

УДК 577.352.4

## НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПЕПТИДОВ HFRWPGP (ACTH<sub>6–9</sub>PGP), KKRRPGP, PyyRP В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КОРКОВЫХ НЕЙРОНАХ ПРИ ГЛУТАМАТНОЙ ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ

© 2020 г. З. В. Бакаева<sup>1,\*</sup>, А. М. Сурин<sup>1,2</sup>, Н. В. Лизунова<sup>1,3</sup>, А. Е. Згодова<sup>1,4</sup>,  
И. А. Красильникова<sup>1</sup>, А. П. Фисенко<sup>1</sup>, Д. А. Фролов<sup>5</sup>,  
Л. А. Андреева<sup>6</sup>, академик РАН Н. Ф. Мясоедов<sup>6</sup>, В. Г. Пинелис<sup>1</sup>

Поступило 06.02.2020 г.

После доработки 06.02.2020 г.

Принято к публикации 06.02.2020 г.

Глутаматная (Glu) эксайтотоксичность, сопровождающая ишемию мозга или ЧМТ, является ведущим механизмом последующей гибели нейронов. В настоящей работе изучено влияние пептидов HFRWPGP (ACTH<sub>6–9</sub>PGP), KKRRPGP и PyyRP на выживаемость культивируемых корковых нейронов на фоне эксайтотоксического действия Glu (100 мкМ). Биохимический (MTT/WST) и морфометрический анализы показали, что в зависимости от дозы ACTH<sub>6–9</sub>PGP и KKRRPGP защищают нейроны от гибели, в то время как PyyRP — усиливает. Нейропротекторный эффект ACTH<sub>6–9</sub>PGP заключается в замедлении развития отсроченной кальциевой дизрегуляции и синхронной митохондриальной деполяризации. Из исследуемых пептидов только ACTH<sub>6–9</sub>PGP достоверно увеличивал количество нейронов, восстановивших Ca<sup>2+</sup> гомеостаз после отмены действия Glu. Влияние KKRRPGP было менее выраженным, а PyyRP, наоборот, уменьшал число нейронов с низкой [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Данное исследование позволило выявить высокую терапевтическую значимость ACTH<sub>6–9</sub>PGP и оценить перспективы его возможного клинического применения.

**Ключевые слова:** культивируемые кортикальные нейроны, глутаматная эксайтотоксичность, выживаемость, внутриклеточный кальций, митохондриальный потенциал, пептиды

DOI: 10.31857/S2686738920020067

Регуляторные пептиды являются естественными модуляторами метаболизма и множества различных физиологических процессов в головном мозге, способствуют адаптации клеток к факторам стресса, участвуют в механизмах нейропротекции и пролиферации [1]. Ранее в опытах на культивируемых нейронах нами были получены данные о нейропротекторных эффектах ACTH<sub>4–7</sub>PGP (семакса) и PGP [2]. В условиях индуцированной Glu гибели нейронов семакс и

PGP в зависимости от дозы препарата уменьшали количество нейронов с высоким уровнем Ca<sup>2+</sup>. В исследованиях с участием детей в возрасте до 1 года, перенесших перинатальные нарушения мозгового кровообращения, было выявлено, что длительная (в течение месяца) терапия 0.1% раствором семакса приводит к уменьшению содержания биохимических маркеров повреждения мозга (S100b и NSE) и увеличению уровня маркера репарации нейронов (BDNF) [3]. В настоящее время появились данные, что наиболее коротким фрагментом молекулы АКТГ, сохраняющим нейротрофическую активность, является фрагмент АКТГ(6–9), а присоединение к нему PGP удлиняет время действия этого пептида [5, 6]. ACTH<sub>6–9</sub>PGP повышает жизнеспособность культивируемых клеток глии, полученных из коры больших полушарий мозга крыс с ишемическим повреждением мозга [6]. При исследовании влияния ACTH<sub>6–9</sub>PGP на размер некротического очага у крыс оказалось, что данный пептид, как и семакс, почти вдвое уменьшает размер некроза при развитии ишемического инсульта у крыс [5]. Однако механизмы его нейропротекторного дей-

<sup>1</sup> НМИЦ здоровья детей Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

<sup>3</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>4</sup> Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

<sup>5</sup> МИРЭА — Российский технологический университет, Москва, Россия

<sup>6</sup> Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: bakaeva@nczd.ru, zv.bakaeva@gmail.com

ствия и, в частности, на кальциевый гомеостаз и функцию митохондрий при Glu эксайтотоксичности не изучены. Ранее нами, а также другими авторами было показано, что при токсическом действии Glu в культивируемых нейронах развивается отсроченная кальциевая дисрегуляция (ОКД), сопровождаемая синхронной митохондриальной деполяризацией (МД) [7–9]. Развитие ОКД и МД приводит, в конечном счете, к гибели нейронов путем апоптоза или некроза [7, 10]. Целью настоящей работы являлось изучение влияния АСТН<sub>6–9</sub>РРР на выживаемость культивируемых нейронов, на кальциевый гомеостаз и функцию митохондрий при Glu эксайтотоксичности. Эффекты АКТГ(6–9)–РРР сравнивались с влиянием других синтезированных *de novo* олигопептидов KKRRРРР и РурРР.

## МЕТОДЫ

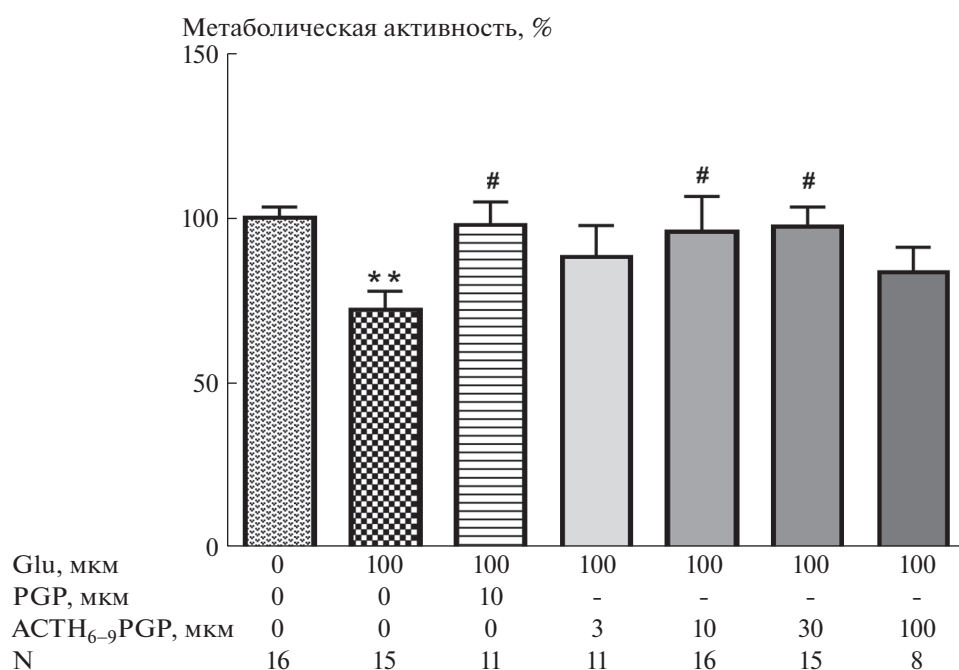
Нейроглиальные культуры приготавливали из коры головного мозга крысят (Р1–Р2) линии Вистар стандартным способом [11]. Эксперименты с животными выполнялись в соответствии с нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом и приказом Минздрава России “Об утверждении правил лабораторной практики” № 708н от 23.08.2010 г.

Выживаемость нейроглиальной культуры в условиях Glu эксайтотоксичности определяли биохимическими методами и морфометрически как отношение живых к мертвым через 24 ч после прекращения действия Glu (100 мкМ, Glu 10 мкМ, — Mg<sup>2+</sup>, 1 ч). Оптическую плотность формазана — восстановленной соли тетразолия (МТТ) или его водорастворимой формы (WST) измеряли с помощью мультимодального планшетного ридера ClarioStars (BMG Labtech, Германия). Полученные данные нормировали, принимая поглощение формазана в контрольных культурах за 100%, а поглощение в лунках, содержащих только буфер, за 0%. Пептиды РурРР и KKRRРРР и АСТН<sub>6–9</sub>РРР добавляли за 1 ч до Glu. Фракцию живых клеток для морфометрического анализа определяли с помощью флуоресцентного зонда Syto-13 (1 мкМ, ex/em 485/530 нм); некротические клетки — по флуоресценции этидиум гомодимера (EthD-1) (2 мкМ, ex/em 565/610 нм); апоптотические клетки — по ядрам клеток, окрашенных Hoechst 33342 (1 мкМ, ex/em 343/483 нм). Флуоресцентные фотографии получали на микроскопе EVOS FL Auto (США) с использованием одноименной рабочей программы. Полученные изображения обрабатывали при помощи открытых программ: Ilastik, CellProfiler, CellProfilerAnalyst, Knime.

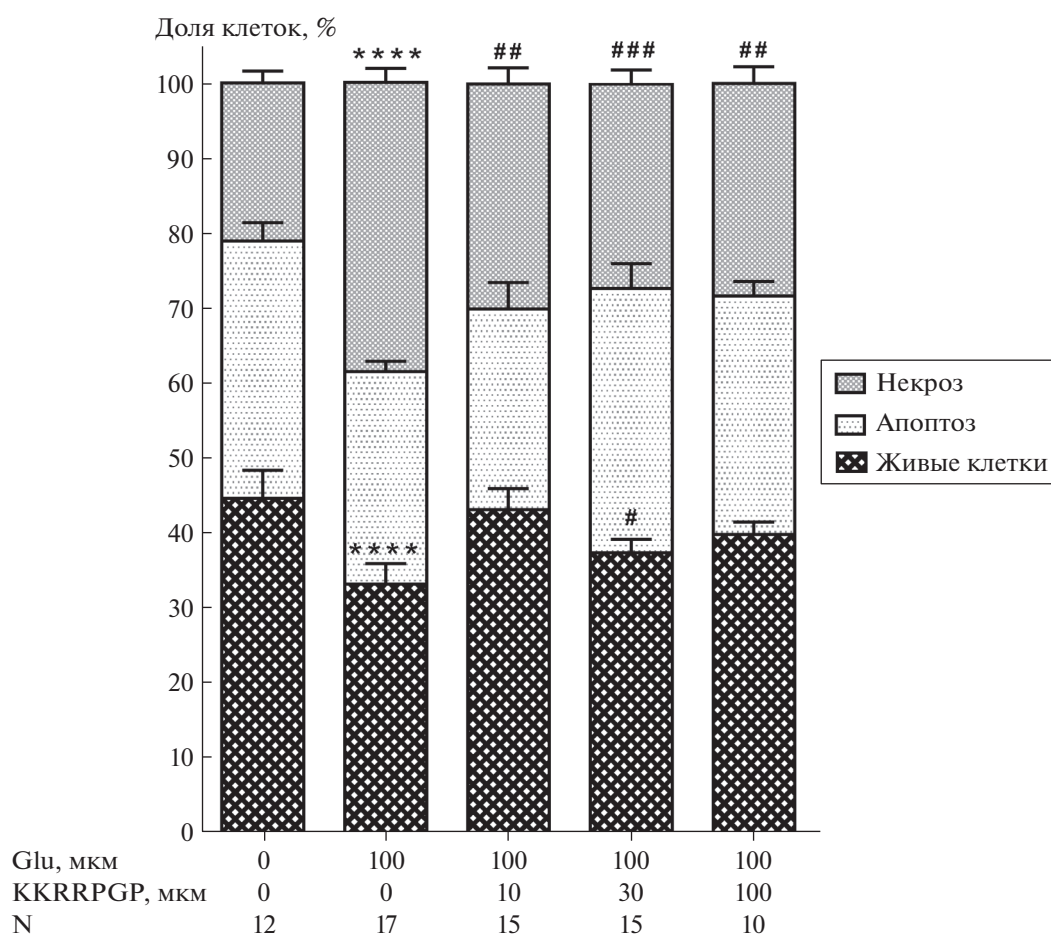
Флуоресцентно-микроскопические измерения концентрации свободного Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) и трансмембранного потенциала митохондрий ( $\Delta\Psi_{mit}$ ) выполнены в индивидуальных клетках с помощью флуоресцентно-микроскопической системы анализа изображения на основе микроскопа Olympus XI-70 (Япония), источника света Lumbda 10-2 (Sutter Instrumets, США), камеры CoolSnap HQ2 (Photometrics, США). Измерения производили непрерывно (1 кадр/30 с), используя низкоаффинный флуоресцентный Ca<sup>2+</sup> индикатор Fura-FF (ex/em 340 и 380/525 нм) и потенциал-чувствительный митохондриальный зонд Rh123 (ex/em 485/525 нм). Измерения выполнены, как описано в статье [7], при температуре 27–29°C в солевом буфере (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 20 HEPES, 5 glucose, pH 7.4. Для отмывания Glu использовали буфер, в котором Ca<sup>2+</sup> заменен на EGTA (100 мкМ) и Mg<sup>2+</sup> (2 мМ). Данные записывали программой MetaFluor в виде изображений всего наблюдаемого участка. Записанные изображения обрабатывали в программе MetaFluor Analyst (Molecular Device Corp., США). Статистическую обработку проводили при помощи программы “GraphPad Prism 6.0” (GraphPad Software Inc., США). В случае нормального распределения данных для оценки различий использовали One-Way Anova with Sidak’s multiple comparisons test; в противном случае — Kruskal-Wallis with Dunn’s multiple comparisons test.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

WST-тест показал гибель клеток (35%) на фоне токсического действия Glu. АСТН<sub>6–9</sub>РРР в концентрациях 10 и 30 мкМ достоверно увеличивал выживаемость клеток на 32 и 34% соответственно. Используемый в настоящей работе в качестве пептида сравнения РРР в дозе 10 мкМ оказывал нейротропный эффект аналогично ранее полученным данным [5]. Предварительная инкубация клеток с пептидом KKRRРРР (3–100 мкМ) приводила к незначительному повышению выживаемости, а РурРР (3–100 мкМ) не оказывал защитного эффекта. Сами пептиды без Glu никак не влияли на смешанную клеточную культуру (не показано). Аналогичные результаты были получены при морфометрической оценке выживаемости и с использованием МТТ, где токсический эффект Glu составил более 50% (не показано). Морфометрический анализ клеточных культур также выявил небольшое увеличение доли живых клеток (15%) при совместной инкубации Glu и KKRRРРР (30 мкМ). Пептид в трех концентрациях (10, 30, 100 мкМ) статистически значимо снижал (21%) долю клеток с некрозом, не влияя на долю апоптотических клеток (рис. 2).



**Рис. 1.** Влияния ACTH<sub>6-9</sub>PGP (3–100 мкМ) на выживаемость нейро-глиальной культуры в условиях глутаматной эксайтотоксичности (WST-тест). М ± SEM, N – количество лунок; \*\**P* < 0.01 к контролю; #*P* < 0.05 к Glu.



**Рис. 2.** Морфологический анализ живых, апоптотических и некротических клеток нейро-глиальной культуры после инкубации с Glu (100 мкМ) и KKRRPGP (10–100 мкМ). М ± SEM, N – количество фотографий, \*\*\*\* – *P* < 0.0001 к контролю, # – *P* < 0.05; ## – *P* < 0.01; ### – *P* < 0.005 к Glu.

**Таблица 1.** Влияние пептидов на кальциевый гомеостаз клеток первичной нейро-глиальной культуры в условиях Glu эксайтотоксичности

| Пептид                  | Параметр                                          |                            |                                  |
|-------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
|                         | [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> после отмены Glu | LAG период                 | Восстановление ΔΨ <sub>mit</sub> |
| ACTH <sub>6-9</sub> PGP | ↓**** – $P < 0.001$ для концентраций 10 и 30 мкМ  | ↑* – $P < 0.05$ для 30 мкМ | ↑** – $P < 0.01$ для 30 мкМ      |
| KKRRPGP                 | ↓** – $P < 0.005$ для 10 мкМ                      | Нет эффекта                | ≪                                |
| PygRP                   | ↑** – $P < 0.01$ для 10 мкМ                       | ≪                          | ↓*** – $P < 0.005$ для 10 мкМ    |

Эффекты показаны в сравнении с Glu (мкМ); проведено 3 эксперимента (~200 клеток) для каждой концентрации.

Как и в предыдущих наших исследованиях, Glu вызывал развитие ОКД и синхронной МД [2, 7]. В большинстве нейронов ОКД заканчивалось развитием Ca<sup>2+</sup>-плато, большая часть клеток была не способна восстановить исходный (доглутаматный) уровень [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. ACTH<sub>6-9</sub>PGP в концентрациях 10 и 30 мкМ повышал количество клеток, восстанавливающих Ca<sup>2+</sup> гомеостаз на 56 и 80% соответственно. Пептид увеличивал на 57% латентный период наступления ОКД (LAG период), т.е. ОКД и синхронная МД развивались позже, чем при действии одного Glu (табл. 1). KKRRPGP только в дозе 10 мкМ повышал на 9% способность клеток возвращаться к исходной [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. PygRP (10 мкМ) вызывал обратный эффект. Способность клеток восстанавливать кальциевый гомеостаз при этом уменьшилась на 17%, а скорость восстановления ΔΨ<sub>mit</sub> снизилась на 52%.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Нейротоксичность высоких доз Glu связана с интенсивным входом Ca<sup>2+</sup> в нейроны, развитием ОКД и синхронной МД, что может играть решающую роль в повреждении и гибели нейронов [8–10]. Происходящие при этом внутриклеточные процессы включают активацию Ca<sup>2+</sup>-зависимых ферментов, например протеаз, с последующим изменением структуры и активности множества белков как в цитозоле, так и в органеллах [12, 13]. В последние годы большое внимание уделяется пептидергической регуляции гомеостаза [1, 4], которая формирует компенсаторно-приспособительные реакции организма на нарушение гомеостатического баланса, что послужило основой для создания лекарственных препаратов. В настоящей работе изучено влияние вновь синтезированных пептидов ACTH<sub>6-9</sub>PGP, KKRRPGP и PygRP на выживаемость нейронов и нарушение Ca<sup>2+</sup> гомеостаза в культивируемых нейрональных клетках коры головного мозга при Glu эксайтотоксичности. Анализ выживаемости с помощью биохимических тестов показал, что ни один из исследуемых пептидов не оказывает токсическо-

го влияния на первичную нейро-глиальную культуру коры. Однако только ACTH<sub>6-9</sub>PGP (10 и 30 мкМ) повышает (31 и 34%) способность нейронов противостоять эксайтотоксическому действию Glu. Другие пептиды KKRRPGP и PygRP не проявили выраженного защитного действия. Неожиданно выявленный при морфометрическом анализе, нейропротекторный эффект KKRRPGP, вероятно, связан с высокой чувствительностью данного метода.

Ранее мы показали, что семакс и PGP обладают нейропротекторным действием, нормализуя избыточную [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> в нейронах, причем PGP был более эффективным, чем семакс [2]. В настоящем исследовании было обнаружено, что ACTH<sub>6-9</sub>PGP (10 и 30 мкМ) защищает нейроны от токсического действия Glu, увеличивая время наступления ОКД и количество нейронов восстановивших Ca<sup>2+</sup> гомеостаз. Менее выраженным эффектом обладал KKRRPGP, а PygRP, наоборот, данные параметры снижал. В опытах *in vivo* было показано, что ACTH<sub>6-9</sub>PGP обладает ноотропной активностью, но длительность его эффекта значительно меньше, чем у семакса [5]. В настоящей работе в условиях *in vitro* ACTH<sub>6-9</sub>PGP в отличие от семакса [5] был эффективен в меньших дозах.

Таким образом, проведенные исследования показали, что ACTH<sub>6-9</sub>PGP и KKRRPGP защищают нейрональные клетки, нормализуя Ca<sup>2+</sup> гомеостаз, в то время как PygRP не обладает таким эффектом.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантами РФФИ (КОМФИ) № 17-00-00105 и 17-00-00106.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

# ИНФОРМАЦИЯ О ПОЛУЧЕНИИ РАЗРЕШЕНИЯ НА ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ С УЧАСТИЕМ ЖИВОТНЫХ

Эксперименты с животными выполняли в соответствии с нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом и приказом Минздрава России “Об утверждении правил лабораторной практики” № 708н от 23.08.2010 г.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bezuglov V.V., Akimov M.G., Gretskeya N.M., et al. // Horizons in Neuroscience Research. 2015. V. 21. P. 151–170. ISBN: 978-1-63482-967-0
2. Сторожевых Т.П., Тухбатова Г.Р., Сенишова Я.Е., и др. // БЭБиМ. 2007. Т. 143. № 5. С. 538–541. <https://doi.org/10.1007/s10517-007-0192-x>
3. Пинелис В.Г., Сурин А.М., Сорокина Е.Г., и др. // Глава в монографии “Нейробиологические основы возникновения и восстановительного лечения перинатального поражения центральной нервной системы у детей”. Изд-во “Педиатр”, 2016. С. 9–76. ISBN: 978-5-906332-79-0
4. Мясоедов Н.Ф. // Вестник Российской академии наук. 2016. Т. 86. № 6. С. 488. <https://doi.org/10.7868/S0869587316060074>
5. Левицкая Н.Г., Глазова Н.Ю., Себенцова Е.А., и др. // Рос. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова. 2019. Т. 105. № 6. С. 761–770. <https://doi.org/10.1134/S0869813919060049>
6. Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Нагаев И.Ю., и др. // Биоорганическая химия. 2013. Т. 39. № 3. С. 320–325. <https://doi.org/10.1134/S1068162011040133>
7. Сурин А.М., Красильникова И.А., Пинелис В.Г. и др. // Патогенез. 2014. Т. 12. № 4. С. 40–46.
8. Khodorov B. // Progress in Biophysics & Molecular Biology. 2004. V. 86. P. 279–351. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.10.002>
9. Nicholls D.G. // Biochem. Soc. Trans. 2009. № 37. P. 1385–1388. <https://doi.org/10.1042/BST0371385>
10. Brustovetsky T., Li V., Brustovetsky N. // Cell Calcium. 2009. V. 46. № 1. P. 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.03.017>
11. <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/protocol-culturing-rat-cortical-neurons>
12. Hardingham G.E., Bading H. Nature Reviews Neuroscience. 2010. V. 10. № 11. P. 682. <https://doi.org/10.1038/nrn2911>
13. Duchen M.R. // Pflügers Archiv-European Journal of Physiology. 2012. V. 1. № 464. P. 111–121. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1112-0>

## NEUROPROTECTIVE POTENTIAL OF PEPTIDES HFRWPGP (ACTH<sub>6-9</sub>PGP), KKRRPGP, PyrRP IN CULTURED CORTICAL NEURONS AT GLUTAMATE EXCITOTOXICITY

Z. V. Bakaeva<sup>a, #</sup>, A. M. Surin<sup>a, b</sup>, N. V. Lizunova<sup>a, c</sup>, A. E. Zgodova<sup>a, d</sup>, I. A. Krasilnikova<sup>a</sup>, A. P. Fisenko<sup>a</sup>,  
D. A. Frolov<sup>e</sup>, L. A. Andreeva<sup>f</sup>, Academician N. F. Myasoedov<sup>f</sup>, and V. G. Pinelis<sup>a</sup>

<sup>a</sup> National Medical Research Center for Children's Health of the Russian Federation Ministry of Health, Moscow, Russia

<sup>b</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

<sup>c</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>d</sup> The First Sechenov Moscow State Medical University under Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

<sup>e</sup> MIREA-Russian Technological University, Moscow, Russia

<sup>f</sup> Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>#</sup>e-mail: bakaeva@nczd.ru, zv.bakaeva@gmail.com

Glutamate (Glu) excitotoxicity, arising from brain ischemia or traumatic brain injury, is the leading mechanism of neuronal death. In present work, we studied the effects of the peptides HFRWPGP (ACTH<sub>6-9</sub>PGP), KKRRPGP, and PyrRP on the survival of cultured cortical neurons at excitotoxicity of Glu (100 μM). Biochemical (MTT/WST) and morphometric analyzes showed that depending on the dose, ACTH<sub>6-9</sub>PGP and KKRRPGP protect neurons from the cells death, while PyrRP – enhances. The neuroprotective effect of ACTH<sub>6-9</sub>PGP is accompanied by a slowdown in the development of delayed calcium dysregulation and synchronous mitochondrial depolarization. Among the studied peptides, only ACTH<sub>6-9</sub>PGP significantly increased the number of neurons that restored Ca<sup>2+</sup> homeostasis after Glu was canceled. The influence of KKRRPGP was less pronounced, and PyrRP, on the contrary, reduced the number of neurons with low [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Thus, this study revealed the high therapeutic significance of ACTH<sub>6-9</sub>PGP and assessed the prospects for its possible clinical use.

**Keywords:** cultured cortical neurons, glutamate excitotoxicity, survival, intracellular calcium, mitochondrial potential, peptides