

УДК 577.1/3

ПЕПТИД МИСТИКСИН-7 ПРОТЕКТИРУЕТ ИОНОТРОПНЫЕ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ОТ ГЛУТАМАТ-ВЫЗВАННОЙ ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ. ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO

Мокрушин А.А.*ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, e-mail: mok@inbox.ru*

Избыточная концентрация глутамата вызывает гиперактивацию ионотропных глутаматных рецепторов, которая лежит в основе многих неврологических заболеваний. Целью данного исследования было изучение протективных эффектов синтетического кортикотропин-релизинг-фактора (КРФ) – производного пептида – мистиксин-7 (МТН) на модели глутаматной эксайтотоксичности *in vitro*. Методика on-line регистрации возбуждающих постсинаптических глутаматергических механизмов, активируемых α -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовой кислотой (АМПА) и N-метил-D-аспаратом (НМДА), использовалась для непрерывного мониторинга активности этих рецепторных механизмов в срезах обонятельной коры крыс линии Вистар. Апликация L-глутамата в токсической концентрации (20 мМ) на срезы вызывала гиперактивацию НМДА рецепторов и небольшую активацию АМПА рецепторов. При дальнейшем действии агониста гиперактивация глутаматных рецепторов прекращалась и наступала их необратимая блокада. Предварительная обработка срезов МТН в концентрации 50 мг/мл протектировала активности АМПА и НМДА рецепторных механизмов от глутамат-вызванного необратимого нарушения. Энзиматическая обработка МТН снижала, но не устраняла гиперактивацию активностей АМПА и НМДА рецепторов на апликацию L-глутамата. Настоящее исследование продемонстрировало, что МТН протектировал функционирование АМПА и НМДА рецепторных механизмов от глутаматной эксайтотоксичности. МТН является перспективным пептидом для разработки класса препаратов для лечения неврологических заболеваний.

Ключевые слова: пептид мистиксин-7, L-глутамат, АМПА рецепторы, НМДА рецепторы, эксайтотоксичность

PEPTIDE MYSTIXIN-7 PROTECTS IONOTROPIC GLUTAMATERGIC MECHANISMS AGAINST GLUTAMATE-INDUCED EXCITOTOXICITY. STUDY IN VITRO

Mokrushin A.A.*Federal State Institution of Science Pavlov Institute of Physiology of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, e-mail: mok@inbox.ru*

Hyperactivation of the N-methyl-D-aspartic acid type glutamate receptors (NMDAR) causes glutamate excitotoxicity, a process potentially important for many neurological diseases. This study aims to investigate protective effects of the synthetic corticotrophin-releasing factor-like peptide, mystixin-7 (MTX) on model glutamate-induced excitotoxicity *in vitro*. The technique on-line monitoring of electrophysiological parameters (excitatory glutamatergic α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic (AMPA) and NMDAR-dependent postsynaptic mechanisms) in the olfactory cortex slices was used. Application of L-glutamate in toxic concentration (20 mM) on slices evoked hyperactivation of NMDAR and weaker activation of the AMPAR. Upon further action agonist, the excessive activation of glutamate receptors was replaced by their irreversible blockade. Pretreatment of the slices using MTX in concentration 50 mg/mL protected the both NMDAR and AMPAR from glutamate-induced damage. An enzymatic treatment of MTX reduced but does not eliminated hyperactivation of the both NMDAR and AMPAR on application of L-glutamate. The present study demonstrated that MTX peptide protected the functioning of the both NMDAR and AMPAR against glutamate-induced damage. The MTX peptide is a perspective candidate at elaboration medications for treatment of neurological diseases.

Keywords: mystixin-7 peptide, L-glutamate, AMPAR, NMDAR, excitotoxicity

Мистиксин-7 (МТН) является синтетическим эндогенным КРФ – подобным гектапептидом. Он относится к классу регуляторных пептидов с молекулярной массой 1.041 kDa; со следующей аминокислотной структурой: p-anisoyl-Arg-Lys-Leu-Leu-D-Thi-Ile-D-Leu-NH₂, [1]. Ранее нами было показано, что МТН обладает выраженной нейротрофической активностью на срезах мозга. Пептид обратимо тормозил активности АМПА- и НМДА-зависимых механизмов дозо-зависимым образом. Эффекты МТН были обратимыми, и после удаления пептида из омывающей среды активности

этих рецепторов восстанавливались. Эти данные показали, что МТН можно рассматривать как обратимый неспецифический ингибитор АМПА и НМДА рецепторов [2].

Очевидно, благодаря этим свойствам пептид надежно блокировал эпилептоформную активность в пентилентетразольной модели эпилепсии [3]. Кроме того, МТН протектировал активности АМПА и НМДА рецепторных механизмов от ишемии, вызванной депривацией из инкубационной среды глюкозы и кислорода [4]. Основываясь на этих данных, мы предположили, что МТН имеет более широкий диапазон про-

тективных действий на различные нарушения деятельности мозга, которые связаны с развитием глутаматной эксайтотоксичности: гипоксия, ишемия, эпилепсия, а также таких неврологических заболеваний как болезнь Альцгеймера, Хантингтона, Паркинсона, шизофрении и других [5].

Глутамат является главным возбуждающим нейромедиатором в центральной нервной системе млекопитающих. Это вещество играет ключевую роль в различных адаптивных функциях, таких как обучение, память, сенсорное восприятие, контроль движений [6]. Однако сильное стрессорное воздействие (травма, ишемия, эпилепсия, аноксия) вызывает массивное выделение внутриклеточного глутамата во внеклеточное пространство. Это приводит к гиперактивации глутаматных рецепторов и возрастанию потоков ионов кальция внутри клеток. В целом это характеризуется развитием глутаматной эксайтотоксичности и последующей гибелью нейронов. Для защиты клеток от глутаматной эксайтотоксичности использование специфических блокаторов глутаматных рецепторов является неадекватным, поскольку вызывает побочные эффекты [7]. Полагаем, что химические молекулы с высокой скоростью диффузии по межклеточному пространству, обладающие кратковременным и обратимым ингибированием ионотропных рецепторов могут быть потенциальными протективными препаратами для защиты деятельности мозга от эксайтотоксических повреждений.

В связи с этим, цель настоящего исследования заключалась в изучении протективных эффектов МТН на модели глутаматной эксайтотоксичности с использованием срезов мозга. Для этой цели мы использовали регистрацию активностей АМПА- и НМДА-зависимых механизмов на срезах обонятельной коры мозга крыс в сочетании с нейрорхимической обработкой МТН и нами была разработана модель глутамат-вызванной эксайтотоксичности на срезах мозга.

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенными European Communities Council Directive (86/609 ЕЕС). Из мозга крыс изготавливали переживающие тангенциальные срезы толщиной 400–500 мкм. Срезы помещали в камеру и непрерывно перфузировали со скоростью 2 мл/мин искусственной церебральной жидкостью следующего состава (мМ): NaCl – 124,0; KCl – 5,0; CaCl₂ – 2,6; KH₂PO₄ – 1,24; MgSO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 3,0; глюкоза – 10,0; трис-HCl – 23,0. Перфузи-

онный раствор продували кислородом, температуру поддерживали на уровне 37°C, pH – 7.2–7.3.

В срезах регистрировали фокальные потенциалы (ФП) стеклянными микроэлектродами, заполненными 1 М NaCl сопротивлением 1–5 МОм в ответ на одиночные ортодромные электрические импульсы (прямоугольной формы, длительностью 0,1 мс, интенсивностью 1–3 В, с частотой 0,003 Гц) латерального обонятельного тракта (ЛОТ), который является главным афферентным входом к клеткам структур обонятельной коры. Индифферентный серебряный электрод располагали в регистрационной ячейке.

ФП усиливали (усилитель НТО, Россия), оцифровывали при помощи аналого-цифрового устройства (МД 32, Россия) с частотой квантования 20 кГц и обрабатывали на компьютере с помощью специальной программы. Анализировались амплитуды возбуждающих компонентов ФП с соответствующими процессами генеза и опосредуемые разными рецепторными механизмами: суммарный потенциал действия латерального обонятельного тракта (ПД ЛОТ) (пресинаптический компонент ФП); среди постсинаптических – АМПА и НМДА глутаматергические рецепторные компоненты возбуждающего постсинаптического потенциала (ВПСП). Первый из них активируется α-амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионово-й кислотой (АМПА ВПСП), второй – N-метил-D-аспаратом (НМДА ВПСП).

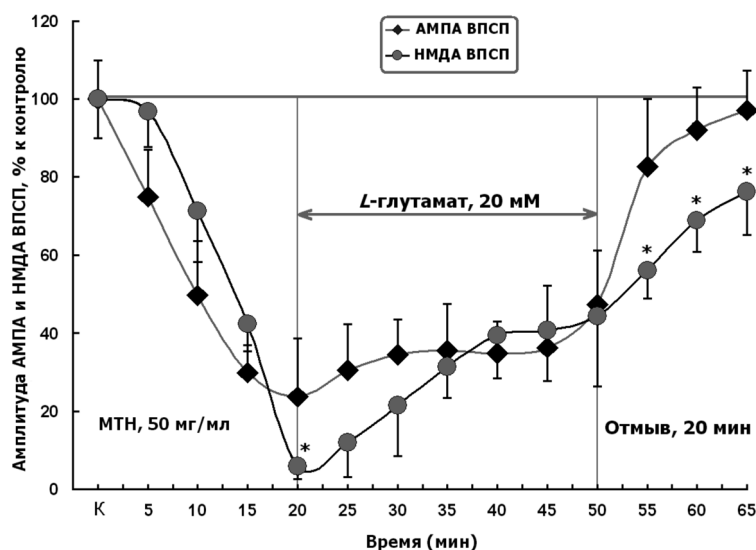
В данной работе изучались протективные эффекты аппликации пептида мистиксина-7 (University Berkeley, USA), в концентрации 50 мг/мл на срезах мозга. Мистиксин растворяли в инкубационной среде непосредственно перед опытом. Схема эксперимента была следующей. В течение 15 мин регистрировали ФП в срезах при инкубации контрольной средой, затем воздействовали раствором с МТН в концентрации 50 мг/мл в течение 30 мин. Далее срезы отмывались контрольной инкубационной средой без пептида в течение 20 мин. Частота раздражения ЛОТ в контроле и при действии мистиксина была 0,003 Гц.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по непараметрическому критерию (*U*-критерий, Вилкоксона-Манна-Уитни). Различия признавались достоверными при $p \leq 0.05$.

Глутамат-вызванная токсичность является широко используемой экспериментальной моделью нейронального повреждения. Для того чтобы имитировать развитие острой стадии неврологических заболеваний, связанных с токсичностью

L-глутамата и проверить защитные свойства МТН мы использовали концентрацию экзогенного *L*-глутамата в концентрации 20 мМ. Было обнаружено, что *L*-глутамат индуцировал увеличение амплитуд АМПА и НМДА ВПСР с максимальными значениями на 20-й мин действия агониста. Гиперактивация АМПА и НМДА рецепторов при действии токсических концентраций *L*-глутамата была различной. Так, активность АМПА рецепторов возрастала в среднем на $20 \pm 8\%$. Гиперактивация НМДА рецепторов была значительнее и составляла $140 \pm 15\%$.

свойства МТН о неспецифическом ингибировании ионотропных глутаматных рецепторов [2]. Аппликация *L*-глутамата на срезы индуцировала незначительную активацию АМПА и НМДА рецепторов. К 20-й мин действия *L*-глутамата активности этих рецепторов составляли в среднем 40 и 36%, соответственно. Эти данные указывают, что гиперактивации этих рецепторных механизмов при действии токсической концентрации *L*-глутамата не развивались. После прекращения действия *L*-глутамата (при отмывании) происходило восстановление активностей АМПА и НМДА рецепторов.



Нейропротективные эффекты предварительной обработки срезов обонятельной коры МТН в концентрации 50 мг/мл на изменения амплитуд АМПА и НМДА рецепторов при действии токсической концентрации L-глутамата (20 мМ). На левой части графика – изменения усредненных амплитуд АМПА и НМДА ВПСР (n = 16) при действии МТН. В средней части графика – действие L-глутамата. В правой части графика – отмывание срезов контрольной инкубационной средой после действия L-глутамата. Серая горизонтальная линия – усредненное контрольное значение амплитуд АМПА и НМДА ВПСР до воздействия МТН и L-глутамата.

*Вертикальные серые линии – интервал действий МТН, L-глутамата и отмывание. По оси абсцисс: К – контроль до воздействия, цифры – время воздействия препаратов. * p ≤ 0.05 по сравнению с контролем, U-критерий Вилкоксона-Манн-Уитни*

Эти данные свидетельствуют о развитии острой стадии глутамат-вызванной эксайтотоксичности для ионотропных глутаматных рецепторов. Однако восприимчивость этих рецепторных механизмов к *L*-глутамату оказалась различной. НМДА рецепторы проявили максимальную чувствительность к токсическому действию *L*-глутамата.

Предварительная обработка срезов МТН в концентрации 50 мг/мл сопровождалась ингибированием активностей АМПА и НМДА рецепторов к 20-й мин на 76 и 94%, соответственно (рисунок). Эти данные подтверждают ранее обнаруженные

Для того чтобы, доказать специфичность действия МТН была использована ферментативная обработка ферментом трипсином. После такой обработки защитные эффекты МТН были протестированы по той же схеме, что и действия нативного пептида. Известно, что трипсин расщепляет пептиды, содержащие аминокислоты аргинин и лизин, которые являются компонентами МТН. Мы полагали, что такая обработка пептида снизит его защитные свойства на действие *L*-глутамата в токсической концентрации. Было обнаружено, что предварительная ферментативная обработка МТН снижала,

но не полностью исключала глутамат-вызванную гиперактивацию АМПА рецепторов. В отличие от АМПА рецепторов протективная обработка пептида сохраняла возникновение гиперактивации НМДА рецепторов на действие *L*-глутамата. Эти данные доказывают, что при развитии глутаматной эксайтотоксичности протективные эффекты индуцируются МТН.

Таким образом, представленные данные демонстрируют, что пептид МТН оказывает протективный эффект в переживающих срезах обонятельной коры в модели глутаматной эксайтотоксичности. Пептид эффективно и надежно защищал активности АМПА и НМДА рецепторов от повреждающего действия *L*-глутамата в токсической концентрации.

Для того чтобы, понять молекулярные механизмы протективных свойств МТН необходимо отметить, что пептид имеет структурное подобие с фрагментом ламинина $\alpha 1$ цепи [8]. Известно, что ламинины являются гликопротеинами базальных мембран. В ЦНС ламинины участвуют в формировании и поддержании гематоэнцефалического барьера и механических повреждениях мозга [9]. Некоторые структурные производные ламинина имеют выраженные нейротрофические свойства. Так, KDI пептид (Lys-Asp-Ile), производный из гамма 1-ламнина, индуцировал торможение активностей АМПА и НМДА рецепторов и, тем самым, устранял глутаматную эксайтотоксичность [9, 10]. Отметим, что МТН, также как и KDI, проявлял нейропротективные эффекты на активности АМПА и НМДА рецепторов в модели глутаматной эксайтотоксичности. Следовательно, эти данные можно рассматривать как доказательство

на структурное и функциональное сходство МТН с ламининами.

Мы полагаем, что наши результаты, касающиеся защитных эффектов пептида МТН, будут способствовать разработке эффективных терапевтических препаратов для лечения неврологических заболеваний, связанных с развитием глутаматной эксайтотоксичности, таких как инсульт, аноксия, эпилепсия.

Список литературы

1. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science.html>. 2012.
2. Mokrushin A.A. Corticotropin-releasing factor-like peptide modifies the AMPA- and NMDA-dependent and GABA_B-ergic properties of synaptic transmissions in vitro // *Regulatory Peptides*. – 2014a. – Vol. 188. – P. 1–4.
3. Mokrushin A.A. Anti-ictogenic effects of the corticotropin-releasing factor-like peptide in the pentylenetetrazole model of seizure in brain slices // *Epilepsy Research*. 2014b. – vol. 108. – P. 587–591.
4. Mokrushin A.A. Mystixin-7 mini-peptide protects ionotropic glutamatergic mechanisms against oxygen-glucose deprivation in vitro // *Neuropeptides*. – 2015. – Vol. 54. – P. 163–168.
5. Choi D.W. Excitotoxic cell death // *J. Neurobiol.* – 1992. – Vol. 23. – P. 1261–1276.
6. Meldrum B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology // *J. Nutrition*. – 2000. – Vol. 130. – P. 1007S–1015S.
7. Ikonomidou C., Turski L. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? // *Lancet Neurol.* – 2002. – Vol. 1. – P. 383–386.
8. Gjerde E.A., Woie K., Wei E.T., Reed R.K. Lowering of interstitial fluid pressure after neurogenic inflammation is inhibited by mystixin-7 peptide // *American J. Physiol. Heart and Circ. Physiol.* – 2000. Vol. 279. – P. H1377–H1382.
9. Liebkind R. CNS injury, $\gamma 1$ laminin, and its KDI Lysine, aspartic acid, isoleucine peptide // *Diss. N 108. Helsinki University*. 2008. – P. 77.
10. Mõykkynen T., Liebkind R., Sjöberg J., Korpi E.R., Liesi P. The neuroprotective KDI domain of gamma 1-laminin is a universal and potent inhibitor of ionotropic glutamate receptors // *J. Neurosci. Res.* – 2005. – Vol. 81. – P. 797–804.