

В.Ю. Маслов, М.С. Веселовський, А.О. Москалюк, М.Ф. М'ясоєдов, С.І. Шрам, С.А. Федулова

## Протекторна дія пептиду пролін-гліцин-пролін на електрофізіологічні властивості культивованих нейронів гіпокампа при ексайтотоксичному пошкодженні

*Досліджено вплив культивування з пептидом пролін-гліцин-пролін (PGP) на електрофізіологічні характеристики нейронів гіпокампа щура в моделі ексайтотоксичного пошкодження, викликаного аплікацією глутамату (100 мкмоль/л, 5 хв). Було встановлено, що нейрони, які культивувались за наявності 10 мкмоль/л пептиду PGP, при ексайтотоксичному пошкодженні зазнавали менших негативних змін у порівнянні з контрольними клітинами. Культивування з пептидом достовірно впливало на зміну наступних параметрів: потенціал спокою ( $-55 \pm 4$  мВ у контролі;  $-29 \pm 6$  мВ після аплікації глутамату;  $-38 \pm 5$  мВ після аплікації глутамату при культивуванні з пептидом), амплітуда ( $91 \pm 4$ ;  $65 \pm 5$ ;  $84 \pm 5$  мВ), тривалість ( $4,3 \pm 0,4$ ;  $9,5 \pm 1,6$ ;  $5,2 \pm 0,7$  мс), швидкості деполяризації ( $56$  [38, 84];  $27$  [21, 35];  $46$  [28, 62] мВ/мс) та реполяризації ( $-29$  [-38, -27];  $-20$  [-21, -18];  $-29$  [-33, -22] мВ/мс) потенціалу дії. Отримані результати свідчать, що нейропротекторні властивості пептиду PGP проявляються на рівні основних електрофізіологічних властивостей нейрона, відповідні клітинні механізми потребують подальших досліджень.*

*Ключові слова: гіпокамп, культура нейронів, ексайтотоксичне пошкодження, нейропротекторна дія, пептид пролін-гліцин-пролін.*

### ВСТУП

До речовин, що мають нейротрофічний, нейромодуляторний та нейропротекторний ефекти, належать синтетичний аналог фрагмента адренокортикотропного гормону (АКТГ) АКТГ(4-10) з амінокислотою послідовністю Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (пептид семакс), синтезований в Інституті молекулярної генетики РАН та продукти його протеолізу, зокрема пептид пролін-гліцин-пролін (PGP). Було показано, що останній, який в нормі наявний у крові як продукт деградації колагену та колагенподібних білків, має протидіабетичну, противиразкову, антикоагулянтну, антистресорну та протиішемічну дію, стимулює експресію генів нейротрофінів та їх рецепторів у нейронах, а також впливає на поведінкові

показники [1–4]. Окремий інтерес викликає нейропротекторна дія PGP за умов глутаматної ексайтотоксичності. Глутамінова кислота є основним збуджуючим нейротрансмітером у центральній нервовій системі, проте при гострих порушеннях мозкового кровообігу її концентрація в міжклітинному просторі може сягати 1 ммоль/л і викликати пошкодження та загибель нервових клітин [5]. Раніше було встановлено, що при інкубації з PGP на 30 % збільшувалася виживаність культивованих нейронів гіпокампа після ексайтотоксичного впливу [6], однак при цьому зміни електрофізіологічних параметрів нейронів не досліджували. У нашій роботі було проаналізовано вплив довготривалого культивування з пептидом PGP на здатність

© В.Ю. Маслов, М.С. Веселовський, А.О. Москалюк, М.Ф. М'ясоєдов, С.І. Шрам, С.А. Федулова

нейронів гіпокампа щура підтримувати сталі електрофізіологічні властивості соматичної мембрани при ексайтотоксичному пошкодженні.

## МЕТОДИКА

*Культивування нейронів гіпокампа.* Методика культивування нейронів гіпокампа не відрізнялася від описаної раніше [7]. Новонароджених щурів лінії Вістар декапітували, гіпокамп виділяли та оброблювали протягом 10 хв 0,025%-м розчином трипсину при 34°C. Після механічної дисоціації з використанням пастерівських піпеток з різним діаметром отвору клітини висівали на покриті полі-L-орнітином/ламініном чашки Петрі з щільністю близько 30 тис. од/см<sup>2</sup>. Клітини культивували у середовищі такого складу: мінімальне середовище Ігла, 10%-ї кінської сироватки, 2,3 г/л NaHCO<sub>3</sub>, 6 мг/мл інсуліну, 100 од/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину. Для пригнічення проліферації гліальних клітин на 3-тю добу культивування до культурального середовища на 24 год додавали цитозин-А-D-арабіно-фуранозид у концентрації 5 мкмоль/л. Пептид PGP в концентрації 10 мкмоль/л додавали до середовища через годину після висівання та після відмивки клітин від цитозин-А-D-арабіно-фуранозиду. Електрофізіологічні дослідження проводили на 7–10-ту добу культивування.

*Електрофізіологія.* У роботі використовували фізіологічний розчин такого складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 3, CaCl<sub>2</sub> – 2, MgCl<sub>2</sub> – 2, Hepes – 10, глюкоза – 12; рН 7,4 (доведено NaOH). Досліди проводили при кімнатній температурі (22°C). Реєстрацію мембранних потенціалів у конфігурації “ціла клітина” здійснювали з використанням внутрішньоклітинного розчину такого складу (ммоль/л): глюконат калію – 100, KCl – 50, MgCl<sub>2</sub> – 5, EGTA – 10, Hepes – 20; рН 7,4 (доведено KOH). Опір електродів-піпеток становив від 4,5 до 5,5 МОм. Реєстрацію викликаних ПД проводили при мембранно-

му потенціалі -70 мВ, для підтримування якого через нейрон пропускали відповідний постійний гіперполяризувальний струм. Нейрони активували послідовними прямокутними деполяризувальними імпульсами струму тривалістю 500 мс з інкрементом амплітуди 5-10 пА. Після такого контрольного тестування їх піддавали ексайтотоксичному пошкодженню [8]: експериментальну камеру протягом 5 хв перфузували фізіологічним розчином з доданою до нього L-натрієвою сіллю глутамінової кислоти (Glu) у концентрації 100 мкмоль/л. При цьому реєстрували зміни мембранного потенціалу в окремому нейроні, а після відмивання проводили електрофізіологічну реєстрацію від інших клітин, що зазнали ексайтотоксичного впливу. Електрофізіологічні характеристики нейронів визначали у часовому проміжку 20–60 хв після аплікації Glu, при цьому помітного тренду у значеннях досліджуваних параметрів виявлено не було.

Для нейронів, які культивували у звичайному середовищі та за наявності PGP у концентрації 10 мкмоль/л, до та після аплікації Glu визначали потенціал спокою, опір мембрани, частоту тонічної імпульсації (за її наявності) та параметри окремого потенціалу дії (ПД): поріг, амплітуду, тривалість (ширина на половині висоти), максимальні швидкість деполяризації та реполяризації, амплітуду слідової гіперполяризації (відносно порогу). Параметри окремого ПД визначали при стимулі мінімальної амплітуди, прикладання якого викликало генерацію ПД.

Аналіз та статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного пакета Clampfit 9.0. Для перевірки статистичних гіпотез (P<0,05) використовували дисперсійний аналіз (для нормально розподілених вибірок) і непараметричний критерій Крускала–Волліса (при відмінності від нормального розподілення). Перевірку гіпотези про належність вибірок до нормально розподіленої генеральної сукупності проводили за тестом Шапіро–Вілка. Результати

представлено у вигляді: середнє  $\pm$  стандартна похибка середнього (при нормальному розподіленні) або у вигляді: вибіркові медіана, перша та третя квартилі (при відмінності від нормального розподілення).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На культивованих нейронах гіпокампа після утворення конфігурації “ціла клітина” у відповідь на прикладання деполяризуючих імпульсів струму спостерігали тонічну або фазну генерацію ПД (вставка на рис. 1, 2). Для контрольних і культивованих з PGP нейронів достовірно не відрізнялись значення потенціалу спокою, опору мембрани та наступні параметри окремого викликаного ПД: поріг, амплітуда, тривалість (ширина на половині висоти), та максимальна швидкість деполяризації/реполяризації. При цьому максимальні швидкості деполяризації та реполяризації мали асиметричне розподілення. Відповідні середні значення, стандартні похибки середнього, медіани та квартилі наведено у таблиці. Статистично достовірну різницю показників ПД у контролі та при культивуванні

з PGP спостерігали для амплітуди слідової гіперполяризації, відповідні середні значення становили  $22 \pm 2$  ( $n=14$ ) та  $27 \pm 2$  мВ ( $n=25$ ). У відповідь на деполяризацію тривалістю 500 мс тонічну генерацію ПД спостерігали у 9 з 16 контрольних нейронів (56 %) з середньою частотою імпульсації  $21 \pm 3$  с<sup>-1</sup>, тоді як при культивуванні з пептидом – у 22 з 24 (92 %) при середній частоті  $17 \pm 4$  с<sup>-1</sup>. Відмінності у амплітуді слідової гіперполяризації та характері імпульсації нейронів визначаються потенціалзалежними калієвими провідностями мембрани, вплив пептиду на які може бути опосередковано його описаною раніше стимулювальною дією на експресію генів нейротрофінів (і відповідних рецепторів) [3, 4], які в свою чергу активують широкий спектр клітинних процесів [9], а також безпосередньо впливають на калієві канали та, відповідно, збудливість і характер імпульсації нейрона [10].

На рис. 1 представлено реєстрацію змін мембранного потенціалу нейрона при аплікації Glu (100 мкмоль/л, 5 хв), яка призводила до високочастотної генерації ПД, що тривала кілька секунд, після чого розвивалася стійка

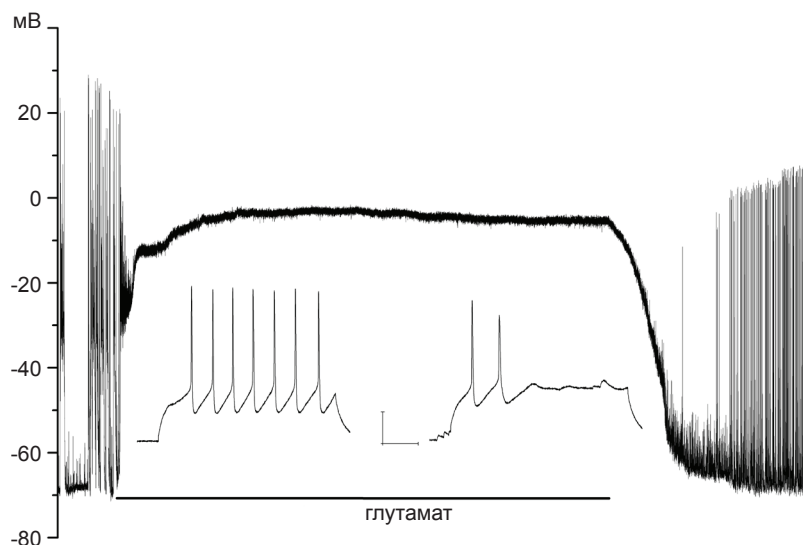


Рис. 1. Вплив аплікації глутамату на зміни мембранного потенціалу та викликані відповіді культивованого нейрона гіпокампа. Представлено реєстрацію мембранного потенціалу в конфігурації “ціла клітина” культивованого нейрона гіпокампа при аплікації глутамату в концентрації 100 мкмоль/л тривалістю 5 хв (суцільна лінія). Всь ординат: мембранний потенціал. На вставці – відповіді нейрона на деполяризуючий імпульс струму (30 пА, 500 мс) до (ліворуч) та після аплікації глутамату (праворуч). Калібрування на вставці: 20 мВ, 20 мс

деполяризація нейрона при мембранному потенціалі, значення якого було в межах від  $-40$  до  $3$  мВ. При цьому достовірної різниці середніх значень потенціалу при стійкій деполяризації у контролі та для нейронів, що культивували з PGP, не спостерігали: відповідні значення становили  $-16 \pm 6$  ( $n=7$ ) та  $-14 \pm 6$  мВ ( $n=10$ ). Це свідчить про те, що при такій постановці дослідів практично виключається протекторний вплив пептиду за рахунок теоретично можливого, хоча і прямо не підтвердженого, безпосереднього зв'язування PGP з глутаматним рецептором [11]. Таким чином, описані далі нейропротекторні ефекти пов'язані, вірогідно, з клітинними механізмами, що опосередковано впливають на електрофізіологічні характеристики нейронів. При відмиванні Glu потенціал спокою частково відновлювався, в окремих нейронах також спостерігали відновлення спонтанної активності (реєстрація з таким відновленням представлена на рис. 1).

Після аплікації Glu відведення в конфігурації "ціла клітина" від частини нейронів було неможливим – незважаючи на утворення гігаомного контакту, одразу після прориву мембрани значення гіперполяризувального струму, необхідного для підтримання потенціалу  $-70$  мВ, була понад  $1$  нА, а потенціал спокою був близьким до нуля. Частка таких контрольних клітин становила приблизно половину від загальної кількості, а при культивуванні з пептидом – третини, що узгоджується з даними Сторожевих та співавт. [6] про вплив PGP на виживаність культивованих нейронів гіпокампа при ексайтотоксичному пошкодженні. Такі пошкоджені нейрони при визначенні середніх значень електрофізіологічних показників не враховувалися (наприклад, використовуючи відповідні вагові коефіцієнти), що, очевидно, не може послабити висновки щодо протекторної дії пептиду. При триваліших ( $10$ – $15$  хв) аплікаціях Glu електрофізіологічне відведення у

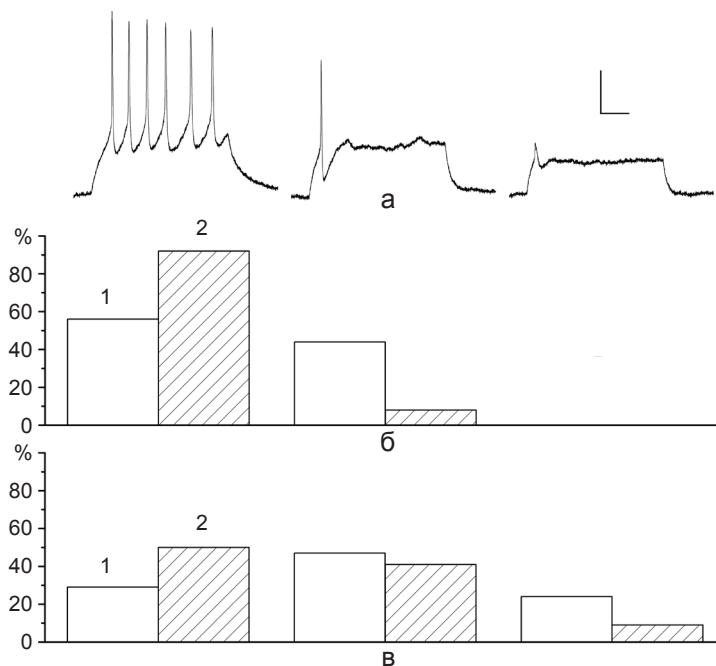


Рис. 2. Викликані деполяризацією потенціали дії нейронів гіпокампа: а – реєстрації різних типів викликаних відповідей (тонічна, фазна, відсутність потенціалу дії) на деполяризувальний імпульс струму трьох різних нейронів гіпокампа. Калібрування:  $20$  мВ,  $100$  мс. На діаграмах представлено значення часток нейронів у контролі (1) та нейронів, що культивувалися з пептидом пролін-гліцин-пролін (2), з відповідним типом викликаної відповіді до (б) та після (в) аплікації глутамату

конфігурації “ціла клітина” виявилось практично неможливим. Це суттєво ускладнює порівняння отриманих в нашій роботі результатів з літературними даними, адже переважна більшість досліджень клітинних механізмів ексайтотоксичності біохімічними та молекулярно-біологічними методами виконана при значно триваліших аплікаціях Glu (десятки хвилин, години, а в окремих роботах застосовувалась інкубація протягом кількох діб) [5].

Після аплікації Glu нейрони, потенціал спокою яких становив кілька десятків мілівольт, та для яких гіперполяризувальний струм, необхідний для підтримування потенціалу  $-70$  мВ, становив сотні пікоампер, у відповідь на деполяризувальний імпульс струму могли відповідати тонічною або фазною генерацією, у деяких нейронів (4 в контролі та 2 при культивуванні з пептидом) ПД був практично відсутній (див. рис. 2). Тонічну генерацію ПД спостерігали у 5 з 17 контрольних нейронів (29 %) з середньою частотою імпульсації  $16 \pm 2$  с<sup>-1</sup>, тоді як при культивуванні з пептидом – у 11 з 22 (50 %) при середній частоті  $18 \pm 2$  с<sup>-1</sup>. Розподіл нейронів з різним типом відповідей на деполяризацію до та після аплікації Glu представлено на рис. 2.

Середнє значення потенціалу спокою нейронів, що зазнали ексайтотоксичного пош-

кодження, становило  $-29 \pm 6$  мВ (n=18) у контролі та  $-38 \pm 5$  мВ (n=27) для нейронів, що культивувалися з PGP (різниця середніх статистично достовірна). В контролі та при культивуванні з пептидом після аплікації Glu достовірно відрізнялися наступні середні значення показників окремого викликаного ПД: амплітуда  $65 \pm 5$  та  $84 \pm 5$  мВ; тривалість  $9,5 \pm 1,6$  та  $5,2 \pm 0,7$  мс відповідно. Після аплікації Glu значення вибіркової медіани та квартилей для максимальних швидкостей деполяризації та реполяризації контрольних нейронів були 27, [21, 35] мВ/мс та  $-20$ ,  $[-21, -18]$  мВ/мс, а для нейронів, що культивувались з пептидом – 46, [28, 62] мВ/мс та  $-29$ ,  $[-33, -22]$  мВ/мс відповідно. Середні значення опору мембрани, порога ПД та амплітуди слідової гіперполяризації достовірно не змінювалися. Відповідні середні значення, стандартні похибки середнього, медіани та квартилі наведено у таблиці.

Реєстрації окремих викликаних ПД та середні значення їх параметрів показано на рис. 3. Для зручності представлення результатів на діаграмі наведено середнє значення та похибка тривалості ПД, помножені на 10; для швидкостей деполяризації та реполяризації наведено середні значення та похибки середнього, які були розраховані формально

**Електрофізіологічні характеристики культивованих нейронів гіпокампа**

| Параметр потенціалу дії        | Контроль (n=14) | Контроль і глутамат (n=13) | Культивування з пептидом (n=25) | Культивування з пептидом і глутамат (n=25) |
|--------------------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------------|--|
| Потенціал спокою, мВ           | $-55 \pm 4$     | $-29 \pm 6$ *              | $-56 \pm 4$                     | $-38 \pm 5$ **                             |
| Опір мембрани, ГОм             | $0,55 \pm 0,04$ | $0,48 \pm 0,11$ *          | $0,57 \pm 0,04$                 | $0,49 \pm 0,07$                            |
| Поріг, мВ                      | $-29 \pm 1$     | $-28 \pm 1$                | $-30 \pm 1$                     | $-30 \pm 1$                                |
| Амплітуда, мВ                  | $91 \pm 4$      | $65 \pm 5$ *               | $95 \pm 3$                      | $84 \pm 5$ **                              |
| Тривалість, мс                 | $4,3 \pm 0,4$   | $9,5 \pm 1,6$ *            | $3,9 \pm 0,3$                   | $5,2 \pm 0,7$ **                           |
| Швидкість деполяризації, мВ/мс | 56 (38; 84)     | 27 (21, 35) *              | 59 (42; 81)                     | 46 (28, 62) **                             |
| Швидкість реполяризації, мВ/мс | -29 (-38; -27)  | -20 (-21, -18) *           | -33 (-41; -32)                  | -29 (-33, -22) **                          |
| Амплітуда гіперполяризації, мВ | $22 \pm 2$      | $23 \pm 2$                 | $27 \pm 2$                      | $22 \pm 2$                                 |

\* статистично достовірна (P<0,05) різниця у порівнянні з контрольними значеннями (вплив ексайтотоксичного пошкодження). \*\* статистично достовірна (P<0,05) різниця у порівнянні зі значеннями після аплікації глутамату (вплив культивування з пептидом).



та не використовувалися для перевірки статистичних гіпотез.

Зміни показників ПД при ексайтотоксичному пошкодженні та стабілізувальний вплив на них культивування з пептидом можуть бути наочно зображені з використанням наступної діаграми розсіювання (рис. 4). Клітина, здатна до генерації ПД, представлена на діаграмі точкою (або двома – до та після аплікації Glu), абсциса якої відповідає максимальній швидкості деполяризації, а ордината – реполяризації. До аплікації ці параметри розподілені у достатньо широких межах (без достовірного впливу культивування з пептидом). Ділянка розсіювання для контрольних нейронів, що

знали ексайтотоксичного впливу, суттєво зменшується та зміщується в напрямку початку координат (див. рис. 4, а), а для нейронів, що культивувалися з пептидом – залишається подібною до такої у контролі (див. рис. 4, б), хоча відповідні значення медіан швидкостей деполяризації/реполяризації при розвитку ПД достовірно відрізняються (критерій Крускала-Волліса).

Було б логічним очікувати, що нейрони, від яких під час аплікації проводилося електрофізіологічне відведення у конфігурації “ціла клітина”, будуть за своїми параметрами відрізнятися від решти, адже кальцієвий буфер EGTA, який в концентрації 10 ммоль/л

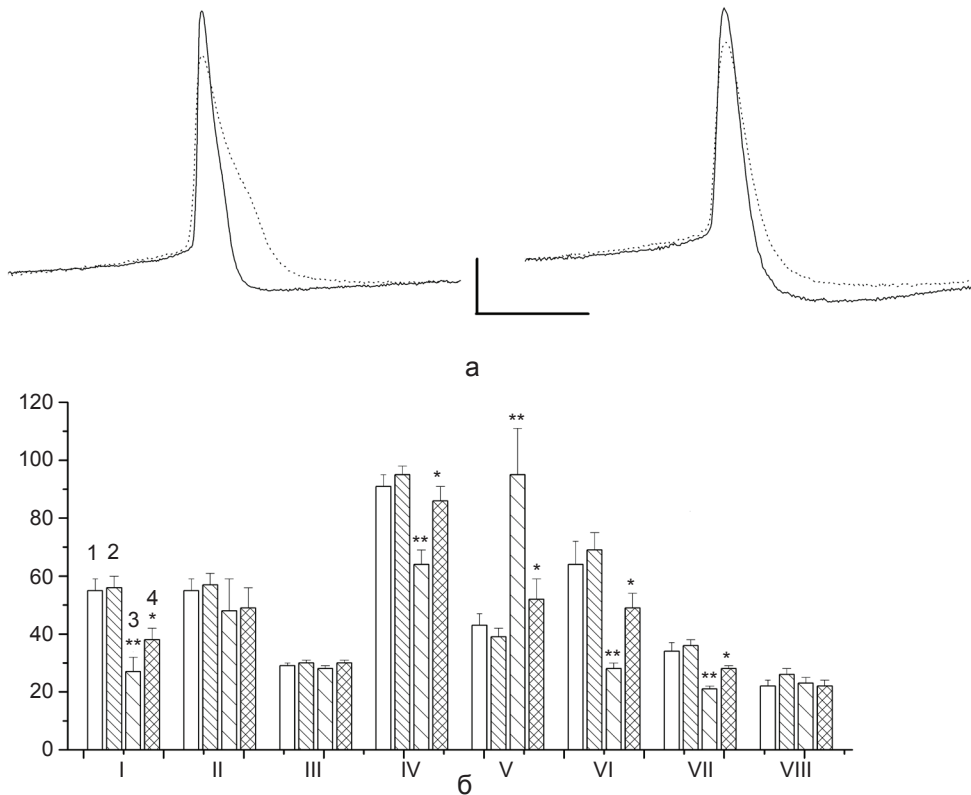


Рис. 3. Зміни форми окремого викликаного потенціалу дії нейронів гіпокампа під впливом аплікації глутамату: а – реєстрації викликаних потенціалів дії до (суцільна лінія) та після аплікації глутамату (пунктир) для контрольного нейрона (ліворуч) та нейрона, що культивувався з пептидом пролін-гліцин-пролін (праворуч), калібрування: 20 мВ, 10 мс, б – середні значення та стандартні похибки середнього досліджуваних електрофізіологічних характеристик: 1 – контроль, 2 – пептид, 3 – контроль і глутамат, 4 – пептид і глутамат; I – потенціал спокою, мВ, II – опір мембрани, ГОм, параметри потенціалу дії: III – поріг, мВ, IV – амплітуда, мВ, V – тривалість, мс, VI – швидкість деполяризації, мВ/мс, VII – швидкість реполяризації, мВ/мс, VIII – амплітуда гіперполяризації, мВ. \* $P < 0,05$  достовірна різниця у порівнянні з контролем (ефект ексайтотоксичного пошкодження); \*\* $P < 0,05$  достовірна різниця у порівнянні зі значеннями відповідних параметрів після аплікації глутамату (ефект культивування з пептидом)

був у внутрішньоклітинному розчині, міг виявляти певну протекторну дію. Проте таких відмінностей не було виявлено. Це може свідчити про те, що за таких умов основну роль у змінах характеристик нейронів відіграє збільшення вмісту внутрішньоклітинного натрію. Виявлена різниця показників ПД не може виникати внаслідок зменшення опору мембрани, яке у двох досліджених групах достовірно не змінювалось, а концентрація іонів натрію в нейроні під час відведення в конфігурації “ціла клітина” визначається складом внутрішньоклітинного розчину (виготовленим без додавання натрію). З літературних даних відомо, що після аплікації Glu тривалістю 5 хв протягом десятків хвилин спостерігається підвищення концентрації внутрішньоклітинного натрію до

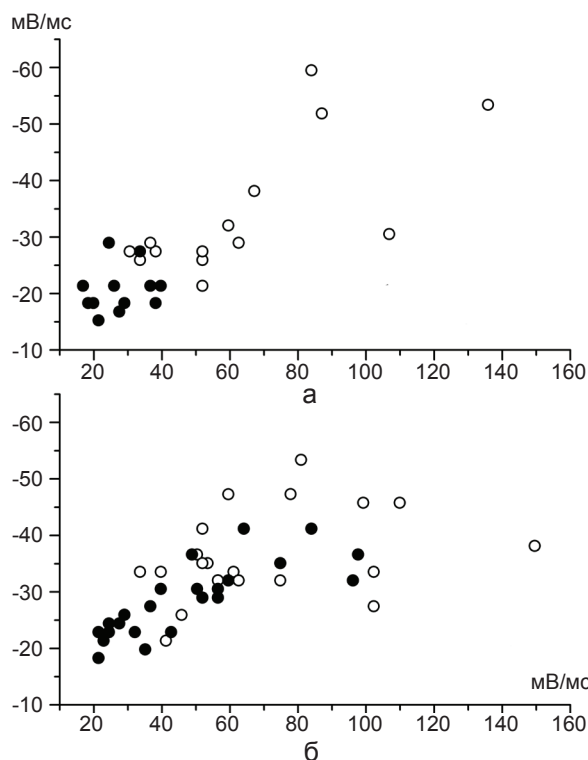


Рис. 4. Діаграми розсіювання значень максимальних швидкостей деполяризації та реполяризації потенціалів дії нейронів гіпокампа. Вісь абсцис – швидкість деполяризації, вісь ординат – швидкість реполяризації. Представлено результати до (○) та після (●) аплікації глутамату для контрольних нейронів (а) та нейронів, що культивувались з пептидом пролін-гліцин-пролін (б)

рівня близько 100 ммоль/л [12], що в свою чергу викликає зменшення кількості (інтерналізацію) потенціалзалежних натрієвих каналів на мембрані нейрона [13]. Тому є цілком вірогідним, що механізм протекторної дії пептиду пов'язаний з активацією АТФ-залежних процесів регуляції вмісту внутрішньоклітинного натрію. Зменшенням кількості функціональних натрієвих каналів можна пояснити і зміни розподілу нейронів за характером (тонічна/фазна) відповіді на деполяризацію. Для підтвердження цієї гіпотези потрібні дослідження змін окремих типів потенціалзалежних мембранних струмів при ексайтотоксичному пошкодженні.

З наших попередніх праць [7] і літературних даних [8] відомо, що інтенсивні синаптичні контакти між нейронами гіпокампа новонароджених щурів утворюються після 11-ї доби культивування. У цій роботі електрофізіологічне відведення від нейронів здійснювали на 7–10-ту добу культивування для запобігання впливу спонтанних постсинаптичних подій на показники викликаних ПД. Спонтанну активність спостерігали у 3 з 25 проаналізованих нейронів (12 %), при культивуванні у звичайному середовищі, а за наявності PGP – у 13 з 27 (48 %). Спонтанно активним після ексайтотоксичного пошкодження виявився один з 18 (6 %) контрольних нейронів та 7 з 27 (26 %) таких, що культивувались за наявності пептиду. Цей факт свідчить про певну активацію процесів синаптогенезу пептидом, що узгоджується з описаними в літературі властивостями гліпролінів і пептиду PGP зокрема [1–6] та потребує окремого дослідження. Також вірогідним може бути і певний кондиціонуючий вплив підвищеної спонтанної активності на збільшення стійкості нейронів до ексайтотоксичного пошкодження [14].

Отримані результати свідчать, що після аплікації Glu потенціал спокою, амплітуда, тривалість, максимальні швидкості деполяризації/реполяризації ПД нейронів гіпокампа щура, що культивувались за наявності

10 мкмоль/л пептиду PGP, зазнавали менших негативних змін у порівнянні з контрольними клітинами. Таким чином, нейропротекторні властивості пептиду PGP при ексайтотоксичному пошкодженні проявляється на рівні електрофізіологічних властивостей нейрона, відповідні клітинні механізми потребують подальших досліджень.

*Ця робота є частиною проекту спільних українсько-російських наукових досліджень НАН України та Російського фонду фундаментальних досліджень "З'ясування природи нейротропних ефектів пептидів групи гліпролінів у нормі та на моделях пошкодження нейронів" (№ реєстрації 0112U004111).*

**В.Ю. Маслов, Н.С. Веселовский,  
А.А. Москалюк, Н.Ф. Мясоедов, С.И Шрам,  
С.А. Федулова**

#### **ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА ПРОЛИН-ГЛИЦИН-ПРОЛИН НА ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ ГИПОКАМПА ПРИ ЭКСАЙТОТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ**

Исследовано влияние культивирования с пептидом пролин-глицин-пролин на электрофизиологические характеристики нейронов гиппокампа крысы в модели эксайтотоксического повреждения, вызванного аппликацией глутамата (100 мкмоль/л, 5 мин). Было установлено, что нейроны, которые культивировались в присутствии 10 мкмоль/л пептида пролин-глицин-пролин, при эксайтотоксическом повреждении подвергались меньшим негативным изменениям по сравнению с контрольными клетками. Культивирование с пептидом достоверно влияло на изменение следующих параметров: потенциал покоя ( $-55 \pm 4$  мВ в контроле;  $-29 \pm 6$  мВ после аппликации глутамата;  $-38 \pm 5$  мВ после аппликации глутамата при культивировании с пептидом), амплитуда ( $91 \pm 4$ ;  $65 \pm 5$ ;  $84 \pm 5$  мВ), длительность ( $4,3 \pm 0,4$ ;  $9,5 \pm 1,6$ ;  $5,2 \pm 0,7$  мс), скорости деполяризации ( $56$  [38, 84];  $27$  [21, 35];  $46$  [28, 62] мВ/мс) и реполяризации ( $-29$  [-38, -27];  $-20$  [-21, -18];  $-29$  [-33, -22] мВ/мс) потенциала действия. Полученные данные свидетельствуют, что нейропротекторные свойства пептида PGP проявляются на уровне основных электрофизиологических свойств нейрона, соответствующие клеточные механизмы требуют дальнейших исследований. Ключевые слова: гиппокамп, культура нейронов, эксайтотоксическое повреждение, нейропротекторное действие, пептид пролин-глицин-пролин.

**V.Yu. Maslov, N.S. Veselovsky, A.A. Moskalyuk,  
N.F. Myasoedov, S.I. Shram, S.A. Fedulova**

#### **PRETECTIVE ACTION OF PEPTIDE PROGLY-PRO ON ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONES DURING EXCITOTOXIC DAMAGE**

Electrophysiological characteristics of hippocampal neurones cultured with Pro-Gly-Pro peptide were studied using glutamate excitotoxicity model (excitotoxic damage was induced by 100 μM glutamate application during 5 min). It was found that negative changes in neurones cultured with 10 μM Pro-Gly-Pro were less prominent if compared with control ones. Culturing with the peptide significantly affected the following parameters: resting potential ( $-55 \pm 4$  mV in control;  $-29 \pm 6$  mV after glutamate application;  $-38 \pm 5$  mV cultured after glutamate application), action potential amplitude ( $91 \pm 4$ ;  $65 \pm 5$ ;  $84 \pm 5$  mV), duration ( $4,3 \pm 0,4$ ;  $9,5 \pm 1,6$ ;  $5,2 \pm 0,7$  ms), depolarization ( $56$  [38, 84];  $27$  [21, 35];  $46$  [28, 62] mV/ms) and repolarization ( $-29$  [-38, -27];  $-20$  [-21, -18];  $-29$  [-33, -22] mV/ms) rates. The data obtained suggest that PGP exhibit its neuroprotective properties on a level of basic electrophysiological characteristics, appropriate cellular mechanisms require further investigations. Key words: hippocampus, neurones culturing, excitotoxicity, neuroprotective action, Pro-Gly-Pro peptide.

*Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv;  
Institute of Molecular genetics, RAS, Moscow, Russia*

#### **REFERENCES**

1. Kopylova GN, Badmaeva SE, Levitskaya NG, Samonina GE, Umarova BA, Guseva AA. Effect of peptide Pro-Gly-Pro on stress-induced behavioral changes in rats. *Bull Exp Biol Med.* 2004; **138**(1):5-7.
2. Martynova KV, Andreeva LA, Klimova PA, Kirillova IuG, Shevchenko VP, Nagaev Iu, Shram Iu, Shvets VI, Miasoedov NF. Structural-functional study of glycine- and proline-containing peptides (glyprolines) as potential neuroprotectors. *Bioorg. Khim.* 2009; **35**(2):165-171.
3. Stavchanskii VV, Tvorogova TV, Botsina AIu, Skvortsova VI, Limborskaia SA, Miasoedov NF, Dergunova LV. The effect of semax and its C-end peptide PGP on expression of the neurotrophins and their receptors in the rat brain during incomplete global ischemia. *Mol. Biol (Mosk)* 2011; **45**(6):1026-1035.
4. Dmitrieva V.G., Povarova O.V., Skvortsova V.I., Limborska S.A., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. Semax and Pro-Gly-Pro activate the transcription of neurotrophins and their receptor genes after cerebral ischemia. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2010; **30**(1):71-79.
5. Khodorov B.I. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurons. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*



- 2004; **86**:279-351.
6. Storozhevykh TP, Tukhbatova GR, Senilova YE, Pinelis VG, Andreeva LA, Myasoyedov NF. Effects of semax and its Pro-Gly-Pro fragment on calcium homeostasis of neurons and their survival under conditions of glutamate toxicity. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007; **143**(5):601-604.
  7. Fedulova S.A., Vasilyev D.V., Isaeva E.V., Romanyuk S.G., Veselovsky N.S. Possibility of multiquantal transmission at single inhibitory synapse in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci* 1999; **92**(4):1217-1230.
  8. Norris C.M., Blalock E.M., Thibault O., Brewer L.D., Clodfelter G.V., Porter N.M., Landfield P.W. Electrophysiological mechanisms of delayed excitotoxicity: positive feedback loop between NMDA receptor current and depolarization-mediated glutamate release. *J. Neurophysiol.* 2006; **96**(5):2488-2500.
  9. Guo L., Yeh M.L., Cuzon Carlson V.C., Johnson-Venkatesh E.M., Yeh H.H. Nerve growth factor in the hippocamposeptal system: evidence for activity-dependent anterograde delivery and modulation of synaptic activity. *J. Neurosci.* 2012; **32**(22):7701-7710.
  10. Jia Z., Bei J., Rodat-Despoix L., Liu B., Jia Q., Delmas P., Zhang H. J. NGF inhibits M/KCNQ currents and selectively alters neuronal excitability in subsets of sympathetic neurons depending on their M/KCNQ current background. *Gen. Physiol.* 2008; **131**(6):575-587.
  11. V'unova TV, Andreeva LA, Shevchenko KV, Shevchenko VP, Bobrov MY, Bezuglov VV, Myasoedov NF Binding of tripeptide Pro-Gly-Pro labeled at the C-terminal proline residue to plasma membranes of the rat forebrain. *Dokl Biol Sci* 2008; **419**:95-96.
  12. Kiedrowski L., Costa E. Glutamate-induced destabilization of intracellular calcium concentration homeostasis in cultured cerebellar granule cells: role of mitochondria in calcium buffering. *Mol. Pharmacol.* 1995; **47**(1):140-147.
  13. Dargent B, Couraud F. Down-regulation of voltage-dependent sodium channels initiated by sodium influx in developing neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1990; **87**(15):5907-5911.
  14. Marini A.M., Jiang X., Wu X., Pan H., Guo Z., Mattson M.P., Blondeau N., Novelli A., Lipsky R.H. Preconditioning and neurotrophins: a model for brain adaptation to seizures, ischemia and other stressful stimuli. *Amino Acids* 2007; **32**(3):299-304.

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;*

*Ин-т молекулярної генетики РАН, Москва, РФ*

*E-mail: masl@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов  
до редакції 07.10.2013*