а его нейропротекторный эффект предотвращался внесением антагониста DNQX.

Аналогично, внесение неконкурентного антагониста AMPA-рецепторов GYKI 52466, ЦПГ или обоих соединений в культуру клеток HT-22 без повреждения не приводило к изменению жизнеспособности нейронов (рис. 3). Внесение GYKI 52466 не влияло на повреждающий эффект перекиси водорода. ЦПГ достоверно повышал жизнеспособность клеток в присутствии перекиси во-

дорода, чего не наблюдалось в случае предварительного внесения неконкурентного антагониста GYKI 52466.

Таким образом, можно полагать, что AMPA-рецепторы включены в механизмы нейропротекторной активности ЦПГ.

Блокатор Trk-рецепторов K-K252a и ЦПГ по отдельности или вместе не приводили к изменениям жизнеспособности в культуре клеток HT-22 (рис. 4). Соединение K252a не изменяло характера действия перекиси водорода. ЦПГ достоверно восстанавливал жизнеспособность клеток, что полностью снималось предварительным внесением K252a.

Полученные данные свидетельствуют в пользу участия BDNF/TrkB сигналинга в нейропротекторной активности ЦПГ.

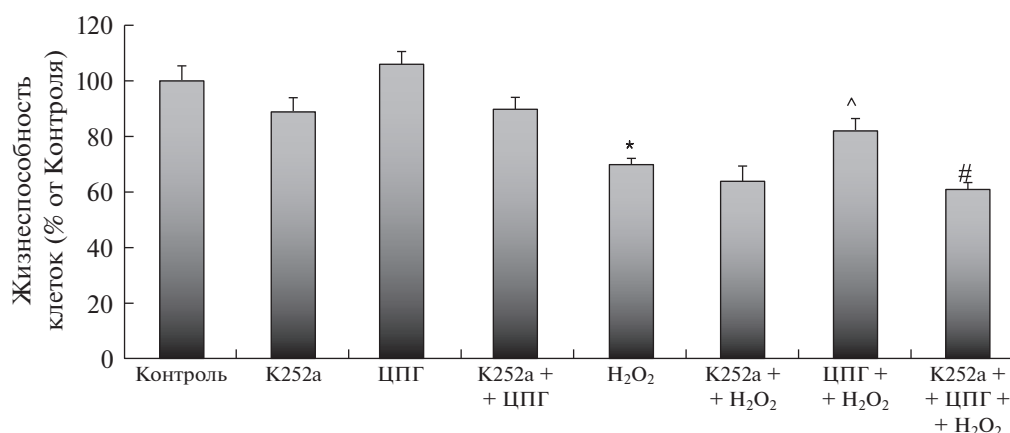


Рис. 4. Блокатор Trk-рецепторов K252a снимает нейропротекторное действие ЦПГ на модели окислительного стресса.

*— $p < 0.05$ по сравнению с группой “Контроль”, ^— $p < 0.05$ по сравнению с группой “H₂O₂”, #— $p < 0.05$ по сравнению с группой “ЦПГ+H₂O₂” (с использованием критерия Манна–Уитни).

Данные представлены в виде $m \pm s.d.$

Совокупность полученных результатов позволяет сделать заключение об участии опосредованного AMPA-рецепторами TrkB-зависимого сигналинга в нейропротекторном действии ЦПГ, который, вероятно, является эндогенным модулятором AMPA-рецепторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U., Maksimova F.V., et al. Proline-based topologic pyracetam analogs and their nootropic activity // *Pharm. Chem. J.* 1989. V. 23. P. 203–208.
2. Gudasheva T.A., Boyko S.S., Akparov V.Kh., et al. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain // *FEBS Letters.* 1996. V. 391. P. 149–152.
3. Kang D., Waldvogel H.J., Wang A., et al. The autocrine regulation of insulin-like growth factor-1 in human brain of Alzheimer's disease // *Psychoneuroendocrinology.* 2021 V. 127. P. 105191.
4. Gudasheva T.A., Konstantinopol'skii M.A., Ostrovskaya R.U., et al. Anxiolytic activity of endogenous nootropic dipeptide cycloprolylglycine in elevated plus-maze test // *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2001. V. 131. № 5. P. 464–466.
5. Колясников К.Н., Григорьев О.С., Аляева А.Г., Гудашева Т.А. Изучение вовлеченности TrkB-рецепторов в антигипоксическое действие нейропептида цикло-пролилглицина // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2022. Т. 25. № 1. С. 39–42.
6. Gudasheva T.A., Grigoriev V.V., Koliashnikova K.N., et al. Neuropeptide cycloprolylglycine is an endogenous positive modulator of AMPA receptors // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2016. V. 471. № 1. P. 387–389.
7. Lauteborn J.C., Lynch G., Vanderklish P., et al. Positive Modulation of AMPA Receptors Increases Neurotrophin Expression by Hippocampal and Cortical Neurons // *Journal of Neuroscience.* 2000. V. 20. № 1. P. 8–21.
8. Jourdi H., Hsu Y.-T., Zhou M., et al. Positive AMPA Receptor Modulation Rapidly Stimulates BDNF Release and Increases Dendritic mRNA Translation // *Journal of Neuroscience.* 2009. V. 29. № 27. P. 8688–8697.
9. Gudasheva T.A., Koliashnikova K.N., Antipova T.A., Sereidenin S.B. Neuropeptide cycloprolylglycine increases the levels of brain-derived neurotrophic factor in neuronal cells // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2016. V. 469, № 1. P. 273–276.
10. Ferro J.N., de Aquino F.L., de Brito R.G., et al. Cyclo-Gly-Pro, a cyclic dipeptide, attenuates nociceptive behaviour and inflammatory response in mice // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2015. V. 42. № 12. P. 1287–1295.
11. Schmidt H.D., Duman R.S. Peripheral BDNF Produces Antidepressant-Like Effects in Cellular and Behavioral Models // *Neuropsychopharmacology.* 2010. V. 35. P. 2378–2391.
12. Bathina S., Das U.N. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications // *Archives of Medical Science.* 2015. V. 11. № 6. P. 1164–1178.
13. Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Koliashnikova K.N., et al. The Anxiolytic Effect of the Neuropeptide Cycloprolylglycine Is Mediated by AMPA and TrkB Receptors // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2020 V. 493. № 1. P. 190–192.
14. Sheardown M.J., Nielsen E.O., Hansen A.J., et al. 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia // *Science.* 1990. V. 247. № 4942. P. 571–574.
15. Birch P.J., Grossman C.J., Hayes A.G. 6,7-Dinitro-quinoxaline-2,3-dione and 6-nitro,7-cyano-quinoxaline-2,3-dione antagonise responses to NMDA in the rat spinal cord via an action at the strychnine-insensitive gly-

- cine receptor // *European Journal of Pharmacology*. 1988. V. 156. № 1. P. 177–180.
16. *Sólyom S., Tarnawa I.* Non-competitive AMPA antagonists of 2,3-benzodiazepine type // *Current Pharmaceutical Design*. 2002. V. 8. № 10. P. 913–939.
17. *Jackson G.R., Werrbach-Perez K., Ezell E.L., Post J.F., Perez-Polo J.R.* Nerve growth factor effects on pyridine nucleotides after oxidant injury of rat pheochromocytoma cells // *Brain Research*. 1992. V. 592. № 1–2. P. 239–248.
18. *Ueda Y., Walsh E., Nakanishi H., Yoshida K.* A colorimetric assay method for the evaluation of neurotrophic activity in vitro // *Neuroscience Letters*. 1994. V. 165. P. 203–207.
19. *Chang J.H., Mellon E., Schanen N.C., Twiss J.L.* Persistent TrkA Activity Is Necessary to Maintain Transcription in Neuronally Differentiated PC12 Cells // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. V. 278. № 44. P. 42877–42885.
20. *Lee S.-H., Govindaiah G., Cox C.L.* Selective excitatory actions of DNQX and CNQX in rat thalamic neurons // *Journal of Neurophysiology*. 2010. V. 103. № 4. P. 1728–1734.
21. *Mathiesen C., Varming T., Jensen L.H.* In vivo and in vitro evaluation of AMPA receptor antagonists in rat hippocampal neurones and cultured mouse cortical neurones // *European Journal of Pharmacology*. 1998. V. 353. № 2–3. P. 159–167.

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF CYCLOPROLYLGLYCINE NEUROPEPTIDE DEPENDS ON AMPA- AND TRKB-RECEPTOR ACTIVATION

**Corresponding Member of the RAS T. A. Gudasheva^{a, #}, K. N. Koliashnikova^a, A. G. Alyaeva^a, S. V. Nikolaev^a,
T. A. Antipova^a, and Academician of the RAS S. B. Seredenin^a**

^a *V. V. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russian Federation*

[#] *e-mail: tata-sosnovka@mail.ru*

Previously, we have shown that the endogenous neuropeptide cycloprolylglycine (CPG) is the positive modulator of AMPA receptors, and we have revealed the dependence of its anxiolytic and antihypoxic action on BDNF/Trk signaling. In the present work we conducted for the first time in vitro experiments using AMPA receptor blockers: DNQX and GYKI 52466, and Trk receptor blocker K252A, that revealed the neuroprotective effect of CPG depends on the activation of both AMPA and Trk receptors.

Keywords: cycloprolylglycine, neuroprotective activity, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), AMPA