

© Коллектив авторов, 2016

Т. А. Гудашева, К. Н. Колясникова, Е. А. Кузнецова, С. А. Литвинова,
Н. Н. Золотов, Т. А. Воронина, Р. У. Островская, С. Б. Середенин

ЭТИЛОВЫЙ ЭФИР *N*-ФЕНИЛАЦЕТИЛ-ГЛИЦИЛ-*L*-ПРОЛИНА МЕТАБОЛИЗИРУЕТСЯ ДО ЦИКЛО-*L*-ПРОЛИЛГЛИЦИНА, ПРОЯВЛЯЯ СХОДНЫЙ СПЕКТР НЕЙРОПСИХОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ

ФГБНУ "НИИ фармакологии им. В. В. Закусова", Россия, 125315, Москва, Балтийская ул., д. 8.

Ранее сконструированный в качестве пептидного прообраза пираретама цикло-*L*-пролилглицин (ЦПГ) обнаружен нами в мозге крыс в качестве эндогенного соединения, обладающего свойствами ноотропа и анксиолитика. В настоящей работе синтезирован этиловый эфир *N*-фенилацетилглицил-*L*-пролина (ГЗК-111). Показано, что ГЗК-111 метаболизируется до ЦПГ и проявляет ноотропную, анксиолитическую и антигипоксическую виды активности, характерные для ЦПГ, в дозах 0,1 – 1,5 мг/кг внутривнутрибрюшинно. Эффекты ГЗК-111, как и ЦПГ, стереоселективны. Активны только *L*-энантиомеры. ГЗК-111 рассматривается как пролекарство, стимулирующее когнитивные функции, с анксиолитическим компонентом действия.

Ключевые слова: цикло-пролилглицин; замещенный глипролин; ноотропная активность; анксиолитическая активность; антигипоксическая активность; стереоспецифичность фармакологического эффекта; пролекарство.

Цикло-*L*-пролилглицин (ЦПГ) был сконструирован как предполагаемый пептидный прообраз классического ноотропного препарата пираретама [1]. ЦПГ оказался подобен пираретама не только по структуре, но и по основным фармакологическим эффектам, и при системном введении обладал ноотропной [2], анксиолитической [3, 4], антигипоксической [5] и нейропротективной [5, 6] активностью в дозах, в 100 – 1000 раз меньших, чем пираретам. Позднее ЦПГ был обнаружен в мозге интактных крыс как эндогенное соединение в микромолярной концентрации [7]. Фармакологические исследования выявили его свойства регулятора памяти и тревоги [8].

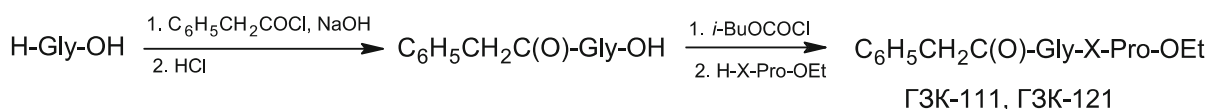
При изучении биотрансформации сконструированного ранее в НИИ фармакологии им. В. В. Закусова оригинального ноотропного препарата ноопепта — этилового эфира *N*-фенилацетил-*L*-пролилглицина [9 – 12] — ЦПГ был обнаружен в крови и мозге крыс в качестве его основного метаболита, который, по-видимому, образуется при энзиматическом отщеплении фенилацетильного радикала с последующей внутримолекулярной циклизацией [13].

Известно [14, 15], что наличие имидной связи при пролине, которая имеет место в дипептидной последо-

вательности Gly-Pro и отсутствует в Pro-Gly, увеличивает долю цисоидной пептидной связи. Цисоидная конформация дипептида Gly-Pro, в свою очередь, способствует его циклизации [16, 17]. Мы предположили, что проявление эффектов ЦПГ может быть более выражено у замещенного дипептида с последовательностью Gly-Pro, чем у ноопепта, содержащего последовательность Pro-Gly.

Для подтверждения этой гипотезы в данной работе мы синтезировали замещенный глипролин — этиловый эфир *N*-фенилацетил-глицил-*L*-пролина (ГЗК-111), подтвердили образование ЦПГ при метаболизме ГЗК-111 в присутствии ферментов плазмы крови и показали наличие у ГЗК-111 стереоспецифичной ноотропной, анксиолитической и антигипоксической видов активности, характерных для ЦПГ.

Энантиомеры этилового эфира *N*-фенилацетилглицилпролина получали (схема) методом смешанных ангидридов с использованием изобутилхлорформиата в условиях Андерсона [18]. В качестве карбоксильной компоненты использовали *N*-фенилацетилглицин, полученный из глицина и хлорангидрида фенилуксусной кислоты по Шоттен — Бауману [19], а в качестве аминокислоты — соответствующий энантиомер эти-



ГЗК-111: X = L; ГЗК-121: X = D

Схема. Синтез энантиомеров этилового эфира *N*-фенилацетилглицилпролина.

Таблица 1
Эффекты соединений ГЗК-111 и ГЗК-121 в тесте УРПИ на крысах

Соединение	Доза, мг/кг, внутрибрюшинно	Латентный период, с			Активность, %
		контроль	амнезия	амнезия + соединение	
<i>L</i> -ЦПГ [2]	0,05	91 ± 34	19 ± 8°	25 ± 7	+ 8
	0,1	91 ± 34	19 ± 8°	73 ± 26*	+ 75*
	1,0	91 ± 34	19 ± 8°	43 ± 19*	+ 33*
<i>D</i> -ЦПГ [22]	0,1	113 ± 12	48 ± 11°	27 ± 8*	- 32*
ГЗК-111	0,1	180 ± 0	129 ± 28°	169 ± 10*	+ 76*
	0,5	180 ± 0	100 ± 25°	176 ± 6*	+ 95*
	1,0	180 ± 0	129 ± 28°	179 ± 2*	+ 98*
ГЗК-121	0,5	180 ± 0	95 ± 31°	133 ± 23	+ 44

° $p < 0,05$ относительно контроля (U-тест);

* $p < 0,05$ относительно группы животных, получивших амнезию (U-тест);

в каждой группе было не менее 10 животных.

лового эфира пролина, которые получали в абсолютном этаноле в присутствии хлористого тионила по методу Бреннера [20].

Была изучена биотрансформация синтезированного ГЗК-111 ферментами крови *in vitro*. Исходная плазма содержала эндогенный ЦПГ в концентрации 1 мкМ (рассчитано с использованием калибровочной кривой). При инкубации ГЗК-111 с плазмой при 37 °С в течение 10 ч по данным обращеннофазовой (ОФ) ВЭЖХ наблюдалось образование дополнительного количества ЦПГ и соединения с открытой карбоксильной группой, *N*-фенилацетилглицил-*L*-пролина (см. рисунок). Других метаболитов найдено не было. Таким образом, в присутствии ферментов плазмы крови из ГЗК-111 действительно образуется ЦПГ.

Исходя из ранее установленных фармакологических эффектов ЦПГ, была изучена нейрорепрессивная активность ГЗК-111: антиамнестическая, анксиолитическая и антигипоксическая.

Антиамнестическое действие ГЗК-111 оценивали по его способности предотвращать нарушение воспроизведения условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ), вызываемое электроконвульсивным шоком (ЭКШ) по методу Ader [21]. Проведенные исследования показали, что ГЗК-111 обладает антиамнестической активностью в дозах 0,1; 0,5 и 1 мг/кг внутрибрюшинно (см. табл. 1), т.е. по крайней мере в том же интервале доз, что и ЦПГ. Стереоизомер этиловый эфир *N*-фенилацетилглицил-*D*-пролина (ГЗК-121), в отличие от *L*-изомера, не обладал антиамнестической активностью.

Анксиолитическую активность ГЗК-111 изучали в дозах 0,75; 1,5 и 3 мг/кг с использованием метода приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) по Pellow [23]. Достоверный анксиолитический эффект наблюдался в дозе 1,5 мг/кг внутрибрюшинно. ГЗК-111 увеличивал время пребывания крыс в открытых рукавах в 12 раз по сравнению с контролем, что сравнимо с эффектом ЦПГ. Энантиомер ГЗК-121 в дозе 1,5 мг/кг был неактивен (см. табл. 2).

Антигипоксическая активность ГЗК-111 изучена в тесте нормобарической гипоксии с гиперкапнией [23] в дозах 0,1; 0,5 и 1 мг/кг при внутрибрюшинном введении за 60 мин до тестирования. Выявлено, что соединение ГЗК-111, как и ЦПГ, проявляет антигипоксический эффект в дозе 0,5 мг/кг внутрибрюшинно, достоверно увеличивая продолжительность жизни животных (см. табл. 3). Стереоизомер ГЗК-121 в дозах 0,1, 0,5 и 1 мг/кг в этом тесте не проявлял антигипоксической активности.

Эффекты ГЗК-111 и ГЗК-121 в тесте ПКЛ на крысах

Таблица 2

Соединение	Доза, мг/кг, внутрибрюшинно	Число заходов в открытые рукава		Время пребывания в открытых рукавах	
		<i>n</i>	%	<i>c</i>	%
<i>L</i> -ЦПГ [3]	контроль 1	0,20	100	2,15	100
	0,1	1,79*	895*	13,8*	641*
	1,0	0,25	125	1,46	68
	контроль 2	0,58	100	6,38	100
	0,05	1,60**	276**	57,4**	900**
	0,2	1,50	259	19,3	303
<i>D</i> -ЦПГ [3]	контроль	0,20	100	2,15	100
	0,05	0,34	170	3,87	180
	0,1	0,26	132	2,58	120
ГЗК-111	контроль	0,9 ± 0,6	100	4,8 ± 2,5	100
	0,75	1,3 ± 0,5	170	14,8 ± 7,0	180
	1,50	3,2 ± 1,1	355	58,2 ± 13,3**	1212**
	3,0	1,0 ± 0,5	132	6,4 ± 2,9	120
ГЗК-121	контроль	0,2 ± 0,2	100	4,1 ± 1,5	100
	1,5	0,2 ± 0,2	100	4,7 ± 1,5	114

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем (U-тест); в каждой группе было по 10 животных.

Таким образом, ГЗК-111 можно рассматривать как “пролекарство” ЦПГ. Он проявляет характерные для последнего ноотропную, анксиолитическую и антигипоксическую активность. Эти виды активности ГЗК-111, как и ЦПГ, проявляет стереоселективно. ГЗК-111 может стать основой для развития нового дипептидного ноотропа и анксиолитика.

Экспериментальная химическая часть

В работе использовали коммерческие аминокислоты (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. ^1H ЯМР-спектры регистрировали в растворах диметилсульфоксида- d_6 (DMCO- d_6) или DMCO- d_6 — CF_3COOD в шкале δ , м.д. (J, Гц) на спектрометре AC-250 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 250 МГц и 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 бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:1 (А), 2-пропанол — водный аммиак 7:3 (Б), диоксан — вода 9:1 (В). Аминосодержащие соединения обнаруживали нингидрином, соединения с амидными группами — в парах йода, соединения с открытой карбоксильной группой — бромкрезоловым зеленым, содержащие ароматические группы — в УФ-лучах. Элементный анализ проводили на приборе для определения углерода и водорода с 4 электрическими печами (600 – 900 °С, тип МА-Г/6Р, завод ЛЭТО, Россия) в токе кислорода и на аппарате для определения азота с 3 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 %.

Для ВЭЖХ в качестве стандартов использовали цикло-*L*-пролилглицин и *N*-фенилацетилглицил-*L*-пролин, синтезированные в отделе химии лекарственных средств НИИ фармакологии им. В. В. Закусова.

$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-C(O)-Gly-OH}$. К раствору 7,5 г (100 ммоль) глицина в 25 мл 4 М NaOH при – 10 °С при интенсивном перемешивании прибавляют 13,24 мл (100 ммоль) фенилацетилхлорида и 25 мл 4 М NaOH. Далее реакционную смесь перемешивают при охлаждении в течение 30 мин, потом снимают внешнее охлаждение и экстрагируют примеси и непрореагировавший хлорангидрид этилацетатом (3 × 15 мл). Затем раствор подкисляют 4 М HCl до pH 2 – 3 по универсальному индикатору, выпавший осадок отфильтровывают, промывают водой и сушат на воздухе в течение 1 сут. Получают 5,83 г (30 %) *N*-фенилацетилглицина; т. пл. 143 – 144 °С; R_f 0,8 (А). ПМР-спектр (DMCO- d_6 + CF_3COOD) δ , м.д.: 3,47 (с, 2H, CH_2Ar), 3,76 (д, J 6,0 Гц, 2H, CH_2Gly), 7,27 (м, 5H, ArH), 8,40 (т, J 6,0 Гц, 1H, NH Gly). Лит. данные [26]: т. пл. 138 – 143 °С.

$\text{H-L-Pro-OC}_2\text{H}_5 \cdot \text{HCl}$. К 60 мл абсолютного этанола, охлажденного до – 20 °С, прибавляют по каплям 2,54 мл (35 ммоль) тионилхлорида и порциями вносят 2 г (17,5 ммоль) *L*-пролина. Далее реакционную смесь перемешивают в течение 2 ч при – 5 °С и 2 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляют в вакууме; эту операцию повторяют дважды, каждый раз добавляя 30 мл абсолютного этанола. Получают 2,4 г (77 %) хлоргидрата этилового эфира *L*-пролина в виде масла. $[\alpha]_{\text{D}}^{23} - 43^\circ$ (с 3, этанол); R_f 0,75 (Б). ПМР-спектр (DMCO- d_6) δ , м.д.: 1,19 (м, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1,8 – 2,1 (м, 4H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2\text{Pro}$, $\text{C}^\beta\text{H}_2\text{Pro}$), 3,2 (м, 2H, $\text{C}^\delta\text{H}_2\text{Pro}$), 4,2 (м, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4,5 (м, 1H, $\text{C}^\alpha\text{H Pro}$), 9,9 (уш.с., 1H, NH). Лит. данные [27]: масло; $[\alpha]_{\text{D}}^{23} - 44,8^\circ$ (с 3,03, этанол).

$\text{H-D-Pro-OC}_2\text{H}_5 \cdot \text{HCl}$. Получают аналогично *H-L-Pro-OC}_2\text{H}_5 \cdot \text{HCl} из *D*-пролина. $[\alpha]_{\text{D}}^{23} + 42,0^\circ$ (с 3, этанол); R_f 0,75 (Б). ПМР-спектр (DMCO- d_6) δ , м.д.: 1,18 (м, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1,8 – 2,1 (м, 4H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2\text{Pro}$, $\text{C}^\beta\text{H}_2\text{Pro}$), 3,19 (м, 2H, $\text{C}^\delta\text{H}_2\text{Pro}$), 4,2 (м, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4,5 (м, 1H, $\text{C}^\alpha\text{H Pro}$), 9,9 (уш.с., 1H, NH). Лит. данные [27]: масло; $[\alpha]_{\text{D}}^{23} + 44,16^\circ$ (с 3,03, этанол).*

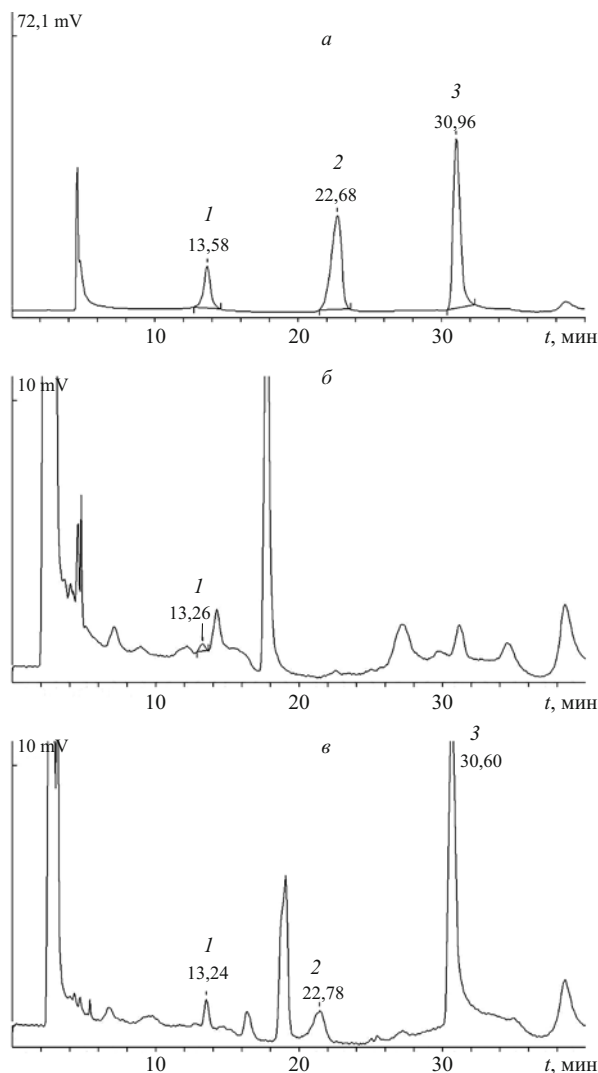
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-C(O)-Gly-L-Pro-OEt}$ (ГЗК-111). 1,93 г (10 ммоль) *N*-фенилацетилглицина растворяют в 10 мл сухого диметилформамида (DMФА). При – 10 °С при интенсивном перемешивании одновременно прибавляют 1,35 мл (10 ммоль) изобутилхлорформиата и

Таблица 3
Эффекты соединений ГЗК-111 и ГЗК-121 в тесте нормобарической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме на мышах

Соединение	Доза, мг/кг внутривенно			
	контроль	0,1	0,5	1,0
Время жизни, мин				
<i>L</i> -ЦПГ [5]	20,9 ± 0,6	20,2 ± 0,8	24,0 ± 0,7*	25,0 ± 1,6**
<i>D</i> -ЦПГ [25]	21,8 ± 1,7	23,3 ± 1,5	22,7 ± 0,5	22,3 ± 1,4
ГЗК-111	27,1 ± 0,9	25,2 ± 0,5	30,2 ± 0,7*	26,2 ± 0,3
ГЗК-121	25,8 ± 0,8	23,9 ± 0,7	26,0 ± 0,7	23,5 ± 0,8

Опыты выполнены на белых беспородных мышах-самцах. В каждой группе было не менее 10 животных.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем (U-тест).



Изучение метаболизма ГЗК-111 в плазме крови методом ВЭЖХ. а) Стандарты: 1 — цикло-*L*-пролилглицин, 2 — *N*-фенил-ацетилглицил-*L*-пролин, 3 — ГЗК-111. б) Контрольная плазма крови. в) Плазма крови + ГЗК-111, инкубация 10 ч.

1,1 мл (10 ммоль) *N*-метилморфолина. После 2–3 мин перемешивания прибавляют по каплям раствор 1,79 г (10 ммоль) хлоридата этилового эфира пролина и 1,1 мл (10 ммоль) *N*-метилморфолина в 15 мл ДМФА. Реакционную смесь перемешивают 30 мин при $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, далее снимают внешнее охлаждение и перемешивают 1 ч при комнатной температуре. Осадок отфильтровывают, фильтрат упаривают в вакууме, остаток растворяют в 25 мл CHCl_3 , раствор последовательно промывают 3 % NaHCO_3 (3×7 мл), водой (3×7 мл), 1 М раствором HCl (3×7 мл) и вновь водой (3×7 мл), сушат над сульфатом натрия, осушитель отфильтровывают, фильтрат упаривают на роторном испарителе. Получают 2,87 г (90 %) хроматографически гомогенного продукта в виде масла оранжевого цвета, кристаллизуют из смеси этилацетата и диэтилового эфира. Т. пл. $111 - 112\text{ }^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D^{23} - 90,0^{\circ}$ (с 1, вода); $R_f = 0,80$ (В). ПМР-спектр (DMSO-d_6) δ , м.д.: 1,2 (м, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1,8–2,1 (м, 4H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Pro, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Pro), 3,5 (с, 2H, CH_2ArH), 3,6 (м, 2H, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Pro), 3,85–4,0 (2

дд, J 17,6 Гц, J 5,6 Гц, 2H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$ Gly), 4,2 (м, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4,5 (дд, J 4,0 Гц, J 8,5 Гц, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Pro), 6,4 (уш. т, J 5,6 Гц, 1H, NH), 7,3 (м, 5H, ArH). $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$.

$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-C(O)-Gly-D-Pro-OEt}$ (ГЗК-121). Получают аналогично *L*-энантиомеру. Выход 64 %. Т. пл. $112 - 113\text{ }^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D^{23} + 90,0^{\circ}$ (с 1, вода); $R_f = 0,80$ (В). ПМР-спектр (DMSO-d_6) δ , м.д.: 1,2 (м, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1,85–2,2 (м, 4H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Pro, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Pro), 3,5 (с, 2H, CH_2Ar), 3,6 (м, 2H, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Pro), 3,86 и 4,0 (2 дд, J 17,6 Гц, J 5,6 Гц, 2H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$ Gly), 4,2 (м, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4,5 (дд, J 4,0 Гц, J 8,5 Гц, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Pro), 6,4 (уш. т, J 5,6 Гц, 1H, NH), 7,3 (м, 5H, Ar). $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$.

Экспериментальная биологическая часть

Изучение биологической активности *in vivo* проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 200–270 г (ноотропное и анксиолитическое действие) и белых беспородных мышках-самцах массой 25–28 г (антигипоксическое действие) (питомник “Столбовая”). Животных содержали в виварии при свободном доступе к пище и воде. Соблюдались этические правила гуманного обращения с животными, изложенные в директивах Совета европейского сообщества 86/609/ЕЕС. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 351.000.3-96 и 51000.4-96), приказу МЗ РФ № 276 от 19.06.2003 г. Эксперименты проводили с 10.00 до 16.00 ч. Животных помещали в экспериментальную комнату за 3–4 ч до начала опыта. Испытуемые вещества растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривентриально. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор (0,9 % водный раствор NaCl).

Антиамнестическое действие веществ оценивали по их способности предотвращать нарушение воспроизведения УРПИ, вызываемое ЭКШ. Соединения ГЗК-111 и ГЗК-121 вводили однократно внутривентриально в дозах 0,1; 0,5 и 1 мг/кг за 40 мин до обучения. Контрольным животным в таком же объеме вводили физиологический раствор.

УРПИ вырабатывали по описанной ранее методике [21, 2] в сертифицированной установке “Lafayette Instrument Co” (США) у крыс в соответствии с методом однократного обучения. Освещенная стартовая платформа имела размеры 25×7 см и соединялась с темной камерой размером $40 \times 40 \times 40$ см через квадратную гильотинную дверь. Темная камера оборудована электрифицированным полом. Животных помещали на стартовую платформу хвостом к темной камере. Когда вследствие норкового рефлекса после нахождения входа крыса переходила в темный отсек, отверстие закрывали. В темной камере крысе через пол наносили 8 неустрашимых электроболевыми стимулов (сила обучающего тока 0,45 мА, длительность каждого импульса составляла 1 с, интервал между последовательными импульсами — 2 с). Немедленно после этого крысу извлекали из темной камеры и подвергали

ЭКШ (250 вольт, 120–122 мА, 0,1 с), наносимому транскорнеально с использованием сертифицированного прибора “Harvard apparatus” (Германия). Через 24 ч животное вновь помещали на освещенную платформу для тестирования обученности. Регистрировали латентный период первого захода животного в темную камеру. Антиамнестическую активность (АА) рассчитывали по формуле:

$$AA \% = \frac{ЛП_{оп} - ЛП_{амн}}{ЛП_{кон} - ЛП_{амн}} \times 100 \%,$$

где АА % — антиамнестическая активность; ЛП_{оп} — средний латентный период захода в камеру при воспроизведении УРПИ у животных, получивших исследуемое соединение и подвергнутому амнезирующему воздействию; ЛП_{амн} — средний период захода в камеру при воспроизведении УРПИ у животных, получивших 0,9 % NaCl и подвергнутому амнезирующему воздействию; ЛП_{кон} — средний латентный период захода в камеру при воспроизведении УРПИ у животных, получивших 0,9 % NaCl и не подвергнутому амнезирующему воздействию.

Анксиолитическую активность изучали с использованием методики приподнятого крестообразного лабиринта по Pellow, которая является базисным тестом и широко используется при поиске и изучении веществ с анксиолитической активностью как в России, так и за рубежом [23, 3, 28]. Соединения вводили однократно внутрибрюшинно за 15 мин до эксперимента. Соединение ГЗК-111 вводили в дозах 0,75; 1,5 и 3 мг/кг, соединение ГЗК-121 — в дозе 1,5 мг/кг. Контрольным животным вводили физиологический раствор.

В исследовании использовали тест ПКЛ в базовой модификации [23], который имел следующие характеристики: длина каждого из 4 рукавов лабиринта составляла 50 см, их ширина — 14 см, высота бортиков 2 противоположных закрытых рукавов — 30 см, бортики были светонепроницаемы, центральная площадка 14 × 14 см, лабиринт приподнят над полом на высоту 60 см. В начале опыта крыс помещали в центр лабиринта, случайным образом ориентируя их относительно входа в рукав. Поведение животных оценивали в течение 5 мин. Регистрировали следующие показатели: число заходов во все рукава, число заходов в открытые рукава, время пребывания во всех рукавах, время пребывания в открытых рукавах. Анксиолитический эффект препарата оценивается по увеличению числа заходов в светлые рукава и времени нахождения в них и на центральной площадке.

Антигипоксическая активность изучена на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией (“баночная” гипоксия), согласно [24]. Исследования проводили на животных одинаковой массы (разброс в группах не более 2 г). Каждая группа состояла из 10 животных. Вещества вводили внутрибрюшинно в виде раствора в 0,9 % NaCl за 1 ч до начала эксперимента. Антигипоксическую активность соединений

изучали в дозах 0,1; 0,5 и 1 мг/кг внутрибрюшинно. Животные контрольной группы получали эквивалентный объем физиологического раствора. Далее животных помещали по одному в банки объемом 200 см³ и герметически закрывали. Гибель животного регистрировали по последнему агональному вдоху.

Статистический анализ результатов биологической части исследования проводили с помощью стандартного пакета программ “Statistica 10.0” (Statsoft, Inc., США). Для оценки статистически значимых различий между экспериментальными и контрольными группами животных использовали непараметрический *U*-критерий Манна — Уитни. Результаты оценивали как значимые при $p \leq 0,05$. Рассчитывали средние показатели по группе и стандартные ошибки средней ($m \pm SEM$).

Метаболизм ГЗК-111

Получение плазмы крови. Использовали плазму крови беспородных крыс-самцов массой 250–280 г. Животных декапитировали, кровь собирали в пробирки BD Vacutainer® с ЭДТА, плазма получена центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин.

Инкубация и экстракция. Раствор 3 мг ГЗК-111 в 100 мкл физиологического раствора добавляли к 900 мкл плазмы крови крысы. Смесь инкубировали при 37 °С на водяной бане в течение 10 ч. Затем к 100 мкл инкубационной смеси добавляли равный объем ацетонитрила, образцы интенсивно встряхивали в течение 10 мин, центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин, супернатант отбирали и далее хроматографировали.

ОФ ВЭЖХ. Разделение проводили на хроматографе Gilson 41 (Gilson, США) с УФ-детектором Gilson 116 (Gilson, США), детектирование — при 220 нм. Использовали колонку Nucleosil C18 (4,6 × 150 мм, 5 мкм), скорость потока 0,5 мл/мин. Объем пробы составлял 20 мкл. В качестве элюентов использовали: раствор А — 3,7 мМ 1-гексансульфоната натрия/вода (рН 3,5) и раствор В — 3,7 мМ 1-гексансульфоната натрия/40 % ацетонитрил. Элюцию проводили в градиенте по следующей программе: 1) 0 % В в течение 3 мин; 2) от 0 до 100 % В за 20 мин; 3) 100 % В в течение 6 мин. Сигнал регистрировали с использованием программы “Мультихром 1.5” (Амперсенд, РФ).

Калибровочная кривая. Стандартные растворы синтетического цикло-пролилглицина приготовлены в ацетонитриле в следующих концентрациях 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 и 3,2 мг/л. По 20 мкл этих растворов хроматографировали в условиях ОФ ВЭЖХ, описанных выше. Калибровочная кривая была рассчитана, исходя из площадей пиков.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант 15-04-04485.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Гудашева, Н. И. Василевич, Н. Н. Золотов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **25**(6), 12–16 (1991); *Pharm. Chem. J.*, **25**(6), 363–367 (1991).

2. Т. А. Гудашева, Р. У. Островская, С. С. Трофимов и др., *Бюл. эксперим. биол. мед.*, **116**(10), 411 – 413 (1999).
3. Т. А. Гудашева, М. А. Константинопольский, Р. У. Островская, С. Б. Середенин, *Бюл. эксперим. биол. мед.*, **131**(5), 547 – 550 (2001).
4. С. Б. Середенин, Т. А. Гудашева, С. С. Бойко и др., *Бюл. эксперим. биол. мед.*, **133**(4), 417 – 419 (2002).
5. К. Н. Колясникова, Т. А. Гудашева, Г. А. Назарова и др., *Эксперим. клин. фармакол.*, **75**(9), 3 – 6 (2012).
6. П. Ю. Поварнина, К. Н. Колясникова, С. В. Николаев и др., *Бюл. эксперим. биол. мед.*, **160**(11), 600 – 603 (2015).
7. Т. А. Gudasheva, S. S. Boyko, V. Kh. Akparov, et al., *FEBS Let.*, **391**, 149 – 152 (1996).
8. Т. А. Гудашева, *Вестник РАМН*, № 7, 8 – 16 (2011).
9. Т. А. Гудашева, *Изв. АН. Сер. Хим.*, № 9, 2012 – 2021 (2015).
10. Патент РФ 2119496 (1998); *Бюл. изобрет.*, № 27 (1998).
11. US Patent № 5,439,930 (1995).
12. Т. А. Gudasheva, T. A. Voronina, R. U. Ostrovskaya, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **31**(2), 151 – 157 (1996).
13. Т. А. Gudasheva, S. S. Boyko, R. U. Ostrovskaya, et al., *J. Drug Metab. Pharmacokinetics*, **22**(3), 245 – 252 (1997).
14. Yu. A. Ovchinnikov and V. T. Ivanov, *Tetrahedron*, **31**, 2177 – 2209 (1975).
15. H. A. Baldoni, and G. N. Zamarbide, and R. D. Enriz, et al., *J. Molec. Struct. (Theochem)*, **500**, 97 – 111 (2000).
16. H. N. Rydon and P. W. G. Smith, *J. Chem. Soc.*, **1956**, 3642 – 3650 (1956).
17. S. Manabe, H. Machida, Y. Aihara, et al., *Med. Chem. Commun.*, **4**(5), 792 – 796 (2013).
18. G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, and F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 5012 – 5017 (1967).
19. E. Baumann, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **19**, 3218 – 3222 (1886).
20. M. Brenner and W. Huber, *Helv. Chim. Acta*, **36**, 1109 – 1115 (1959).
21. R. Ader, J. A. W. M. Weinen and P. Moleman, *Psychonomic Sci.*, **26**(3), 125 – 128 (1972).
22. К. Н. Колясникова, М. В. Вичужанин, М. А. Константинопольский и др., *Хим.-фарм. журн.*, **46**(2), 31 – 37 (2012); *Pharm. Chem. J.*, **46**(2), 96 – 102 (2012).
23. S. Pellow, P. Chopin, S. E. File, et al., *J. Neurosci. Methods*, **14**, 149 – 167 (1985).
24. Т. А. Воронина, Р. У. Островская, Т. Л. Гарибова, *Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Миронов А. Н. (ред.), Издание ФГБУ “НЦЭМСП” Минздрава России, Москва (2012), т. 1, сс. 276 – 296.
25. К. Н. Колясникова, Г. А. Назарова, Т. А. Гудашева и др., *Бюл. эксперим. биол. мед.*, **158**(10), 457 – 460 (2014).
26. D. W. Young, D. J. Morecombe and P. K. Sen, *Eur. J. Biochem.*, **75**, 133 – 147 (1977).
27. Л. С. Назарова, Ю. Б. Розанов, А. М. Лихошерстов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **18**(12), 1445 – 1448 (1984); *Pharm. Chem. J.*, **18**(12), 811 – 815 (1984).
28. Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, М. А. Яркова, М. А. Воронин, *Методические рекомендации по доклиническому изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия лекарственных средств; “Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств”*, Миронов А. Н. (ред.), ФГБУ “НЦЭМСП” Минздрава России, Москва (2012), т. 1, сс. 264 – 275.

Поступила 15.06.16

N-PHENYLACETYL-GLYCYL-L-PROLINE ETHYL ESTER CONVERTS INTO CYCLO-L-PROLYL-GLYCINE SHOWING A SIMILAR SPECTRUM OF NEUROPSYCHOTROPIC ACTIVITY

T. A. Gudasheva, K. N. Kolyasnikova, E. A. Kuznetsova, S. A. Litvinova, N. N. Zolotov, T. A. Voronina, R. U. Ostrovskaya, and S. B. Seredenin

V. V. Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia

Previously designed as peptide prototype of piracetam, cyclo-(prolyl-glycine) (CPG) was discovered as an endogenous compound in rat brain and found to exhibit nootropic and anxiolytic properties. In the present work, N-phenylacetyl-glycyl-L-proline ethyl ester (GZK-111) was synthesized. It is established that GZK-111 converts to CPG and possesses nootropic, anxiolytic and antihypoxic activities typical of CPG at doses 0.1 – 1.5 mg/kg (i.p.). Effects of both GZK-111 and CPG are stereoselective, and only L-enantiomers are active. GZK-111 can be considered as a prodrug with cognitive enhancer function and anxiolytic action component.

Keywords: cyclo-prolyl-glycine; substituted glyproline; nootropic activity; anxiolytic activity; antihypoxic activity; stereospecificity of pharmacological effect; prodrug.