

УДК 576.314

НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА АНТИСМЫСЛОВЫХ ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ К СУБЪЕДИНИЦЕ GluN1 N-МЕТИЛ-D-АСПАРТАТНОГО РЕЦЕПТОРА

© 2019 г. А. А. Мокрушин*

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Россия,
199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

*e-mail: mok@inbox.ru

Поступила в редакцию 24.11.2018 г.

После доработки 09.01.2019 г.

Принята к публикации 14.01.2019 г.

Исследовали нейропротективные эффекты антисмысловых (AcОДН) (5'-cagcaggtgcatggtgct-3') и смысловых олигодезоксинуклеотидов (сОДН) (5'-ctacaacgtacaagtagt-3') (10^{-8} М) к субъединице GluN1 НМДА-рецептора в срезах обонятельной коры мозга крыс Вистар при 10-мин аноксии и в модели глутаматной эксайтотоксичности (*L*-глутамат, 20 мМ). Анализировали изменения амплитуд НМДА-потенциалов после предварительной инкубации срезов в присутствии AcОДН или сОДН в течение 360 мин. Аноксия в течение 10 мин вызывала необратимое блокирование НМДА-потенциалов. сОДН не влияли на этот процесс, а AcОДН восстанавливали амплитуду НМДА-потенциалов до $46 \pm 6\%$ от контроля. При аппликации *L*-глутамата (20 мМ) на срезы, обработанные AcОДН, амплитуда НМДА-потенциалов сохранялась на уровне $67 \pm 7\%$ от контрольных значений, тогда как при действии только *L*-глутамата НМДА-потенциалы блокировались. При инкубации срезов с сОДН при действии *L*-глутамата амплитуды НМДА-потенциалов составляли только $29 \pm 7\%$ от контроля. Полученные данные свидетельствуют о нейропротективных свойствах AcОДН при действии тяжелой аноксии и в модели глутаматной эксайтотоксичности.

Ключевые слова: антисмысловые и смысловые олигодезоксинуклеотиды, субъединица GluN1, НМДА-рецепторы, аноксия, *L*-глутамат

DOI: 10.1134/S023347551904008X

ВВЕДЕНИЕ

Рецепторы N-метил-D-аспартата (НМДА) относятся к семейству ионотропных глутаматергических рецепторов. Установлено, что НМДА-зависимые механизмы являются ключевым элементом возбуждающей глутаматергической медиаторной системы. Они участвуют в различных формах адаптивных реакций в нормальных условиях и при развитии патологий. НМДА-рецепторы – гетеротетрамерные структуры, состоящие из двух субъединиц GluN1 и двух субъединиц GluN2 или GluN3. Белковые субъединицы формируют ионные каналы, способные к проникновению внутрь клеток внеклеточных ионов Ca^{2+} во время возбуждения. Доказано, что GluN1 как обязательная субъединица играет главную роль в функционировании НМДА-рецепторов [1, 2]. Полагают, что именно эта субъединица ответственна за формирование адаптивных реакций организма [1–4].

Принимая во внимание существенную роль НМДА-зависимых механизмов в реакциях нерв-

ных клеток на цитотоксические воздействия, можно полагать, что ингибирование этих механизмов химическими препаратами обеспечит нейропротективный эффект при действии негативных факторов. Среди потенциальных химических агентов, обладающих нейропротективным действием при функционировании НМДА-зависимых механизмов, заслуживают внимания антисмысловые олигодезоксинуклеотиды (AcОДН). С их помощью можно корректировать процессы в клетке, не затрагивающие целостность генома [5, 6]. AcОДН представляют собой короткие последовательности и применяются для специфического блокирования экспрессии генов. AcОДН присоединяются к специфической мРНК, препятствуют трансляции и, следовательно, выработке белка [7, 8]. Такое воздействие позволяет временно и с высокой специфичностью воздействовать на любой процесс в клетке. В настоящее время создание препаратов на основе AcОДН – одно из перспективных и успешных направлений при разработке лекарственных средств, эффективных при онкологических заболеваниях [9], гиперто-

нической болезни [10] и др. Применение АсОДН в экспериментах на культуре нервных клетках *in vitro* выявило их способность защищать от негативного воздействия эксайтотоксичности. Введение АсОДН *in vivo* уменьшало объем мозговой ткани, пораженной ишемией, и защищало от воздействия эксайтотоксичности [11, 12].

В нашей работе на срезах обонятельной коры мозга крыс исследованы нейропротективные эффекты АсОДН на субъединицу GluN1 НМДА-рецептора при воздействии сильного стресс-фактора (10 мин аноксии) и в модели глутаматной эксайтотоксичности. Смысловые олигонуклеотиды (сОДН) использовали в качестве контроля для сопоставления с эффектами АсОДН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г из биocolлекции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (“Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности”), подержанной программой биоресурсных коллекций Минобрнауки России с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенными European Communities Council Directive (86/609 ЕЕС). Опыты с животными проводились в соответствии с Руководством Совета Федерации по уходу и использованию лабораторных животных (1994 г.) и с принципами этического кодекса Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (1996 г.).

Тангенциальные срезы обонятельной коры толщиной 450–500 мкм изготавливали из мозга крыс. Срезы помещали в камеру для регистрации электрической активности и перфузировали со скоростью 2 мл/мин искусственной церебральной жидкостью следующего состава (мМ): NaCl – 124.0; KCl – 5.0; CaCl₂ – 2.6; KН₂РO₄ – 1.24; MgSO₄ – 1.2; NaHCO₃ – 3.0; глюкоза – 10.0; Трис-НСl – 23.0. Инкубационный раствор продували кислородом, рН среды составлял 7.2–7.3.

В срезах внеклеточно регистрировали НМДА-синаптический компонент возбуждающего постсинаптического потенциала (в дальнейшем “НМДА-потенциалы”) стеклянными микроэлектродами, заполненными 1 М NaCl, сопротивление 1–5 МОм. НМДА-потенциалы вызывались стимуляцией латерального обонятельного тракта (ЛОТ) – афферентного входа к нейронам обонятельной коры. Активация ЛОТ производилась электрическими импульсами прямоугольной формы длительностью 0.1 мс, с частотой 0.003 Гц и интенсивностью 0.1–0.3 мА, генерируемые стимулятором ЭСУ-1 (Россия). Регистрируемые НМДА-потенциалы оцифровывали с частотой 20 кГц с помощью интерфейса E20-10 (Россия) и обрабатывали на компьютере с помо-

щью специальной программы. Амплитуды НМДА-потенциалов измеряли от изолинии до пика (рис. 1).

Идентификация отдельных компонентов факального потенциала (ФП), регистрируемого в срезах обонятельной коры, проводилась с использованием специфических блокаторов: НМДА-рецепторов – D-APV (D-2-amino-5-phosphonovaleate); АМПА-рецепторов – CNQX (6-сано-7-nitroquinoxaline-2,3-dione), с помощью методов, описанных в работах [13–15]. Вызванные ФП регистрировались в ответ на стимуляцию ЛОТ в контроле и во время инкубации срезов специфическими антагонистами АМПА- и НМДА-рецепторов. ФП является многокомпонентным потенциалом и состоит из пресинаптического компонента, который отражает активность проводящих волокон ЛОТ (ПД ЛОТ), и постсинаптических компонентов, которые отражают активацию глутаматергических ионотропных механизмов – АМПА- и НМДА-потенциалов (рис. 1). Для идентификации НМДА-потенциалов срезы инкубировали с D-APV (50 мкМ). Для предотвращения блокады этих рецепторов ионами Mg²⁺ срезы инкубировали в среде с низкой концентрацией этих ионов (200 мкМ) в течение 20 мин. Полученные результаты продемонстрировали редукцию позднего синаптического компонента ФП, что указывает на его активацию НМДА-рецепторами. Для выявления АМПА-компонента ФП срезы инкубировали с CNQX (25 мкМ) в течение 20 мин. Такое воздействие блокировало ранний постсинаптический компонент, а также НМДА-компонент, сохранялся только пресинаптический компонент – ПД ЛОТ (рис. 1). Таким образом, проведенная фармакологическая идентификация синаптических компонентов ФП свидетельствует, что ранний АМПА-потенциал отражает активацию АМПА, а поздний – НМДА-рецепторов (рис. 1).

В работе были изучены нейропротективные эффекты АсОДН (5'-cagcaggtgcatggtgct-3') и сОДН (5'-ctacaacgtacaagtagt-3'). Срезы инкубировали в стеклянных флаконах в 1 мл инкубационной среды с АсОДН и сОДН в концентрации 10⁻⁸ М в течение 360 мин в аппарате Варбурга (Германия) при температуре 37°C.

Следует отметить, что предварительно проведенное тестирование широко применяемых препаратов, усиливающих введение АсОДН и сОДН в нейроны (липосомы, Lipofectamine 2000, Pluronic F127 – блоксополимер полиоксэтилена и полиоксипропилена), выявило их высокую токсичность. Поэтому в нашей работе была использована методика длительной инкубации срезов в среде с АсОДН и сОДН без применения этих препаратов.

Время достижения эффектов АсОДН и сОДН определяли по возникновению ответных реак-

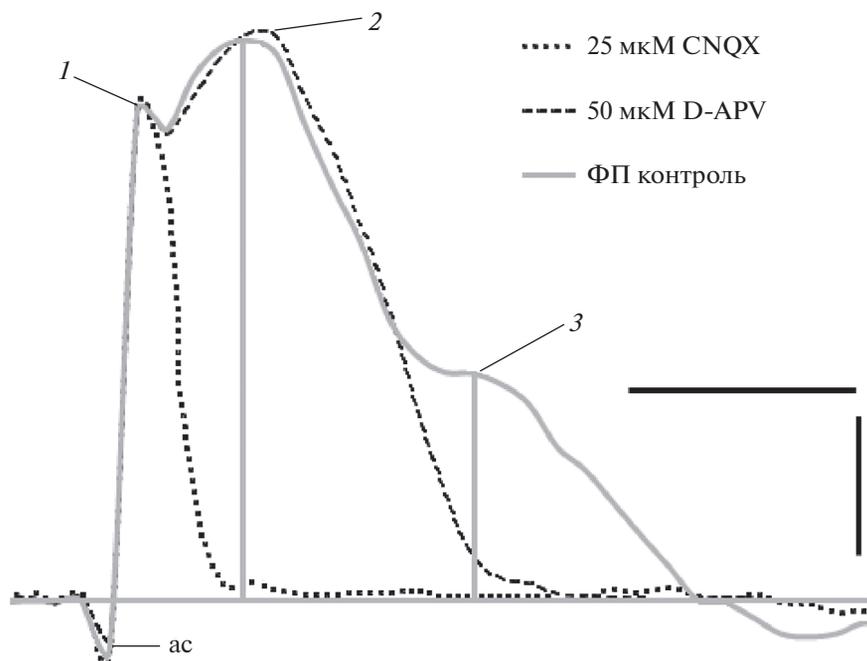


Рис. 1. Идентификация пре- и постсинаптических компонентов фокальных потенциалов (ФП), вызываемых электрической стимуляцией ЛОТ. Усредненные ФП в нормальной инкубационной среде в контроле ($n = 7$) (кривая 3) и в присутствии блокатора АМПА-рецепторов CNQX ($n = 8$) (кривая 1). Кривая 2 – ФП в присутствии блокатора НМДА-рецепторов D-APV в среде с пониженным содержанием Mg^{2+} (200 мкМ) ($n = 6$). Горизонтальная прямая соответствует уровню потенциала, регистрируемого в покое. Вертикальные серые линии – измерение амплитуд АМПА- и НМДА потенциалов; ac – артефакт стимуляции; 1 – пресинаптический компонент ФП, отражает активацию проводящих волокон ЛОТ; 2, 3 – АМПА- и НМДА-потенциалы соответственно. Калибровка: 0.1 мВ; 5 мс.

ций – изменению амплитуд НМДА-потенциалов. Мы обнаружили, что действие как сОДН, так и АсОДН проявлялось после 270-мин инкубации срезов. Для надежности был использован более длительный период инкубации – 360 мин. Эффекты АсОДН и сОДН продолжались 10 ч (время наблюдения). Таким образом, мы изучали эффекты транзиторной трансфекции АсОДН и сОДН нейронов в переживающих срезах мозга.

Эксперименты проводили следующим образом. В начале каждого опыта в срезах регистрировали амплитуды НМДА-потенциалов в течение 15 мин, средние величины амплитуд этих потенциалов рассматривали как контрольные значения для данного среза. Затем в течение 20 мин регистрировали НМДА-потенциалы при действии АсОДН с интервалом 1 мин. На одном срезе регистрировали 23 НМДА-потенциала.

В серии экспериментов по изучению нейропротективного влияния АсОДН и сОДН (10^{-8} М) в условиях аноксии срезы мозга перфузировали средой, которую продували азотом в течение 2 или 10 мин. Эффекты аноксии на изменения амплитуд НМДА-потенциалов определяли через 360 мин инкубации срезов с АсОДН и сОДН. Для того чтобы оценить протективные эффекты АсОДН и сОДН в модели глутаматной эксайтотоксичности на срезы апплицировали *L*-глутамат

в токсической концентрации 20 мМ. Токсические воздействия *L*-глутамата регистрировали через 360 мин инкубации срезов с АсОДН и сОДН.

ОДН были приобретены в Государственной научной корпорации “Вектор” (Новосибирск, Россия), химические реактивы для инкубационной среды получены из фирмы “Химреактив” (Россия).

Для статистической обработки данных применяли непараметрический *U*-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни. Уровень статистической значимости был $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После 360-мин инкубации срезов с АсОДН и сОДН (10^{-8} М) амплитуда НМДА-потенциалов в срезах мозга в ответ на стимуляцию ЛОТ с частотой 0.003 Гц существенно не изменялась, различия составляли 5–7% ($n = 7$) по сравнению с контролем. Напротив, после эпизодов аноксии амплитуды НМДА-потенциалов значительно отличались от контрольных значений. Так, при действии 2-мин аноксии амплитуда НМДА-потенциалов увеличивалась до $167 \pm 5\%$ от контрольного уровня (рис. 2). Такая потенциация, индуцированная аноксией, возникала во всех протестированных срезах ($n = 7$). Предваритель-

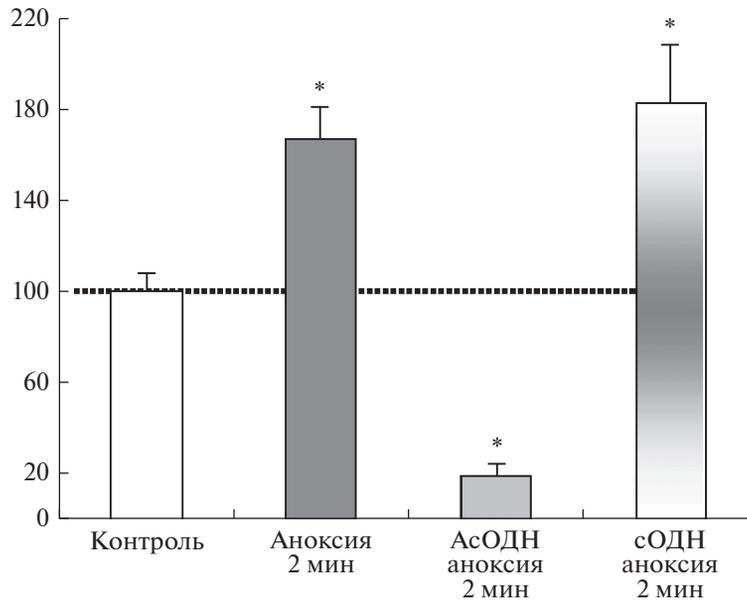


Рис. 2. Влияние АсОДН и сОДН на амплитуды НМДА-потенциалов в условиях 2-мин аноксии. По оси ординат – амплитуда потенциалов в % от контроля. Горизонтальная пунктирная линия – значение НМДА-потенциалов в контроле. * $p \leq 0.05$; U – критерий Вилкоксона–Манна–Уитни, $n = 7$ для каждой точки.

ная инкубация срезов с АсОДН или сОДН в течение 360 мин значительно влияла на амплитуды НМДА-потенциалов. При действии АсОДН амплитуда снижалась до $19 \pm 4\%$ по сравнению с контролем (рис. 2). Это указывает на ингибирование активности НМДА-зависимых механизмов и, следовательно, торможение потенциации, вызванной аноксией. В отличие от АсОДН, сОДН не только сохранял, но и усиливал вызванную аноксией потенциацию НМДА-зависимых процессов (рис. 2).

При 10-мин аноксии НМДА-потенциалы почти полностью блокировались (рис. 3). Если 10-мин аноксии предшествовала инкубация срезов с АсОДН, то амплитуды НМДА-потенциалов составляли $46 \pm 6\%$ от контрольных значений ($U = 5$, $n = 7$, $p \leq 0.05$) (рис. 3). Таким образом, при 10-мин аноксии АсОДН оказывает нейропротективное действие, так как способствует сохранению активности нейронов при действии негативного стресс-фактора.

Предварительная инкубация срезов с сОДН практически не влияла на блокаду НМДА-потенциалов при действии 10-мин аноксии (рис. 3): амплитуда НМДА-потенциалов необратимо блокировалась до $7 \pm 2\%$ от контроля ($U = 2$, $n = 7$, $p \leq 0.05$), и, следовательно, сОДН не обладал нейропротективным действием.

Для того чтобы оценить действие АсОДН и сОДН на развитие острой стадии многих неврологических заболеваний, связанных с глутаматной эксайтотоксичностью (ишемия, эпилепсия, травма), эффекты АсОДН и сОДН были также

исследованы на модели глутаматной эксайтотоксичности. С этой целью на срезы апплицировали *L*-глутамат в концентрации 20 мМ. Согласно ранее полученным данным, *L*-глутамат индуцировал двухфазные изменения активности НМДА-зависимых механизмов: усиление активности (5–30 мин) и последующее ее блокирование (40–60 мин) [16]. Для того чтобы оценить эффекты АсОДН и сОДН, было проанализировано их влияние на НМДА-потенциалы на 50–60 мин действия *L*-глутамата. В этом интервале времени эффекты агониста были наиболее выражены, и амплитуда НМДА-потенциалов составляла $6 \pm 2\%$ от контроля ($U = 2$, $n = 7$, $p \leq 0.05$) [6].

Исследования показали, что АсОДН способствовал сохранению активности НМДА-зависимых механизмов. Это выражалось в том, что значения амплитуд НМДА-потенциалов хотя и отличались статистически от контрольных значений ($67 \pm 7\%$, $U = 11$, $n = 7$, $p \leq 0.05$), но сохранялись на высоком уровне по сравнению с величинами НМДА-потенциалов в присутствии *L*-глутамата без АсОДН (рис. 4). Следовательно, на модели глутаматной эксайтотоксичности АсОДН оказывал нейропротективное действие. Можно ожидать, что на других моделях неврологических заболеваний, обусловленных развитием глутаматной эксайтотоксичности (инсульт мозга, эпилепсия, травма), АсОДН также будет оказывать протективное действие, однако это предположение требует экспериментальной проверки.

Нейропротективный эффект сОДН на срезах в случае модели глутаматной эксайтотоксичности

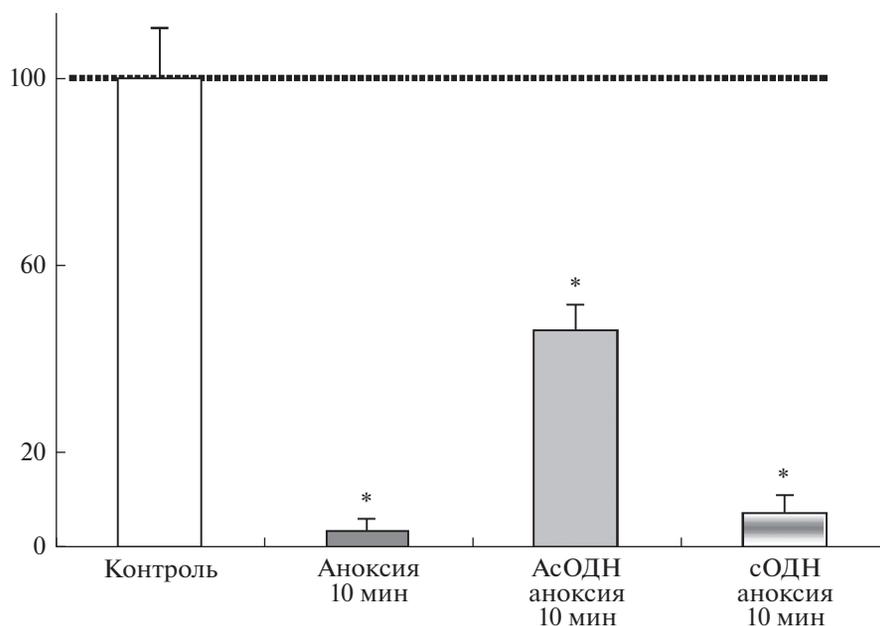


Рис. 3. Влияние АсОДН и сОДН на амплитуды НМДА-потенциалов в условиях 10-мин аноксии. Обозначения как на рис. 2.

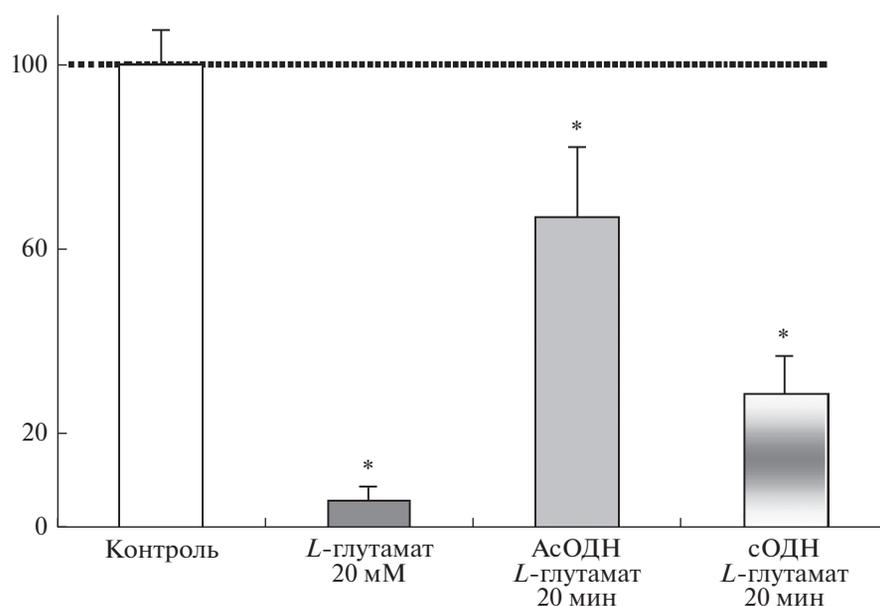


Рис. 4. Влияние АсОДН и сОДН на амплитуды НМДА-потенциалов при действии токсической концентрации *L*-глутамата (20 мМ) на срезы мозга. По оси ординат – амплитуда потенциалов в % от контроля. Горизонтальная пунктирная линия – значение НМДА-потенциалов в контроле. * $p \leq 0.05$; U – критерий Вилкоксона–Манна–Уитни, $n = 7$ для каждой точки.

был менее выражен, чем при действии АсОДН (рис. 4). У срезов, обработанных сОДН, амплитуда НМДА-потенциалов в присутствии *L*-глутамата составляла $29 \pm 6\%$, что статистически достоверно отличалось от контрольных значений ($U = 8$, $n = 7$, $p \leq 0.05$) и от значений потенциалов в присутствии *L*-глутамата без сОДН ($U = 3$, $n = 7$, $p \leq 0.05$). Сопоставляя эффекты АсОДН и сОДН, можно констатировать, что амплитуды НМДА-

потенциалов в присутствии АсОДН были примерно в 2 раза выше, чем при действии сОДН (рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что ингибирование активности субъединицы GluN1 НМДА-рецептора с помощью АсОДН

способствует сохранению активности НМДА-зависимых механизмов в условиях аноксии и в модели глутаматной эксайтотоксичности. Оптимизация активности НМДА-механизмов посредством модуляции субъединицы GluN1 обеспечивает нейропротективный эффект АсОДН при действии стресс-факторов и при развитии неврологических нарушений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 годы (ГП-14, раздел 65.2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Salussolia C.L., Prodromou M.L., Borker P., Wollmuth L.P. 2010. Arrangement of subunits in functional NMDA receptors. *J. Neuroscience*. **31** (31), 11295–11304.
2. Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain C.J., Manniti F.S., Vance K.M., Ogden K.K., Hansen K.B., Yuan H., Myers S.J., Dingledine R. 2010. Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* **62** (3), 405–496.
3. Cull-Candy S.C., Leszkiewicz D.N. 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *SciSTKE*. **255**, re16.
4. Mayer M.L. 2011. Structure and mechanism of glutamate receptor ion channel assembly, activation and modulation. *Curr. Opin. Neurobiol.* **21** (2), 283–290.
5. Зеленин А.В., Кайгородов В.А., Прасолов В.С. 1998. Генная терапия сегодня и завтра. *Молекуляр. биология*. **32**, 219–228.
6. Kurreck J. 2003. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* **270** (8), 1628–1644.
7. Weyermann J., Lochmann D., Andreas G. 2005. Albumin-protamine-oligonucleotide-nanoparticles as a new antisense delivery system. Part 2: Cellular uptake and effect Zimmer. *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **59**, 431–438.
8. Zamecnik P.C., Stephenson M.L. 1978. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **75**, 280–284.
9. Mullen P., McPhillips F., MacLeod K. 2004. Antisense oligonucleotide targeting of Raf-1: Importance of raf-1 mRNA expression levels and raf-1-dependent signaling in determining growth response in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **10** (6), 2100–2108.
10. Phillips M.I., Kimura B. 2005. Antisense therapeutics for hypertension: Targeting the renin-angiotensin system. *Methods Mol. Med.* **106**, 51–68.
11. Wahlestedt C., Golanov E., Yamamoto S., Yee F., Ericson H., Yoo H., Inturrisi C., Reis D. 1993. Antisense oligodeoxynucleotides to NMDA-R1 receptor channel protect cortical neurons from excitotoxicity and reduce focal ischaemic infarctions. *Nature*. **363**, 260–263.
12. Shan W., Wu X., Zhang G., Zhang Y., Liang Y., Wang Z. 1997. Effects of antisense oligodeoxynucleotides to NR1 on suppression of seizures and protection of cortical neurons from excitotoxicity in vivo and in vitro. *Chin. Med. J. (Engl)*. **110**, 579–583.
13. Hoffman W.H., Haberly L. 1989. Bursting induces persistent All-or-None EPSPs by an NMDA-dependent process in piriform cortex. *J. Neurosci.* **9** (1), 206–215.
14. Jung M.W., Larson J., Lynch G. 1990. Role of NMDA and non-NMDA receptors in synaptic transmission in rat piriform cortex. *Exp. Brain Res.* **82** (5), 451–455.
15. Mokrushin A.A., Pavlinova L.I. 2013. Effects of the blood components on the AMPA and NMDA synaptic responses in brain slices in the onset of hemorrhagic stroke. *Gen. Physiol. Biophys.* **32**, 489–504.
16. Mokrushin A.A. 2016. Mystixin-7 peptide protects ionotropic glutamatergic mechanisms against glutamate-induced excitotoxicity in vitro. *Int. J. Peptides*. **2016**, 1–10.

Neuroprotective Effects of Antisense Oligodeoxynucleotides on the GluN1 Subunit of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor

A. A. Mokrushin*

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St.-Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: mok@inbox.ru

We investigated the neuroprotective effects of antisense oligodeoxynucleotides (AsODN) (5'-cagcaggtgcatgtgct-3') and sense oligodeoxynucleotides (sODN) (5'-ctacaacgtacaagtagt-3') (10^{-8} M) on the NMDA receptor subunit GluN1 in olfactory cortical slices of Wistar rats under 10-min anoxia and in the model of glutamate excitotoxicity (*L*-glutamate, 20 mM). Alterations of NMDA potential amplitudes after preliminary incubation of slices with AsODN and sODN for 360 min were analyzed. Ten-minute anoxia resulted in almost complete suppression of NMDA potentials. After the preincubation with AsODN and subsequent 10-min anoxia the mean amplitude of NMDA potentials was $46 \pm 6\%$ of the control value. Pretreatment of slices with sODN did not restore the NMDA potentials blocked by anoxia. Application of *L*-glutamate (20 mM) resulted in a blockade of the NMDA potentials, while in slices pretreated with AsODN *L*-glutamate (20 mM) suppressed the amplitude only to $67 \pm 7\%$ of the control level. Incubation of slices with sODN before the *L*-glutamate application restored the NMDA potential amplitudes only to $29 \pm 7\%$ of the control value. The obtained data indicate that AsODN exhibits pronounced neuroprotective properties in the conditions of severe anoxia and in the model of glutamate excitotoxicity.

Keywords: antisense and sense oligodeoxynucleotides, subunit GluN1, NMDA receptors, anoxia, *L*-glutamate