

# НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-12-3-7

## СМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДЫ К СУБЪЕДИНИЦЕ GLUN1 N-МЕТИЛ-D-АСПАРТАТНОГО РЕЦЕПТОРА УСИЛИВАЮТ ДОЛГОВРЕМЕННУЮ ПОСТТЕТАНИЧЕСКУЮ ПОТЕНЦИАЦИЮ В СРЕЗАХ МОЗГА

А. А. Мокрушин<sup>1</sup>

GluN1 субъединица является основным структурным компонентом *N*-метил-D-аспаратного (NMDA) рецептора. Для того чтобы выяснить её участие в долговременной посттетанической потенциации (ДПП), срезы обонятельной коры мозга крыс инкубировали в среде со смысловыми (5'-ctacaacgtacaagtagt-3') и антисмысловыми (5'-cagcag-gtgcattgtgct-3') олигодезоксинуклеотидами (ОДН) в концентрации  $10^{-8}$  М в течение 6 ч. В срезах регистрировали изменения амплитуд NMDA-потенциалов на электрическую тетанизацию латерального обонятельного тракта (частота 100 Гц с интервалом 200 мс, 10 эпизодов). Смысловые ОДН усиливали ДПП (смысловые ОДН —  $(210 \pm 15)\%$ , по сравнению с контрольной ДПП —  $(158 \pm 9)\%$ ,  $U = 22$ ,  $n = 11$ ,  $p \leq 0,05$ ). Антисмысловые ОДН вызвали развитие устойчивой долговременной посттетанической депрессии (антисмысловые ОДН —  $(52 \pm 7)\%$ , в сравнении с контрольной ДПП —  $(154 \pm 9)\%$ ,  $U = 22$ ,  $n = 11$ ,  $p \leq 0,05$ ). Стимулирующий эффект смысловых ОДН ( $10^{-8}$  М) был более выражен, чем эффект пирацетама ( $10^{-5}$  М): смысловые ОДН —  $(212,7 \pm 18)\%$ , в сравнении с пирацетамом —  $(148,9 \pm 13)\%$ ,  $U = 22$ ,  $n = 8$  ( $p \leq 0,05$ ). Полученные данные доказывают существенное и активное участие субъединицы GluN1 NMDA рецепторов в усилении развития ДПП в срезах обонятельной коры и свидетельствуют о стимулирующем эффекте смысловых ОДН.

**Ключевые слова:** смысловые и антисмысловые олигодезоксинуклеотиды; GluN1 — субъединица NMDA рецептора; длительная посттетаническая потенция; срезы мозга; крысы.

## ВВЕДЕНИЕ

Усиление процессов обучения является одной из актуальных тем современной нейробиологии. В настоящее время основными классами препаратов, используемых в качестве потенциальных когнитивных стимуляторов, являются некоторые психостимуляторы (например, метилфенидат, модафинил), а также активаторы рецепторов альфа-амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовой кислоты (AMPA) — AMPA-кины. AMPA-кины — класс веществ, которые связываются с глутаматергическим AMPA-рецептором, вызывают его активацию, замедляют дезактивацию и ослабляют десенсibilлизацию токов AMPA-рецепторов. Следует отметить, что AMPA-кины увеличивают синаптические реакции в кортикальных нейронных сетях и индуцируют AMPA-зависимую долговременную посттетаническую потенцию [11].

Другим потенциальным стимулятором обучения, как полагают, являются ионотропные глутаматные *N*-метил-D-аспаратные (NMDA) рецепторы. Выявлено, что NMDA-зависимые механизмы являются доминирующим звеном в возбуждающих глутаматергических процессах. Доказано, что NMDA-зависимые механизмы участвуют в развитии обучения и формирования следов памяти в виде долговременной посттетанической потенции [7].

NMDA-рецепторы — это гетеротетрамерные структуры, образованные комбинацией субъединиц: 2 субъединицы GluN1 и 2 субъединицы GluN2 или GluN3. Они формируют ионные каналы, через которые в нейроны при их возбуждении поступает  $Ca^{2+}$ . Установлено, что GluN1 как обязательная субъединица играет главную роль в функционировании NMDA-рецепторов [10]. В настоящее время изменения функций NMDA-рецепторов рассматривают как способ усиления процессов обучения [10], а химические вещества, повышающие активность этих рецепторов — как потенциальные ноотропные препараты.

<sup>1</sup> ФГБУН Институт физиологии имени И. П. Павлова РАН, Россия, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6.  
e-mail: mok@inbox.ru

Рассматривая механизмы действия олигодезоксинуклеотидов (ОДН), следует отметить, что при их использовании можно корректировать процессы в клетке, не затрагивающие целостность генома [3]. ОДН представляют собой короткие последовательности нуклеотидов и применяются для направленного блокирования экспрессии генов. ОДН присоединяются к специфической мРНК, индуцируют трансляцию и, следовательно, усиливают выработку специфических белков [12]. Такое воздействие позволяет временно и с высокой специфичностью воздействовать на любой процесс в клетке. В настоящее время создание фармакологических веществ (ФВ) на основе ОДН — одно из перспективных и успешных направлений при разработке лекарственных средств.

На основании приведенных данных в настоящей работе были изучены эффекты смысловых ОДН к субъединице GluN1 NMDA рецептора для усиления долговременной посттетанической потенциации (ПТП) как нейрональной модели обучения на срезах обонятельной коры мозга крыс [1].

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованиях использовали 20 белых крыс-самцов линии Вистар массой 180 – 200 г. Все эксперименты проведены на крысах из “Коллекции лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности” Института физиологии имени И. П. Павлова РАН, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенными European Communities Council Directive (86/609 ЕЕС). Опыты были проведены в строгом соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных (1994 г.) и с руководящими принципами этического кодекса Института физиологии имени И. П. Павлова Российской академии этического кодекса (1996 г.).

Из мозга крыс изготавливали тангенциальные срезы толщиной 450 – 500 мкм (станок Емельянова, Институт физиологии имени И. П. Павлова РАН, Россия). Срезы помещали в проточную камеру для регистрации электрической активности (Институт физиологии имени И. П. Павлова РАН, Россия) и перфузировали со скоростью 2 мл/мин жидкостью следующего состава, мМ: NaCl — 124,0; KCl — 5,0; CaCl<sub>2</sub> — 2,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 1,24; MgSO<sub>4</sub> — 1,2; NaHCO<sub>3</sub> — 3,0; глюкоза — 10,0; tris-HCl — 23,0. Инкубационный раствор оксигенировали, рН среды составлял 7,2 – 7,3.

В срезах внеклеточно регистрировали амплитуды NMDA-компонента возбуждающего постсинаптического потенциала (ВПСП, в дальнейшем — NMDA-потенциалы) стеклянными микроэлектродами, заполненными 1 М NaCl сопротивлением 1 – 5 МОм, в ответ на одиночные ортодромные электрические импульсы

латерального обонятельного тракта (стимулятор ЭСУ-1, Россия). Параметры стимуляции: импульсы прямоугольной формы длительностью 0,1 мс, интенсивностью 1 – 3 В, частотой 0,003 Гц. Индифферентный серебряный электрод располагали в камере. NMDA-индуцированные потенциалы оцифровывали аналого-цифровым преобразователем Е20 – 10 (Россия) с частотой квантования 20 кГц и обрабатывали на компьютере с помощью специальной компьютерной программы “Анализ электрической активности нейронов” (Институт физиологии имени И. П. Павлова РАН).

В настоящей работе были изучены влияния смысловых (5'-ctacaacgtacaagtagt-3') ОДН, а также антисмысловых (5'-cagcaggtgcatggtgct-3') ОДН на долговременную посттетаническую потенцию в срезах обонятельной коры крыс-самцов линии Вистар.

Срезы инкубировали в стеклянных флаконах в искусственной цереброспинальной жидкости (состав приведен выше) объемом 1 мл со смысловыми или антисмысловыми ОДН в концентрации 10<sup>-8</sup> М, а также пирacetамом (10<sup>-5</sup> М, “Химреактив”, Россия) в течение 6 ч в аппарате Варбурга (Модель ВА 01 10, Германия) при температуре 37 °С. Приготовление срезов, их инкубацию, регистрацию электрической активности проводили по методике, описанной ранее [6].

В начале каждого опыта в срезах регистрировали NMDA-потенциалы в течение 15 мин при стимуляции латерального обонятельного тракта с частотой 0,003 Гц. Средние значения амплитуд этих потенциалов рассматривали как контрольные для данного среза. Затем производили электрическую тетанизацию латерального обонятельного тракта с параметрами: частота 100 Гц с интервалом 200 мс, 10 эпизодов. Далее в течение 85 мин после тетанизации регистрировали амплитуду NMDA- потенциалов на одиночное раздражение латерального обонятельного тракта. Полученные значения амплитуд NMDA потенциалов выражались в % по отношению к контрольным величинам амплитуд для данного среза. Таким способом определялось развитие долговременной ПТП в каждом срезе. Исследовали эффекты смысловых и антисмысловых ОДН, а также пирacetам в отношении развития долговременной ПТП. На одном срезе тестировали влияние только одного ФВ. Смысловые ОДН были изучены на 11, антисмысловые — на 11, пирacetам — на 8 срезах и долговременная ПТП была протестирована на 10 срезах, соответственно. Концентрация смысловых и антисмысловых ОДН 10<sup>-8</sup> М была установлена в ранее проведенных экспериментах как наиболее эффективная. Концентрация пирacetам (10<sup>-5</sup> М) была определена на основании исследований, выполненных на срезах гиппокампа [9].

ОДН были синтезированы в Государственной научной корпорации “Вектор” (Новосибирск, Россия), чис-

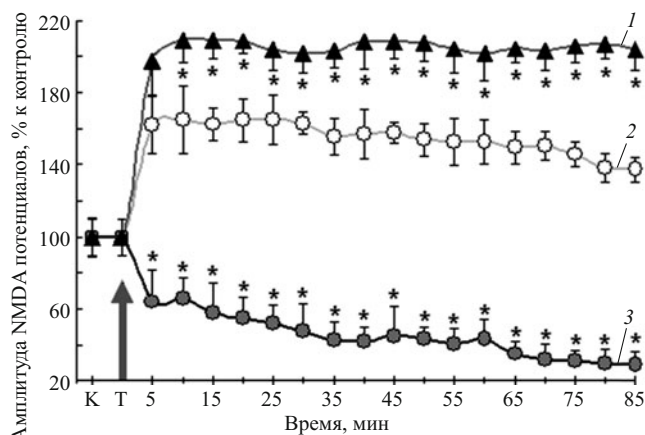
тота 95 %. Все химические реактивы, необходимые для изготовления инкубационной среды, и пирарцетам были получены от фирмы “Химреактив” (Россия).

Статистическую обработку производили с использованием непараметрического параметра *U*-критерия, Вилкоксона — Манна — Уитни, различия признавали достоверными при  $p \leq 0,05$ . Количественные данные были выражены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего значения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Было обнаружено, что амплитудные значения NMDA-потенциалов в срезах мозга, возникающих в ответ на стимуляцию латерального обонятельного тракта с частотой 0,003 Гц, существенно не изменялись (различия составляли 5 – 7 %,  $n = 7$ ) после 6 ч инкубации срезов со смысловыми и антисмысловыми ОДН. Напротив, после электрической тетанизации латерального обонятельного тракта (частота 100 Гц с интервалом 200 мс, 10 эпизодов) амплитуды NMDA-потенциалов значительно модифицировались в зависимости от обработки срезов ОДН: увеличение на  $(107 \pm 10) \%$  (смысловые,  $n = 7$ ); снижение на  $(58 \pm 15) \%$  (антисмысловые,  $n = 7$ ), соответственно.

Выявленные модификации амплитуд NMDA-потенциалов были исследованы при действии смысловой ОДН на развитие долговременной ПТП в срезах мозга. После 6 ч инкубации срезов в присутствии смысловой ОДН электрическая тетанизация латерального обонятельного тракта приводила к более быстрой индукции, увеличению амплитуды и удлинению потенцированного состояния NMDA-зависимой долговременной ПТП, по сравнению с развитием ПТП в контрольных условиях (без воздействия смысловых ОДН) (рисунок, кривые 1, 2). Статистический анализ кривых долговременной ПТП при действии смысловой ОДН (1) и контрольной (2) с помощью *U*-критерия показал существенные различия в фазе поддержания — интервал времени увеличенного значения амплитуд NMDA-потенциалов. Долговременная ПТП между контрольными срезами (без обработки смысловыми ОДН и пирарцетамом) и срезами, обработанными смысловыми ОДН ( $U = 18$ ,  $n = 11$ ,  $p \leq 0,05$  для каждой точки, начиная с 10 мин после тетанизации латерального обонятельно-



Развитие NMDA-зависимой долговременной ПТП в срезах обонятельной коры мозга крыс при аппликации смысловой  $10^{-8}$  М (1), антисмысловой ОДН  $10^{-8}$  М (3) и в контроле (2) без воздействия фармакологических веществ, при электрической тетанизации латерального обонятельного тракта (частота 100 Гц с интервалом 200 мс, 10 эпизодов).

К — значения амплитуд NMDA потенциалов до электрической тетанизации срезов. Т — стрелка вверх — электрическая тетанизация латерального обонятельного тракта.

\* Достоверность отличия  $p \leq 0,05$ , *U*-критерий Вилкоксона — Манна — Уитни,  $n = 11$  для каждой точки кривых 1, 3;  $n = 10$ , кривая 2.

го тракта статистически достоверно различались. В фазу поддержания долговременной ПТП амплитуды NMDA-потенциалов значительно и статистически достоверно возрастали —  $(210 \pm 15) \%$ , в сравнении с контролем ( $158 \pm 9) \%$ ,  $U = 22$ ,  $n = 11$  ( $p \leq 0,05$ ). Следует отметить, что длительность долговременной ПТП в обработанных срезах пролонгировалась как минимум до 85 мин, а в контрольных срезах наблюдали фазу снижения амплитуд долговременной ПТП, начиная с 70 мин (рисунок, кривые 1, 2).

Таким образом, действие смысловых ОДН на срезы мозга сопровождалось усилением процессов долговременной ПТП, по сравнению с развитием ПТП без воздействия смысловых ОДН на срезы мозга. Полученные данные позволяют предположить, что смысловые ОДН обладают свойствами стимулятора NMDA-зависимых процессов долговременной ПТП как модели нейронального процесса обучения [1].

В другой серии опытов была протестирована активность NMDA-зависимых механизмов при действии

### Эффекты пирарцетама ( $10^{-5}$ М), смысловых и антисмысловых ОДН на долговременную ПТП, по сравнению с контролем (развитием долговременной ПТП без аппликации препаратов)

Группа	Среднее значение долговременной ПТП, мкВ
Контрольная ПТП без ФВ	$158,3 \pm 14$ ( $n = 10$ )
ПТП при действии смысловых ОДН	$212,7 \pm 18^*$ ( $n = 10$ )
ПТП при действии антисмысловых ОДН	$50,6 \pm 9^*$ ( $n = 10$ )
ПТП при действии пирарцетама	$148,9 \pm 13^*$ ( $n = 8$ )

\* Достоверное отличие значений ПТП (смысловые, антисмысловые, пирарцетам) по сравнению с контролем,  $p \leq 0,05$ , *U*-критерий Вилкоксона — Манна — Уитни.

антисмысловой ОДН на развитие долговременной ПТП.

В результате проведенных исследований обнаружено, что эффекты антисмысловых ОДН субъединицы GluN1 существенно отличались от таковых для смысловых ОДН. Антисмысловые ОДН инвертировали развитие долговременной ПТП, по сравнению с контролем (без воздействия ОДН), в долговременную посттетаническую депрессию (ПТД), которая была устойчивой и ее длительность сохранялась как минимум в течение 85 мин (рисунок, кривые 2, 3).

Таким образом, выявленные данные продемонстрировали, что действие антисмысловых ОДН на срезы сопровождалось ухудшением процессов долговременной ПТП, которая инвертировалась в долговременную ПТД: антисмысловые ОДН —  $(52 \pm 7) \%$ , в сравнении с контрольной долговременной ПТП —  $(154 \pm 9) \%$ ,  $U = 22$ ,  $n = 11$  ( $p \leq 0,05$ ).

Необходимо отметить, что длительные синаптические изменения связаны с активацией NMDA-зависимых глутаматергических механизмов [5, 10]. Установлено, что активность ионных каналов NMDA-рецепторов зависит от состава их субъединиц. Субъединица GluN1 NMDA-рецепторов является обязательным компонентом [4] для функционирования ионного кальциевого канала этих рецепторов [10].

Установив усиление долговременной ПТП, индуцированное смысловыми ОДН, мы сравнили этот эффект с влиянием пирacetама. Пирacetам рассматривается как метаболический стимулятор, который усиливает функции митохондрий и связанных с ними эффектов [9]. Известно, что пирacetам улучшает обучение и память при когнитивных расстройствах [13]. Многократное введение пирacetама мышам приводило к увеличению активности NMDA-рецепторов в головном мозге и повышало их сродство к глутамату [2]. Апликация пирacetама на нейроны поля CA3 срезов гиппокампа морских свинок вызывала увеличение амплитудных значений долговременной ПТП [8].

В наших опытах были исследованы эффекты пирacetама на развитие долговременной ПТП в срезах обонятельной коры крыс. Величины долговременной посттетанической потенциации определяли на 20 мин после тетанизации срезов как при действии пирacetама ( $10^{-5}$  М), так и при действии смысловых и антисмысловых ОДН ( $10^{-8}$  М), а также в контрольных условиях без воздействия ФВ. Результаты проведенных исследований представлены в таблице.

Из данных, представленных в таблице, видно, что выраженное усиление долговременной ПТП вызывали только смысловые ОДН. Влияние пирacetама на амплитуду долговременной ПТП было сопоставимо с развитием долговременной ПТП в контроле (без апликации ФВ). Отметим, что эффект пирacetама был достоверно меньше, чем смысловых ОДН. Антисмы-

словые ОДН не вызывали усиления долговременной ПТП, и напротив, индуцировали долговременную ПТД, амплитуды NMDA-потенциалов были ниже в среднем в 3 раза, чем на фоне пирacetама.

Представленные сведения свидетельствуют о том, что исследования механизмов действия смысловых олигонуклеотидов, усиливающих функции NMDA-рецепторов, по-видимому, необходимо осуществлять при создании ноотропных ФВ.

## ВЫВОДЫ

1. Смысловые олигодезоксинуклеотиды к субъединице GluN1 NMDA-рецепторов вызывают устойчивое усиление NMDA-зависимой долговременной ПТП в срезах мозга.
2. Антисмысловые олигодезоксинуклеотиды к субъединице GluN1 NMDA рецепторов вызывают торможение активности NMDA-зависимых механизмов при развитии долговременной ПТП в срезах мозга.
3. Стимулирующее влияние смысловых олигодезоксинуклеотидов на NMDA-зависимую долговременную ПТП в срезах мозга было более выражено, по сравнению с пирacetамом.

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

## ЛИТЕРАТУРА

1. G. L. Collingridge, A. Volianskis, N. Bannister, et al., *Neuropharmacology*, **64**, 13 – 26 (2013); doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.06.051.
2. S. A. Cohen, W. E. Müller, *Pharmacology*, **47**, 217 – 222 (1993); doi: 10.1159/000139100.
3. J. Kurreck, *Eur. J. Biochem.*, **270**(8), 1628 – 1644 (2003); doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03555.x.
4. S. S. Mahajan, K. H. Thai, K. Chen, et al., *Neuroscience*, **25**, 305 – 315 (2011); doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.05.027.
5. M. L. Mayer, *Cur. Opin. Neurobiol.*, **21**, 283 – 290 (2011); doi: 10.1016/j.conb.2011.02.001.
6. A. A. Mokrushin, *Regulatory Peptides*, **188**, 185 – 190 (2013); doi: 10.1016/j.regpep.2013.11.001.
7. T. Narahashi, S. Moriguchi, X. Zhao, et al., *Biol. Pharmacol. Bul.*, **27**, 1701 – 1706 (2004); doi: 10.1248/bpb.27.1701.
8. M. Satoh, K. Ishihara, H. Katsuki, *Neurosci. Let.*, **93**, 236 – 241 (1988); doi: 10.1016/0304-3940(88)90088-2.
9. C. Stockburger, D. Miano, T. Pallas, et al., *Neural Plasticity*, **2016**, 1 – 14 (2016); doi: 10.1155/2016/8075903.
10. S. E. Traynelis, P. W. Lonnie, J. Mc. B. Chris, et al., *Pharmacol. Rev.*, **62**, 405 – 496 (2010); doi: 10.1124/pr.109.002451.
11. K. R. Urban, W. J. Gao, *Front Syst Neurosci.*, **8**, 38 (2014); doi: 10.3389/fnsys.2014.00038.
12. P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **75**, 280 – 284 (1978); doi: 10.1073/pnas.75.1.280.
13. H. Zhi, H. Min, Z. Yun-hong, et al., *Cel. Mol. Neurobiol.*, **34**, 539 – 547 (2014); doi: 10.1007/s10571 – 014 – 0037-x.



## SENSE OLIGODEOXYNUCLEOTIDES FOR GLUN1 SUBUNIT OF N-METHYL-D-ASPARTATE RECEPTOR ENHANCE THE LONG-TERM POST-TETANIC POTENTIATION IN BRAIN SLICES

A. A. Mokrushin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> I. P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034, Russia

e-mail: mok@inbox.ru

GluN1 subunit is the major structural component of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. In order to elucidate its participation in long-term post-tetanic potentiation (LTP), slices of the olfactory cortex of the rat brain were incubated in a medium with sense (5'-ctacaacgtacaagtagt-3') and antisense (5'-cagcagtgcatggtct-3') oligodeoxynucleotides (ODN) at a concentration of  $10^{-8}$  M for 6 h. In these slices we detected changes of NMDA potential amplitudes on electrical tetanization of lateral olfactory tract (at 100 Hz frequency with 200 ms interval, 10 episodes). Sense ODN on the slices enhanced LTP ( $210.0 \pm 15.0\%$ ) compared to control LTP ( $158.0 \pm 9.0\%$ ,  $U = 22$ ,  $n = 11$ ,  $p < 0.05$ ). The effects of antisense ODN led to the development of persistent LTP depression (antisense ODN,  $52.0 \pm 7.0\%$  vs. control LTP ( $154.0 \pm 9.0\%$ ,  $U = 22$ ,  $n = 11$ ,  $p < 0.05$ ). The enhancing effect of sense ODN ( $10^{-8}$  M) was more pronounced compared to piracetam ( $10^{-5}$  M) (sense ODN,  $212.7 \pm 18.0\%$  vs. piracetam  $148.9 \pm 13.0\%$ ,  $U = 22$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ ). The obtained data indicate significant and active participation of GluN1 subunit of NMDA receptors in the enhancement of LTP in slices of the olfactory cortex and indicate the enhancer potential of sense ODN.

**Keywords:** sense and antisense oligodeoxynucleotides; GluN1 NMDA receptor subunit; long-term post-tetanic potentiation; brain slices; rats.

### Глубокоуважаемые читатели!

Просим поддержать журнал «Экспериментальная и клиническая фармакология» и оформить на него подписку, так как это единственный источник финансирования издания.

*Редакция журнала*

*«Экспериментальная и клиническая фармакология»*