

Исследование механизма нейропротективного действия пептидного препарата семакс в мозге крыс в условиях ишемии-реперфузии

Сударкина О.Ю.¹, Дмитриева В.Г.¹, Филиппенков И.Б.¹, Ставчанский В.В.¹,
Денисова А.Е.², Губский Л.В.², Лимборская С.А.¹, Дергунова Л.В.¹

1 — ФГБУН Институт молекулярной генетики Российской академии наук
123182, г. Москва, пл. Курчатова, д. 2

2 — ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

Синтетический пептид АКТГ(4-7)PGP ускоряет регресс неврологических нарушений при ишемическом инсульте, однако молекулярные механизмы его действия полностью не известны. На модели полуторачасовой окклюзии средней мозговой артерии крыс был проведен анализ влияния пептида на экспрессию ряда генов и белков, вовлеченных в сигнальные пути, приводящие к воспалению и гибели клеток в условиях ишемии-реперфузии. Показано, что пептид через 24 ч от начала окклюзии снижает повышенный при ишемии уровень экспрессии в ишемизированной ткани мозга крыс мРНК провоспалительных цитокинов и хемокинов IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , Cxcl2 и Ccl3. Пептид снижал повышенные при ишемии уровни экспрессии белков металлопротеиназы MMP-9, транскрипционного фактора c-Fos, активных JNK киназ и предотвращал ишемическое снижение уровня активного транскрипционного фактора CREB.

Ключевые слова: Семакс, ишемия, инсульт, экспрессия генов.

Для цитирования: Сударкина О.Ю., Дмитриева В.Г., Филиппенков И.Б., Ставчанский В.В., Денисова А.Е., Губский Л.В., Лимборская С.А., Дергунова Л.В. Исследование механизма нейропротективного действия пептидного препарата Семакс в мозге крыс в условиях ишемии-реперфузии. *Медицинская генетика* 2020; 19(5): 76-78.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.05.76-78

Автор для корреспонденции: Сударкина Ольга Юрьевна, e-mail: sudarolg@img.ras.ru

Финансирование: Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 19-14-00268).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 20.05.2020

Investigation of the mechanism of the neuroprotective effect of the peptide preparation Semax in rat brain under conditions of ischemia-reperfusion

Sudarkina O. Yu.¹, Dmitrieva V.G.¹, Filippenkov I.B.¹, Stavchansky V.V.¹,
Denisova A.E.², Gubsky L.V.², Limborska S.A.¹, Dergunova L.V.¹

1 — Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences
Kurchatov Sq. 2, Moscow, 123182, Russian Federation

2 — Pirogov Russian National Research Medical University
Ostrovitianov str. 1, Moscow, 117997, Russian Federation

The synthetic peptide ACTH (4-7) PGP accelerates the regression of neurological disorders in ischemic stroke, but the molecular mechanisms of its action are not completely known. On the model of an hour and a half occlusion of the rat middle cerebral artery, an analysis was made of the effect of the peptide on the expression of a number of genes and proteins involved in signaling pathways leading to inflammation and cell death under conditions of ischemia-reperfusion. It was shown that the peptide 24 hours after the onset of occlusion reduces the level of expression of mRNA of pro-inflammatory cytokines and chemokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , Cxcl2 and Ccl3 in ischemic brain tissue. The peptide decreased the levels of expression of proteins metalloproteinase MMP-9, transcription factor c-Fos, active JNK kinases which were increased under ischemia, and prevented ischemic decrease in the level of active transcription factor CREB.

Key words: Semax, ischemia, stroke, gene expression.

For citation: Sudarkina O. Yu., Dmitrieva V.G., Filippenkov I.B., Stavchansky V.V., Denisova A.E., Gubsky L.V., Limborska S.A., Dergunova L.V. Investigation of the mechanism of the neuroprotective effect of the peptide preparation Semax in rat brain under conditions of ischemia-reperfusion. *Medical genetics*. 2020; 19(5): 76-78. (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.05.76-78

Corresponding author: Sudarkina Olga Yurjevna, e-mail: sudarolg@img.ras.ru

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (RSF), grant 19-14-00268.

Conflicts of interest. The authors declare no conflict of interests.

Accepted: 20.05.2020

Синтетический пептид, включающий 4-7 аминокислотные остатки адренкортикотропного гормона и стабилизирующий С-концевой трипептид Pro-Gly-Pro, АКТГ(4-7)PGR, является действующим веществом препарата «Семакс», используемого в терапии ишемического инсульта. АКТГ(4-7)PGR ускоряет регресс неврологических нарушений, а также обладает ноотропным действием при отсутствии гормональных и токсических побочных эффектов [1]. Несмотря на клиническое применение, молекулярные механизмы действия пептида полностью не известны. Ранее на модели полуторачасовой окклюзии средней мозговой артерии крыс с последующей реперфузией (tMCAO) мы исследовали полногеномный ответ транскриптома на ишемию-реперфузию и влияние на него АКТГ(4-7)PGR с помощью высокопроизводительного секвенирования РНК (RNA-Seq). Мы показали, что пептид препятствует снижению под действием ишемии экспрессии генов, связанных с нейротрансмиссией (*Chrm1*, *Chrm4*, *Drd1*, *Drd2*, *Gabra5*, *Gria3*, *Grm3*, *Htr6* и др.), и подавляет активацию генов, связанных с воспалением (*Fos*, *Jun*, *Tlr2*, *Cd14*, *Lcn2*, *Icam1*, *Mmp9*, *Pgts2*, *Hspa1a*, *Hspb1*, *Ccl3*, *Ccl6* и др.), проявляя компенсаторный эффект действию ишемии-реперфузии. Для дальнейшего изучения нейропротективного эффекта пептида в условиях ишемии-реперфузии встает задача детального анализа экспрессии ключевых генов и белков, вовлеченных в сигнальные пути, приводящие к воспалению и гибели клеток.

Цель работы — изучение молекулярных механизмов действия пептида АКТГ(4-7)PGR в условиях ишемии-реперфузии путем детализации его влияния на экспрессию ряда генов и белков в ишемизированной ткани мозга, вовлеченных в патогенетические механизмы гибели клеток при инсульте.

Материалы и методы

Пептид АКТГ(4-7)PGR синтезирован в Институте молекулярной генетики РАН. Самцов крыс линии Вистар подвергали tMCAO в течение 90 мин. Животным вводили внутривенно пептид в дозе 10 мкг/100 г веса животного или физиологический раствор через 1,5 ч, 2,5 ч и 6,5 ч от начала окклюзии. Образцы тканей мозга забирали через 24 ч

от начала окклюзии и использовали для выделения РНК и белка. Анализ экспрессии генов цитокинов проводили методом ПЦР в реальном времени. Содержание белков в ишемизированной ткани оценивали с помощью иммуноблоттинга образцов суммарного белка ткани.

Результаты

Под действием пептида происходило достоверное снижение (примерно в 2-3 раза) экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов и хемокинов IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , Cxcl2 и Ccl3, которая повышалась при ишемии от 4,3 (TNF- α) до 37,4 раз (Cxcl2). Известно, что ишемия вызывает быструю активацию экспрессии c-Fos, персистентная высокая экспрессия c-Fos в перинфарктной области ассоциирована с ишемической гибелью клеток. CREB является ключевым регулятором транскрипционных программ, регулирующих нейрональную пластичность, нейрогенез и выживание нейронов в норме, а также является ключевым фактором нейропротективного действия меланокортинов [2]. Ингибирование JNK киназ, оказывает выраженный протективный эффект на моделях церебральной ишемии, связанный с подавлением апоптоза и воспаления [3]. MMP-9 является ключевым фактором, разрушающим гематоэнцефалический барьер при ишемическом воспалении, и её уровень в плазме крови коррелирует с объемом и тяжестью инсульта [4]. В нашем эксперименте АКТГ(4-7)PGR достоверно снижал более чем в 1,5 раза повышенный при ишемии более чем 2 раза уровень c-Fos в коре. Также пептид полностью предотвращал ишемическое снижение уровня активного CREB в подкорке и примерно в 1,5 раза снижал ишемическую активацию JNK киназ в подкорке и индукцию MMP-9 в коре, что может свидетельствовать о противовоспалительном и нейропротективном эффекте семакса.

Таким образом, нейропротективное действие семакса при ишемии-реперфузии может быть связано со снижением экспрессии провоспалительных цитокинов и хемокинов, снижением индукции MMP-9 и включением подавления активации JNK киназ и активацию транскрипционного фактора CREB.

Литература

1. Гусев Е. И., Скворцова В. И., Чуканова Е. И. Семакс в профилактике прогрессирования и развития обострений у больных с дисциркуляторной энцефалопатией. *Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова* 2005; 105(2): 35–40.
2. Sakamoto K., Karelina K., Obrietan K. CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *J. Neurochem.* 2011; 116(1):1–9.
3. Benakis C., Bonny C., Hirt L. JNK inhibition and inflammation after cerebral ischemia. *Brain Behav Immun.* 2010; 24(5):800–811.
4. Ramos-Fernandez M., Bellolio M.F., Stead L.G. Matrix metalloproteinase-9 as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2011; 20(1):47–54.

References

1. Gusev E.I., Skvortsova V.I., Chukanova E.I. Semaks v profilaktike progressirovaniya i razvitiya obostreniy u bol'nykh s distsirkulyatornoy entsefalopatiyei [Semax in prevention of disease progress and development of exacerbations in patients with cerebrovascular insufficiency]. *Zhurn. Nevrol. Psychiatric im. S.S. Korsakova* [S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry]. 2005; 105(2):35–40. (In Russ.)
2. Sakamoto K., Karelina K., Obrietan K. CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *J. Neurochem.* 2011; 116(1):1–9.
3. Benakis C., Bonny C., Hirt L. JNK inhibition and inflammation after cerebral ischemia. *Brain Behav Immun.* 2010; 24(5):800–811.
4. Ramos-Fernandez M., Bellolio M.F., Stead L.G. Matrix metalloproteinase-9 as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2011; 20(1):47–54.