

**К 40-летию Института физиологически активных веществ РАН****ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ****ВЛИЯНИЕ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ПЕПТИДНОГО ПРЕПАРАТА СЕМАКС НА АМРА-РЕЦЕПТОРЫ В НЕЙРОНАХ ПУРКИНЬЕ МОЗЖЕЧКА КРЫС****В.В. Григорьев<sup>1</sup>, В.Л. Замойский<sup>1</sup>, Е.В. Бовина<sup>1\*</sup>, Л.А. Андреева<sup>2</sup>, Н.Ф. Мясоедов<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, 142432, Черноголовка Московской обл., Северный проезд, 1; \*эл. почта: bovin\_a\_e@iras.ac.ru<sup>2</sup>Институт молекулярной генетики Российской академии наук, 123182, Москва, пл. акад. Курчатова, 2

Новые пептиды, аналоги препарата Семакс, способны потенцировать токи АМРА-рецепторов в более низких концентрациях ( $10^{-11}$ – $10^{-8}$  М), чем Семакс. Эта способность предполагает наличие у аналогов препарата когнитивно-стимулирующих свойств.

**Ключевые слова:** пептиды-аналоги препарата Семакс; АМРА рецепторы; нейроны Пуркинье

**DOI:** 10.18097/BMCRM00033

**ВВЕДЕНИЕ**

Эндогенные пептиды играют важнейшую регуляторную роль во многих функциях организма человека, в том числе в регуляции его когнитивной сферы. Одним из самых известных примеров в этой области может служить влияние АКТГ на память [1]. На основе фрагмента последовательности АКТГ с 4 по 10 аминокислотный остаток был создан известный препарат Семакс [2], который обладает ноотропным, нейрозащитным, антиоксидантным и антигипоксическим действием [3]. Как показали наши исследования, в основе когнитивно-стимулирующей и отчасти нейропротекторной активности лежит его способность потенцировать токи АМРА-рецепторов нейронов млекопитающих [4]. Поэтому синтез и исследование физиологической активности новых аналогов Семакса имеет не только теоретический, но и большой практический интерес.

Целью данной работы явилось изучение влияния новых пептидов – аналогов препарата Семакс – на токи АМРА-рецепторов нейронов Пуркинье мозжечка крыс.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Электрофизиологическим методом patch-clamp [5] изучено действие 6-ти новых пептидов на АМРА-рецепторы (подтип глутаматных рецепторов центральной нервной системы млекопитающих). Эксперименты проведены на одиночных изолированных нейронах Пуркинье. Нейроны Пуркинье выделяли из мозжечков головного мозга 12–16-дневных крыс популяции Вистар. Для выделения использовали модифицированный метод Канада [6]. Срезы мозжечка толщиной 400–600 мкм помещали в термостатируемую камеру объемом 10 мл. Раствор для выделения имел следующий состав (в mM): NaCl 150.0; KCl 5.0; CaCl<sub>2</sub> 2.0; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 2.0; HEPES 10.0; глюкоза 15.0; pH 7.42. Срезы инкубировали в этом растворе в течение 60 мин, после чего раствор заменяли

на аналогичный раствор, содержащий проназу (2 мг/мл) и коллагеназу (1 мг/мл), и инкубировали в течение 70 мин. После отмывки первоначальным раствором в течение 20 мин срезы помещали в чашку Петри и разъединяли механическим способом при помощи пастеровской пипетки. Растворы во время выделения нейронов непрерывно продували 100%-ным O<sub>2</sub> при 34°C. Исследуемые нейроны помещали в рабочую камеру объемом 0.6 мл. Рабочий раствор имел состав (в mM): NaCl 150.0; KCl 5.0; CaCl<sub>2</sub> 2.6; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 2.0; HEPES 10.0; глюкоза 15.0; pH 7.36.

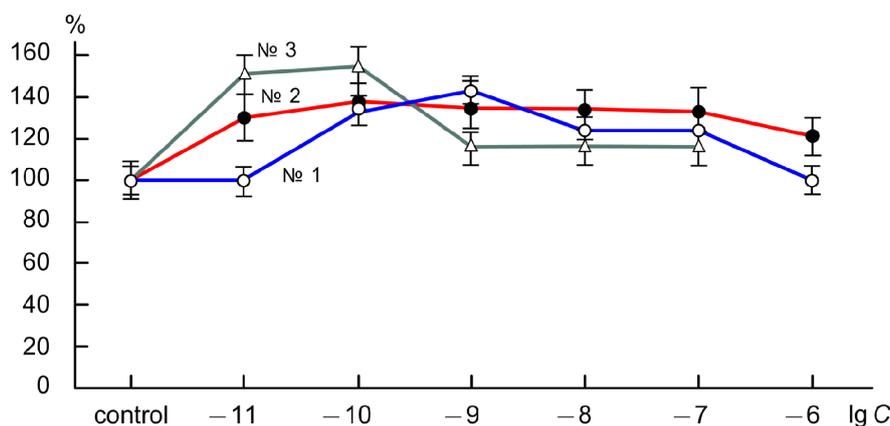
Трансмембранные токи вызывали активацией АМРА-рецепторов путём аппликации растворов агониста этих рецепторов – каиново́й кислоты (КК) методом быстрой суперфузии. Регистрацию токов осуществляли при помощи боросиликатных микроэлектродов (сопротивление 2.5–5.5 МОм), заполненных раствором следующего состава (в mM): KCl 140.0; EGTA 11.0; CaCl<sub>2</sub> 1.0; MgCl<sub>2</sub> 1.0; HEPES 10.0; АТР 5.0; pH 7.2. Для регистрации токов использовали прибор ЕРС-9 (“НЕКА”, Германия). Запись токов осуществлялась на компьютер при помощи лицензионной программы Pulse (“НЕКА”). Полученные результаты обрабатывали программой Pulsefit (“НЕКА”).

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

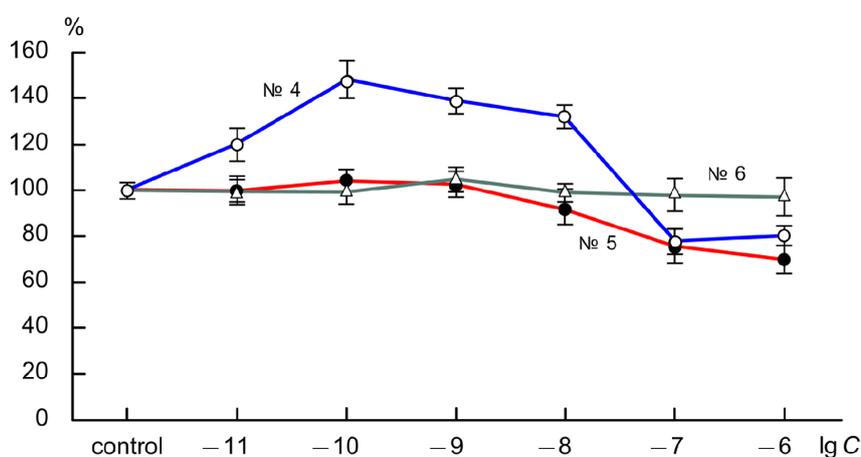
Как показали проведённые исследования, четыре из шести изученных пептидов оказывают влияние на амплитуду токов АМРА-рецепторов, однако действие каждого из них имеет свои особенности. Пептиды №1 (H-Arg-Glu-Arg-Pro-Gly-Pro-OH) и №3 (H-Arg-Glu-Arg-Gly-Pro-OH) вызывают потенциацию токов АМРА-рецепторов в диапазоне концентраций  $10^{-10}$ – $10^{-7}$  М (рис. 1). Для действия этих пептидов наблюдается дозозависимость.

Действие пептида №2 (H-Arg-Glu-Arg-Val-Gly-Pro-OH) несколько отличалось от действия описанных выше пептидов: в диапазоне концентраций  $10^{-11}$ – $10^{-8}$  М дозозависимости величины потенциации не наблюдалось (рис. 1).





**Рисунок 1.** Влияние пептидов №№ 1, 2 и 3 на амплитуду токов AMPA-рецепторов в нейронах Пуркинье мозжечка крыс. lgC – логарифм концентраций соединений, М; % – амплитуда каинат-вызванных токов в присутствии соединений по отношению к контролю, принятому за 100%.



**Рисунок 2.** Влияние пептидов KRRRPGP (4), MIT-1 (5) и MIT-2 (6) на амплитуду токов AMPA-рецепторов в нейронах Пуркинье мозжечка крыс. lgC – логарифм концентраций соединений, М, % – амплитуда каинат-вызванных токов в присутствии соединений к контролю, принятому за 100%.

Результаты исследования действия KRRRPGP, MIT-1 (H-Arg-Lys-Lys-Arg-Pro-Gly-Pro-OH) и MIT-2 (H-Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro-OH) на AMPA-рецепторы представлены на рисунке 2. Видно, что только один пептид – KRRRPGP – оказывает дозозависимое влияние на амплитуду токов AMPA-рецепторов, тогда как другие пептиды – MIT-1 и MIT-2 – не оказывают влияния на токи AMPA-рецепторов.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, установлено, что новые пептиды способны потенцировать токи AMPA-рецепторов в низких концентрациях  $10^{-11}$ – $10^{-8}$  М. Как было показано нами ранее, Семакс также потенцирует токи AMPA-рецепторов, но его потенцирующее действие осуществляется в более высоких концентрациях –  $10^{-7}$ –( $3 \times 10^{-5}$ ) М [4]. Семакс, как известно, обладает когнитивно-стимулирующим действием [3]. Показанное у новых пептидов свойство позитивных модуляторов AMPA-рецепторов также предполагает наличие у них нейропротекторных и когнитивно-стимулирующих свойств.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена по теме 48.8. “Поиск и исследование механизмов действия нейропротекторов и стимуляторов когнитивных функций” в рамках Государственного задания ИФАВ РАН (тема по ГЗ № 0090-2017-0019). В работе использовано оборудование ЦКП ИФАВ РАН (Соглашение № 14.621.21.0008, идентификатор работ RFMEFI62114X0008).

## ЛИТЕРАТУРА

- Gold, P.E. Vanbuskirk, R. (1976) Enhancement and Impairment of Memory Processes with Post-Trial Injections of Adrenocorticotrophic Hormone. *Behavioral Biology*, 16(4), 387-400. DOI: 10.1016/S0091-6773(76)91539-X
- Ashmarin, I.P., Nezavibatko, V.N., Myasoedov, N.F., Kamensky, A.A., Grivennikov, I.A., Ponomareva-Stepnaya, M.A., Andreeva, L.A., Kaplan, A.Y., Koshelev, V.B., Ryasina, T.V. (1997) Nootropic analogue of adrenocorticotropin 4-10-semax (the experience of design and investigation over 15 years). *Zhurnal Vysshei Nervnoi Deyatelnosti Imeni I.P. Pavlova*, 47(2), 420-430.

3. Dolotov, O.V., Seredenina, T.S., Levitskaya, N.G., Kamensky, A.A., Andreeva, L.A., Alfeeva, L.Y., Nagaev, I.Y., Zolotarev, Y.A., Grivennikov G.I., Engele, Y., Myasoedov, N.F. (2003) The heptapeptide SEMAX stimulates BDNF expression in different areas of the rat brain *in vivo*. Doklady Biological Sciences, 391(1-6), 291-295. DOI: 10.1023/A:1025177812262
4. Grigoriev, V.V., Andreeva, L.A., Zamoyski, V.L., Shevchenko, V.P., Bachurin, S.O., Myasoedov, N.F. (2015) The action of the peptide drug Semax on the currents of AMPA receptors of rat cerebellar Purkinje cells. Doklady Biochemistry and Biophysics, 460(1), 47-48. DOI: 10.1134/S1607672915010135
5. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Archives, 391(2), 85-100. DOI: 10.1007/Bf00656997
6. Kaneda, M., Nakamura, H., Akaike, N. (1988) Mechanical and enzymatic isolation of mammalian CNS neurons. Neuroscience Research, 5(4), 299-315. DOI: 10.1016/0168-0102(88)90032-6

Поступила: 23. 05. 2018.

Принята к публикации: 22. 08. 2018.

## THE EFFECT OF NEW SYNTHETIC ANALOGS OF SEMAX PEPTIDE PREPARATION ON AMPA-RECEPTORS IN PURKINJE NEURONS OF CEREBELLAR RATS

*V.V. Grigoriev<sup>1</sup>, V.L. Zamoyski<sup>1</sup>, E.V. Bovina<sup>1\*</sup>, L.A. Andreeva<sup>2</sup>, N.F. Myasoedov<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences,

1 Severny proezd, Moscow region, Chernogolovka, 142432 Russia; \*e-mail: bovin\_e@ipac.ac.ru

<sup>2</sup>Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences, 2 Acad. Kurchatov's sq., Moscow, 123182 Russia

New peptides analogues of Semax can potentiate AMPA receptors induced currents at lower concentrations ( $10^{-11}$ – $10^{-8}$  M) than those of Semax. This ability suggests that they may have cognitive-stimulating properties..

**Key words:** peptide analogues of Semax; AMPA receptors; Purkinje neurons

### ACKNOWLEDGMENTS

The study was conducted in accordance to the Research Topic No. 48.8 “The search and determination of the mechanisms of neuroprotectors and stimulators of cognitive functions” in the framework of the State Task for the Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences (Topic: No: 0090-2017-0019).