

ТРИПЕПТИДЫ ВОССТАНАВЛИВАЮТ КОЛИЧЕСТВО ШИПИКОВ НЕЙРОНОВ В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА *IN VITRO*

Н.А.Красковская*, Е.О.Куканова**, Н.С.Линькова***, Е.А.Попугаева*, В.Х.Хавинсон**,**

*ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский государственный политехнический университет,
Санкт-Петербург, РФ;

**Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, РФ;

***Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург, РФ

В первичной культуре нейронов гиппокампа мышей в условиях амилоидной синаптотоксичности (модель болезни Альцгеймера) пептид EDR в концентрации 200 нг/мл повышал количество грибовидных шипиков нейронов (на 71%) до уровня нормы. Трипептид KED в концентрации 200 нг/мл повышал количество грибовидных шипиков в культуре нейронов гиппокампа в модели болезни Альцгеймера на 20%. Трипептид EDR может быть рекомендован для дальнейшего экспериментального изучения с целью создания нейропротективного средства для профилактики и лечения болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, трипептиды, дендритные шипики, бета-амилоид, культура нейронов гиппокампа

Болезнь Альцгеймера (БА) — одно из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний и наиболее часто встречающаяся форма деменции у людей пожилого возраста. В мире в 2006 г. было зарегистрировано 26.6 млн человек с БА, а к 2050 г. число таких пациентов может увеличиться в 4 раза [9], поэтому поиск эффективных и безопасных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний остается актуальной задачей современной геронтологии и молекулярной медицины.

Клиническое проявление БА — прогрессирующее расстройство памяти, связанное с поражением гиппокампа. С течением времени нейродегенеративные процессы распространяются на теменную долю лобной коры и поясной извилины. Большинство случаев возникновения БА имеет спорадический характер и выявляется у лиц старше 65 лет. Существует гипотеза, что в основе БА лежит нарушение экспрессии генов, кодирующих следующие белки: предшественник амилоида (amyloid precursor protein; APP), пресенилин-1 (PSEN1) и пресенилин-2 (PSEN2). APP подвергается расщеплению α -, β - и γ -секретазами. При расщеплении APP β - и γ -секретазами происходит формирование фрагмента A β длиной от 39 до 42 аминокислотных остатков [10]. Пре-

сенилины входят в состав протеазного комплекса γ -секретазы и являются ключевыми каталитическими субъединицами. При БА мутации в генах APP и PSEN1, PSEN2 способствуют формированию внеклеточного фрагмента A β длиной 42 аминокислотных остатка (A β 42), накопление которого способствует формированию амилоидных олигомеров [10].

Механизм токсичного действия A β 42 пока неизвестен, однако исследования последних лет указывают на синаптическую дисфункцию, индуцируемую амилоидными олигомерами. В связи с этим полагают, что потеря синаптических контактов между нейронами лежит в основе клеточных механизмов когнитивных нарушений и потери памяти [6]. На ранней стадии нейродегенеративного заболевания, в том числе и БА, характеризуются нарушением формирования синаптических контактов или потерей их стабильности, что выражается в уменьшении количества постсинаптических структур, называемых дендритными шипиками [7]. Дендритные шипики представляют собой специфические отростки на дендритном древе нейронов гиппокампа, которые выполняют важную роль в процессах формирования памяти и обучения. Шипики являются динамичными структурами, поэтому предполагают, что изменения в их морфологии отражают функциональные изменения в синапсе [8]. В частности, грибовидные шипики, которые являются стабильными постсинаптическими

Адрес для корреспонденции: miayu@yandex.ru. Линькова Н.С.



контактами и считаются шипиками “памяти”, наиболее подвержены элиминации при нейродегенеративных заболеваниях, в том числе при БА.

Новым перспективным подходом к лечению нейродегенеративных заболеваний может стать применение нейропротективных пептидов. Полипептидный препарат “Церебролизин” был эффективен у пациентов с легкой и средней формой БА [14], а в исследовании на трансгенных мышцах с БА этот полипептид приводил к уменьшению выраженности патологии синапсов [2]. Однако полипептидные лекарственные препараты могут обладать аллергизирующим действием.

В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии были сконструированы и синтезированы короткие пептиды EDR и KED, обладающие нейропротективными и вазопротективными свойствами [1,3-5]. Пептиды KED и EDR снижают апоптоз и повышают синтез серотонина в нейронах коры головного мозга при их старении. Сочетанное пероральное применение биологически активной добавки “Пинеалон” (действующее вещество — пептид EDR) и “Везуген” (действующее вещество — пептид KED) было эффективным у больных с черепно-мозговой травмой, церебрастенией, при снижении памяти и внимания у лиц пожилого возраста [1,2]. Кроме того, пептид EDR обладает выраженным антиоксидантным действием [9].

Цель данного исследования — изучить влияние пептидов EDR и KED на количество шипиков нейронов культуры гиппокампа мышей в модели БА.

Методика исследования

Исследования проводили на первичных диссоциированных культурах клеток гиппокампа мышей дикого типа линии C57Bl/6 (“Jackson Laboratory”). В работе использовали недавно разработанную физиологичную модель БА *in vitro*, позволяющую моделировать ранние стадии заболевания, воспроизводя синаптотоксичное действие амилоидных олигомеров в нейрональной культуре [11]. В качестве критерия оценки нейропротективного действия трипептидов KED и EDR в культуре нейронов при моделировании БА было выбрано восстановление количества грибовидных дендритных шипиков, которые характеризуют количество функционально активных синаптических контактов.

Культуры содержались в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в среде следующего состава: Neurobasal-A, 1% ЭТС, 0.5 мМ L-глутамин, 2% бессывороточная добавка B-27 (все компоненты “Gibco”). Для визуализации морфологии синаптических контактов культуру клеток трансфицировали плазмидой pCSGFP2:td-tomato (“Addgene”), кодирующей красный флуоресцентный белок, методом кальций-фосфатной трансфекции на 7-е сутки культивиро-

вания с помощью коммерческого набора (“Clontech Laboratories Inc.”). На 12-е сутки культивирования в культуру нейронов добавляли синтетические олигопептиды Aβ42 (“Ana Spec Inc.”) в конечной концентрации 0.1 мкМ. На 15-е сутки культивирования нейроны разделяли на группы: 1-я — контрольная (добавление среды для культивирования Neurobasal-A); 2-я — контрольная с добавлением Aβ42; группа 3А — добавление Aβ42 и пептида EDR (20 нг/мл), 3Б — добавление Aβ42 и пептида KED (200 нг/мл); группа 4А — добавление Aβ42 и пептида KED (20 нг/мл); 4Б — добавление Aβ42 и пептида KED (200 нг/мл). На 16-е сутки культивирования нейрональные культуры фиксировали в 4% растворе параформальдегида pH 7.2 и анализировали морфологию дендритного дерева нейронов гиппокампа на конфокальном микроскопе. Морфологию шипиков исследовали на конфокальном микроскопе (“Thorlabs”) путем получения серии срезов при 100-кратном увеличении на объективе (UPlan S Apo; “Olympus”). Анализировали по 7 трансфицированных нейронов для каждой изучаемой группы из 3 разных культур. Анализ морфологии дендритных шипиков проводили в программе “Neuron Studio software package” [12] по ранее описанной методике [13], позволяющей автоматически реконструировать трехмерное изображение шипиков и распределять их в 3 группы (грибовидные, тонкие, пеньковые) по заданным параметрам.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе “Microsoft Excel”. Данные представлены в виде среднего значения ± доверительный интервал. Статистическому анализу подвергали по 10 нейронов для каждой группы из 3 разных культур (т.е. всего по 30 нейронов в группе). Принадлежность выборок к нормальному распределению проверяли с помощью критерия Шапиро—Уилка. Все выборки в исследовании имели нормальное распределение. Достоверность попарных различий между группами определяли с помощью критерия Стьюдента. Критический уровень значимости нулевой гипотезы был равен 95% ($p < 0.05$).

Результаты исследования

В норме (1-я группа) в культуре гиппокампа доля грибовидных шипиков составляла 37.7%. При моделировании амилоидной синаптотоксичности (2-я группа 2, модель БА) количество грибовидных шипиков в культуре гиппокампа снижалось в 1.34 раза — до 24.9% (рис. 1, 2). Под действием пептида EDR в концентрации 20 нг/мл (группа 3А) количество грибовидных шипиков в культуре нейронов гиппокампа достоверно увеличивалось по сравнению со 2-й группой в 1.35 раза и составило



33.6%. Однако этого оказалось недостаточно для восстановления количества грибовидных шипиков до уровня нормы (1-я группа). При добавлении в культуральную среду пептида EDR в концентрации 200 нг/мл (группа 3Б) наблюдалось восстановление количества грибовидных шипиков до 42.6% (несколько больше, чем в 1-й группе). Таким образом, пептид EDR в концентрации 200 нг/мл повышал (в 1.71 раза) количество грибовидных шипиков нейронов в модели БА до уровня нормы.

При добавлении пептида KED в концентрации 20 нг/мл (группа 4А) количество грибовидных шипиков в культуре гиппокампа не изменялось по сравнению со 2-й группой (рис. 1). При этом в концентрации 200 нг/мл пептид KED (группа 4Б) повышал количество грибовидных шипиков в 1.2 раза

по сравнению со 2-й группой. Однако, несмотря на увеличение количества грибовидных шипиков при добавлении пептида KED в концентрации 200 нг/мл, количество шипиков не восстанавливалось до уровня нормы (1-я группа). Общая плотность дендритных шипиков — 4.1 ± 0.7 шипика на 10 мкм в 1-й контрольной группе, 3.7 ± 0.6 шипика на 10 мкм в группе с моделью БА (2-я группа). После добавления трипептидов наблюдалась тенденция к увеличению плотности шипиков.

Полученные данные подтверждают и дополняют результаты проведенных ранее исследований, показавших нейропротективную активность пептида EDR. В клиническом исследовании у 72 пациентов с последствиями черепно-мозговой травмы и церебрастенией применение биологически

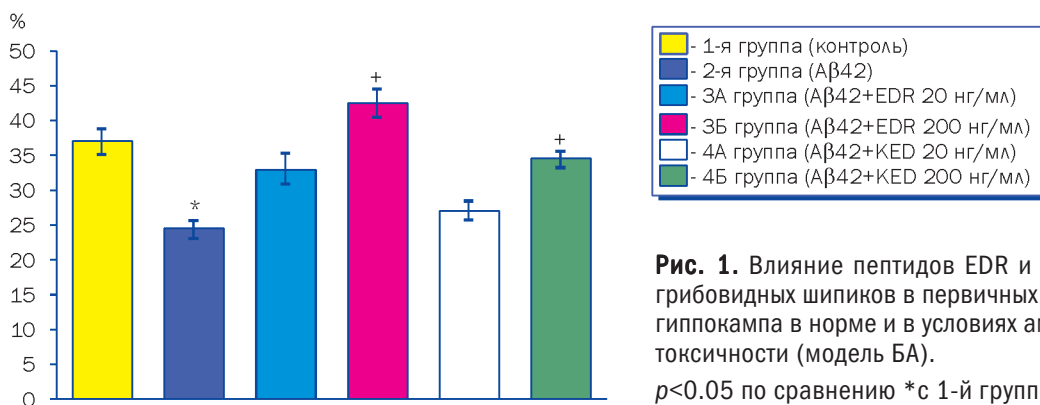


Рис. 1. Влияние пептидов EDR и KED на количество грибовидных шипиков в первичных культурах нейронов гиппокампа в норме и в условиях амилоидной синаптотоксичности (модель БА).

$p < 0.05$ по сравнению *с 1-й группой, +со 2-й группой.

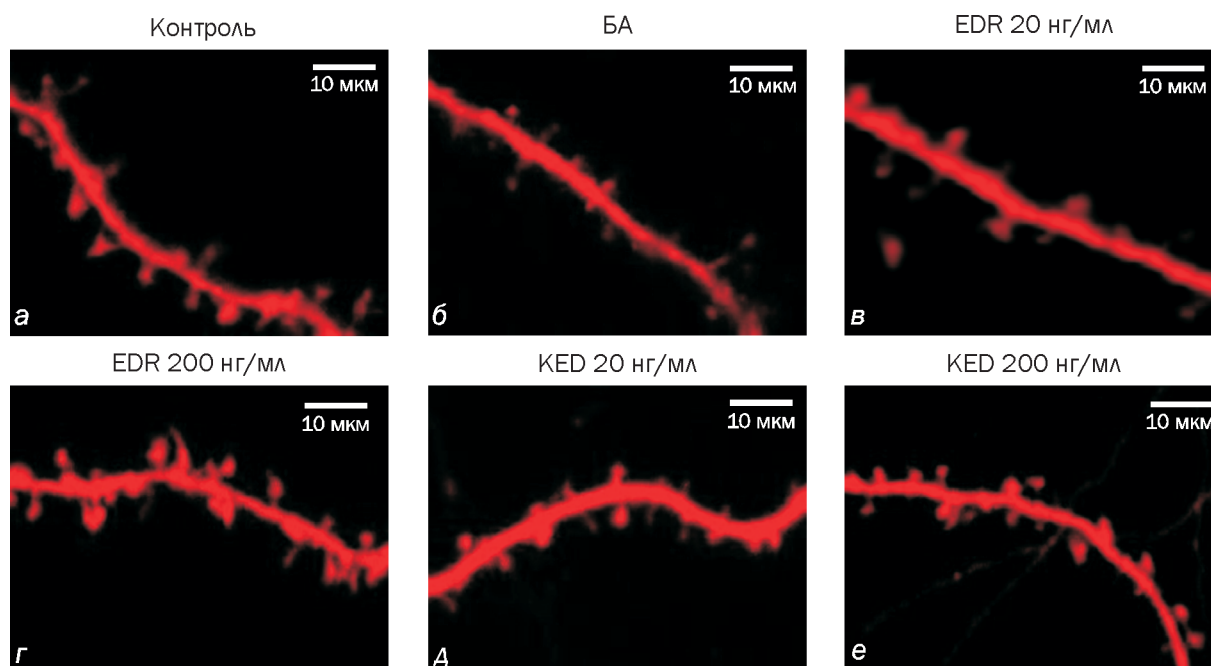


Рис. 2. Влияние пептидов EDR и KED на морфологию дендритных шипиков в первичной культуре клеток гиппокампа мышей в условиях амилоидной синаптотоксичности (модель БА). Конфокальная микроскопия, $\times 100$. Визуализация с помощью плазмиды TD_tomato, кодирующей красный флуоресцентный белок.



активной добавки “Пинеалон” на основе пептида EDR в дополнение к стандартной терапии приводило к улучшению памяти, снижению длительности и интенсивности головных болей, появлению эмоциональной уравновешенности, повышению работоспособности [2]. В модели экспериментальной пренатальной гипергомоцистеинемии у крыс пептид EDR нормализовал функциональную активность ЦНС [5]. В культурах гранулярных клеток мозжечка под действием пептида EDR увеличивался лаг-период активации MAP-киназы и снижался уровень АФК [5]. Выявленная в данной работе способность пептида EDR препятствовать потере грибовидных шипиков нейронов, наблюдающейся при БА, является еще одним важным нейропротективным эффектом данного пептида. Таким образом, пептид EDR может являться молекулой, способствующей предотвращению развития БА.

Как уже упоминалось, полипептидный лекарственный препарат “Церебролизин” применяется для лечения БА. Метаанализ эффективности церебролизина при лечении БА включал 6 рандомизированных, двойных слепых плацебоконтролируемых клинических исследований. Установлено, что церебролизин улучшал общее состояние пациентов с легкой и средней формой БА [14]. В исследовании на трансгенных мышах с БА (линия mThy1-hAPP751) внутрибрюшинное введение церебролизина приводило к уменьшению проявлений нейродегенерации — снижению содержания амилоида в мозге и выраженности патологии синапсов [2]. То есть при исследовании церебролизина, как и пептида EDR, было показано влияние на морфологию нейронов. Вполне возможно, что пептид EDR и церебролизин могут проявлять сходные эффекты при БА на уровне морфологии нейронов.

Таким образом, пептид EDR может быть рекомендован для дальнейшего экспериментального изучения на животных в моделях БА для создания средства профилактики и лечения начальных форм этой нейропатологии, не обладающего побочными эффектами полипептидного препарата “Церебролизин”.

Работа выполнена при поддержке РФ (грант № 14-25-00024), Министерства образования и науки РФ (государственное задание № 17.991.2017/ПЧ).

Литература

1. Башкирева А.С., Артамонова В.Г. Пептидергическая коррекция невротических состояний у водителей гру-

зового автотранспорта // Успехи геронтологии. 2012. Т. 25, № 4. С. 718-728.

2. Умнов П.С., Линькова Н.С., Хавинсон В.Х. Нейропротекторные эффекты пептидных биорегуляторов у людей разного возраста: обзор литературы // Успехи геронтологии. 2013. Т. 26, № 4. С. 671-678.
3. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Рыжак Г.А. Пептидные биорегуляторы — новый класс геропротекторов. Сообщение 2. Результаты клинических исследований // Успехи геронтологии. 2013. Т. 26, № 1. С. 20-37.
4. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Елашкина Е.В., Дурнова А.О., Козлов К.Л., Гутон Е.О. Молекулярные аспекты антиатеросклеротического действия коротких пептидов // Клет. технол. в биол. и мед. 2014. № 3. С. 185-189.
5. Arutjunyan A., Kozina L., Stvolinskiy S., Bulygina Y., Mashkina A., Khavinson V. Pinealon protects the rat offspring from prenatal hyperhomocysteinemia // Int J. Clin. Exp. Med. 2012. Vol. 5, N 2. P. 179-185.
6. Borlikova G.G., Trejo M., Mably A.J., Mc Donald J.M., Sala Frigerio C., Regan C.M., Murphy K.J., Masliah E., Walsh D.M. Alzheimer brain-derived amyloid b-protein impairs synaptic remodeling and memory consolidation // Neurobiol. Aging. 2013. Vol. 34, N 5. P. 1315-1327.
7. Bourne J., Harris K.M. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? // Curr. Opin. Neurobiol. 2007. Vol. 17, N 3. P. 381-386.
8. Bourne J.N., Harris K.M. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines // Annu. Rev. Neurosci. 2008. Vol. 31. P. 47-67.
9. Brookmeyer R., Johnson E., Ziegler-Graham K., Arrighi H.M. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease // Alzheimers Dement. 2007. Vol. 3, N 3. P. 186-191.
10. Penzes P., Cahill M.E., Jones K.A., VanLeeuwen J.E., Woolfrey K.M. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders // Nat. Neurosci. 2011. Vol. 14, N 3. P. 285-293.
11. Popugaeva E., Pchitskaya E., Speshilova A., Alexandrov S., Zhang H., Vlasova O., Bezprozvanny I. STIM2 protects hippocampal mushroom spines from amyloid synaptotoxicity // Mol. Neurodegener. 2015. Vol. 10. P. 37. doi: 10.1186/s13024-015-0034-7.
12. Rodriguez A., Ehlenberger D.B., Dickstein D.L., Hof P.R., Wearne S.L. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images // PLoS One. 2008. Vol. 3, N 4. P. e1997. doi: 10.1371/journal.pone.0001997.
13. Sun S., Zhang H., Liu J., Popugaeva E., Xu N.J., Feske S., White C.L. 3rd, Bezprozvanny I. Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice // Neuron. 2014. Vol. 82, N 1. P. 79-93.
14. Wei Z.H., He Q.B., Wang H., Su B.H., Chen H.Z. Meta-analysis: the efficacy of nootropic agent Cerebrolysin in the treatment of Alzheimer's disease // J. Neural Transm. (Vienna). 2007. Vol. 114, N 5. P. 629-634.