

## НЕЙРОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ГЕКТАПЕПТИДА МИСТИКСИНА НА ПЕРЕЖИВАЮЩИХ СРЕЗАХ МОЗГА

А. А. Мокрушин<sup>1</sup>

Нейротропные эффекты гектапептида мистиксина изучены на нейронах обонятельной коры переживающих срезах мозга крыс. Аппликация мистиксина на срезы мозга дозо-зависимо угнетает активность AMPA- и NMDA-рецептор-зависимых процессов. Пептид вызывает угнетение активности тормозных процессов лишь в малых дозах (10, 25, 50 мг/мл), а в более высоких дозах (100, 250 мг/мл) усиливает их. Эти эффекты мистиксина обратимы, после отмывания активности возбуждающих (кроме NMDA-связанных) и тормозных механизмов восстанавливаются.

**Ключевые слова:** переживающие срезы мозга, гектапептид мистиксин, фокальные потенциалы

### ВВЕДЕНИЕ

Мистиксин является синтетическим эндогенным КРФ (кортикотропин-рилизинг-фактор) – подобным гектапептидом со следующей аминокислотной структурой: p-anisoyl-Arg-Lys-Leu-Leu-D-Thi-Phe-D-Leu-NH<sub>2</sub>. В экспериментах на целых животных показано, что внутривенное введение мистиксина угнетает набухание, вызванное воспалительным процессом [6], вызывает гипотензивный эффект [3], тормозит вытекание плазмы крови при механической травме [3], индуцирует вход кальция в клетки и параллельно этому приводит к мобилизации кальция из 1,4,5-инозитолтрифосфат — чувствительных Ca<sup>2+</sup>-пулов [5], поддерживает структурную интегрированность тканей после механического повреждения [4] и, как полагают, пептид противодействует воспалительным процессам в периферических тканях [7].

Эти свойства мистиксина были обнаружены на периферических тканях целого организма, однако нейротропные эффекты мистиксина не исследовались. Представляло интерес изучить действие мистиксина в разных концентрациях на активность нейронов в переживающих срезах обонятельной коры мозга крыс. Особое внимание было уделено изучению влияния этого пептида на глутаматергические, ионотропные механизмы синаптической передачи, а также на ГАМК<sub>B</sub>-ергические процессы.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 180 – 200 г с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенными European Communities Council Direction (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; CaCl<sub>2</sub> — 2,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 1,24; MgSO<sub>4</sub> — 1,2;

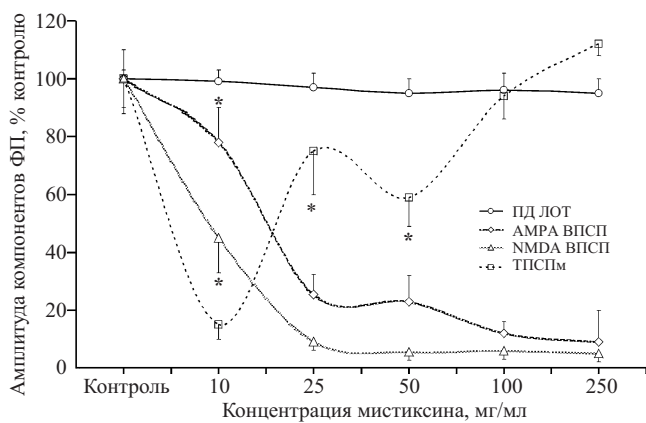
NaHCO<sub>3</sub> — 3,0; глюкоза — 10,0; трис-HCl — 23,0. Перфузионный раствор продували кислородом, температуру поддерживали на уровне 37°C, pH 7,2 – 7,3.

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, частотой 0,003 Гц) латерального обонятельного тракта (ЛОТ), который является главным афферентным входом к клеткам структур обонятельной коры. Индифферентный серебряный электрод располагали в камере.

ФП усиливали (усилитель НТО, Россия), оцифровывали при помощи аналогоцифрового устройства (МД 32, Россия) с частотой квантования 20 кГц и обрабатывали на компьютере с помощью специальной программы. Анализировали 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 — AMPA- и NMDA-глутаматергические рецепторные компоненты возбуждающего постсинаптического потенциала (ВПСП). Первый из них (AMPA ВПСП) активируется α-амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовой кислотой, второй (NMDA ВПСП) — N-метил-D-аспаратом. Кроме того, количественному анализу активности тормозных механизмов были подвергнуты изменения амплитуд медленного тормозного постсинаптического потенциала (ТПСПм), генерируемого ГАМК<sub>B</sub>-ергическими процессами. Подробно параметры и способы измерения амплитуд этих потенциалов описаны ранее [2].

В данной работе изучали нейротропные эффекты аппликации пептида мистиксина (University Berkeley, USA), в концентрациях 10, 25, 50, 100 и 250 мг/мл на срезах мозга. Мистиксин растворяли в инкубационной среде непосредственно перед опытом. Схема эксперимента была следующей. В течение 15 мин регистрировали контрольные ФП в срезах, затем воздействовали раствором с мистиксином с одной из концентраций в

<sup>1</sup> Государственное учреждение РАН Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6. E-mail: mok@inbox.ru



**Рис. 1.** Влияние различных концентраций мистиксина на амплитуды отдельных компонентов фокальных потенциалов (ФП) в срезах обонятельной коры мозга крыс.

По оси абсцисс — шкала неравномерная. Отличия достоверны от контрольных значений при \* —  $p \leq 0,05$ . Для остальных точек на графике отличия определяются по значениям погрешностей (U-критерий, Вилкоксона-Манна-Уитни).

течение 30 мин. Далее срезы отмывали инкубационной средой без пептида в течение 20 мин. Частота раздражения латерального обонятельного тракта (ЛОТ) в контроле и при действии мистиксина была 0,003 Гц.

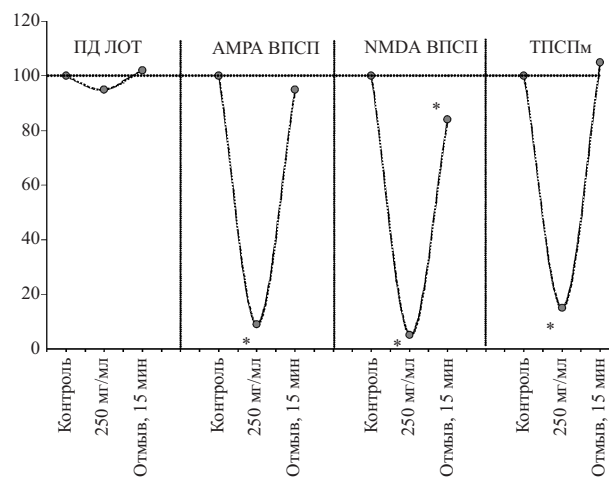
Статистическую обработку полученных результатов проводили по непараметрическому критерию (U-критерий, Вилкоксона-Манна-Уитни). Различия признавали достоверными при  $p \leq 0,05$ . Опыты проведены на 53 срезах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Аппликация мистиксина на срезы мозга в концентрациях 10, 25, 50, 100 и 250 мг/мл не оказывала достоверного влияния на амплитуду пресинаптического компонента ФП — ПД ЛОТ. Это свидетельствует о том, что мистиксин в исследованных концентрациях не воздействовал на процессы проведения возбуждения по волокнам ЛОТ (рис. 1).

Действие мистиксина в концентрациях 10, 25, 50, 100 и 250 мг/мл на механизмы ионотропной глутаматергической возбуждающей синаптической передачи выражалось в угнетении амплитуды АМРА ВПСР концентрационно-зависимым образом (рис. 1). При тестировании мистиксина в наименьшей концентрации 10 мг/мл угнетение АМРА ВПСР составляло в среднем 22 % и достоверно отличалось от контроля ( $U = 12, n = 10$  — контроль;  $n = 17$  — мистиксин,  $p \leq 0,05$ ). При более высоких концентрациях мистиксина (25, 50, 100, 250 мг/мл) угнетение АМРА ВПСР было более значительным и составляло в среднем 83 % (рис. 1).

Активность NMDA-зависимых механизмов угнеталась при воздействии мистиксина более выражено по сравнению с АМРА процессами (рис. 1). При аппликации мистиксина в наименьшей концентрации (10 мг/мл) амплитуда NMDA ВПСР была угнетена на 55 %, это снижение было достоверным по сравнению с контролем ( $U = 11, n = 10$  — контроль;  $n = 17$  — мис-



**Рис. 2.** Тест на обратимость действия мистиксина на амплитуды отдельных компонентов фокальных потенциалов (ФП) при отмывании. На графике приведены данные действия мистиксина в концентрациях, при которых проявлялось максимальное угнетение отдельных компонентов фокальных потенциалов.

По оси ординат — амплитуда отдельных компонентов ФП в % к контролю (пунктирная линия). Отличия достоверны от контрольных значений при \* —  $p \leq 0,05$  (U-критерий, Вилкоксона-Манна-Уитни).  $n = 11$  — контроль,  $n = 15$  — мистиксин.

тиксин,  $p \leq 0,05$ ). Ингибирование активности NMDA-зависимых механизмов при более высоких концентрациях мистиксина было значительным и в среднем составляло 94 % по сравнению с контролем (рис. 1).

Тормозные ГАМК<sub>B</sub>-ергические механизмы угнетались в среднем на 85 % ( $U = 9, n = 8$  — контроль;  $n = 17$  — мистиксин,  $p \leq 0,05$ ) только при тестировании мистиксина в концентрации 10 мг/мл. При возрастании концентрации мистиксина в перфузионной среде до 25 и 50 мг/мл ингибирование амплитуды TPSPM уменьшалось в среднем на 33 % ( $U = 9, n = 10$  — контроль;  $n = 17$  — мистиксин,  $p \leq 0,05$ ). При действии пептида в более высоких концентрациях — 100 и 250 мг/мл амплитуда TPSPM достоверно не отличалась от контрольных значений (рис. 1).

Принимая во внимание, что при различных концентрациях мистиксина отдельные компоненты ФП ингибировались неодинаковым образом был проведен тест на обратимость действия пептида. Для анализа теста были выбраны такие концентрации, при которых проявлялось наибольшее угнетение отдельных компонентов ФП (рис. 2). Значительное ингибирование амплитуд ПД ЛОТ, АМРА ВПСР и NMDA ВПСР было выявлено при воздействии на срезы мистиксина в концентрации 250 мг/мл, тогда как для TPSPM максимальное угнетение проявилось при 10 мг/мл пептида.

Действие мистиксина оказалось обратимым для всех компонентов ФП, кроме NMDA ВПСР (рис. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что мистиксин связывается с такими механизмами электрогенеза как процессы проведения возбуждения по волокнам ЛОТ, АМРА-связанные процессы, тормозные ГАМК<sub>B</sub>-ергические процессы кратковременным образом и только в

присутствии пептида в инкубационной среде. В отношении NMDA-зависимых механизмов следует подчеркнуть более стойкую, длительную связь этого пептида с ними, поскольку при отмывании исходная активность NMDA-связанных процессов полностью не восстанавливалась до контрольного уровня (рис. 2).

Таким образом, полученные данные демонстрируют, что гектапептид мистиксин проявляет выраженные нейротропные эффекты. Спектр его действия достаточно широкий. Главными мишенями действия мистиксина являются возбуждающие глутаматергические ионотропные и тормозные ГАМК<sub>B</sub>-ергические постсинаптические процессы. Мистиксин дозо-зависимо угнетал активность AMPA- и NMDA-рецептор-связанных процессов. Депрессия активности тормозных процессов проявлялась лишь при малых концентрациях мистиксина (10, 25, 50 мг/мл). Мистиксин в более высоких концентрациях (100, 250 мг/мл) не индуцировал угнетения активности тормозных процессов, напротив, усиливал их амплитуду. Можно полагать, что он действовал как агонист тормозных рецепторов. Этот пептид не оказывал значительного влияния на процессы распространения возбуждения по волокнам ЛОТ.

Действие мистиксина было обратимым, нестойким, что проявилось при отмывании для ПД ЛОТ, AMPA ВПСР и ТПСР. Однако с NMDA-связанными механизмами мистиксин образовывал более прочную связь, что может указывать на возможность протекторного потенциала пептида при действии цитотоксических факторов на клетки мозга.

Эти данные свидетельствуют о том, что мистиксин действует на многие нейрофизиологические мишени в срезах обонятельной коры. Очевидно, при введении мистиксина *in vivo* можно ожидать множественные эффекты. Действительно, внутривенные инъекции мистиксина вызвали гипотензивный эффект [3], что можно объяснить доминированием тормозных влияний мистиксина, обнаруженных нами на срезах мозга. Кроме того, пептид препятствовал инфузии плазмы крови из кровеносных сосудов [3], ингибировал развитие воспалительных процессов [7] и способствовал сохранению интегрированности ткани после механической травмы [4]. Такие факты подтверждают наше предположение о протекторном потенциале мистиксина.

В этом отношении следует отметить, что мистиксин оказывал действие на ионотропные AMPA- и

NMDA-глутаматергические механизмы. Наиболее сильное воздействие мистиксина проявилось на NMDA-зависимые процессы. Эти эффекты выразились в прогрессивном снижении активности этих процессов при возрастании концентрации пептида в инкубационной среде. Известно, что NMDA-рецепторы участвуют не только в физиологических процессах, но и, что особенно важно, вовлекаются в различные патологические состояния, такие как аноксия, инсульт, эпилепсия, процессы клеточной гибели [1]. Гиперактивация этих рецепторов индуцирует развитие патологических процессов в нейронах. Установлено, что обратимая блокада этих рецепторов, вызываемых различными веществами, инициирует нейропротекторный эффект от негативного действия цитотоксических факторов. Поскольку мистиксин ингибировал активность NMDA-зависимых механизмов, то можно полагать, что он может защищать нервные клетки при развитии нейропатологических состояний.

## ВЫВОДЫ

1. Гектапептид мистиксин дозо-зависимо угнетает активность AMPA- и NMDA-рецептор-зависимых процессов.
2. Мистиксин ингибирует активность тормозных процессов в малых дозах (10, 25, 50 мг/мл), а в более высоких дозах (100, 250 мг/мл) усиливает их активность.
3. Эффекты мистиксина обратимы и после отмывания активность возбуждающих (кроме NMDA-связанных) и тормозных механизмов восстанавливаются.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Мокрушин, Л. И. Павлинова, А. Ю. Плеханов, *Бюл. экпер. биол.*, **140** (7), 4 – 8 (2005).
2. А. Х. Хама-Мурад, А. А. Мокрушин, *ДАН РАН*, **418**(6), 842 – 846 (2008).
3. P. Baluk, N. W. Fine, H. A. Thomas, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284**(2), 693 – 699 (1998).
4. E. A. Gjerde, K. Woie, E. T. Wei, et al., *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **279**(3), H1377 – H1382 (2000).
5. J. G. Kiang, *Eur. J. Pharmacol.*, **291**(2), 107 – 113 (1995).
6. S. Stair, K. W. Carlson, S. Shuster, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **450**(3), 291 – 296 (2002).
7. H. A. Thomas, N. Ling, E. Wei, *Ann NY Acad Sci.*, **697**, 219 – 229 (1993).

Поступила 19.04.11

## NEUROTROPIC EFFECTS OF HEPTAPEPTIDE MYSTIXIN STUDIED ON BRAIN TISSUE SECTIONS

A. A. Mokrushin

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034, Russia;  
e-mail: mok@inbox.ru

Neurotropic effects of heptapeptide mystixin have been studied on olfactory cortex neurons in rat brain tissue sections. The application of mystixin onto brain section produced a dose-dependent inhibition of AMPA- and NMDA-receptor-dependent processes. The peptide suppressed the activity of inhibitory processes only at small doses (10, 25, and 50 mg/ml) and potentiated these processes at greater doses (100 and 250 mg/ml). These effects of mystixin are reversible: after washing, the activities of both exciting (except for NMDA-related) and inhibitory mechanisms were restored.

**Key words:** Heptapeptide mystixin, brain tissue sections, focal potentials