

# Вплив пептиду семакс на синаптичну активність і короткочасну пластичність глутаматергічних синапсів ко-культивованих нейронів спінальних гангліїв дорсального рогу спинного мозку

М.С.Шипшина<sup>1</sup>, М.С.Веселовський<sup>1</sup>, М.Ф. М'ясоєдов<sup>2</sup>, С.И. Шрам<sup>2</sup>, С.А. Федулова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;

<sup>2</sup>Інститут молекулярної генетики РАН, Москва, РФ; E-mail: shypshyna.mariia@gmail.com

*Досліджено вплив тривалого культивування (12 діб in vitro) нейронів спінальних гангліїв (СГ) та нейронів дорсального рогу (ДР) з пептидом семакс на рівень синаптичної активності у ко-культурах, а також на короткочасну пластичність у сенсорних синапсах. Показано, що культивування нейронів з пептидом у концентраціях 10 та 100 мкмоль/л сприяло збільшенню частоти глутаматергічних спонтанних постсинаптичних струмів, зареєстрованих у нейронах ДР, на  $71,7 \pm 1,8$  та на  $93,9 \pm 3,1$  % відповідно. Семакс істотно не впливав на амплітуду та частоту мініатюрних глутаматергічних струмів, але підвищував амплітуду спонтанних постсинаптичних струмів, а також квантовий вміст. Результати свідчать про підвищення ефективності багатовезикулярного викиду глутамату в нейронних мережах ко-культур при інкубації з пептидом. Слід відмітити також зміни основних показників короткочасної пластичності у сенсорних синапсах під впливом семаксу: 1) збільшення коефіцієнта парної стимуляції від  $0,53 \pm 0,028$  до  $0,91 \pm 0,072$  та  $0,95 \pm 0,026$ ; 2) зниження співвідношення коефіцієнтів варіації постсинаптичних струмів ( $CV2/CV1$ ) від  $1,49 \pm 0,11$  до  $1,02 \pm 0,09$  та  $1,11 \pm 0,13$  відповідно. Отримані результати свідчать про стимулювальний вплив семаксу на активність глутаматергічних синапсів у нейронних мережах ко-культур, а також про його здатність ефективно модулювати короткочасну пластичність у сенсорних синапсах.*

*Ключові слова: спінальні ганглії; дорсальний ріг спинного мозку; глутамат; постсинаптичні струми; синаптична активність; короткочасна пластичність; пептид семакс.*

## ВСТУП

Пептид семакс (Met-Glu-His-Pro-Gly-Pro), синтезований в Інституті молекулярної генетики РАН, є нейроактивним аналогом адренкортикотропного гормону (АКТГ), який має низку нейропротекторних властивостей. У ЦНС він сприяє підвищенню рівня проліферації нейроглії і ендотелію кровоносних капілярів, а також поліпшенню стану нервової тканини при ішемії [1]. Семакс широко використовується при лікуванні алергічних і запальних захворювань зорового нерва [2], позитивно впливає на розвиток пам'яті, навчання і уваги. Він також характеризується модулювальними ефектами на синаптичну

© М.С.Шипшина, М.С.Веселовський, М.Ф. М'ясоєдов, С.И. Шрам, С.А. Федулова

передачу [3]. Тригерним механізмом дії гептапептиду є активація синтезу нейротрофінів. Імовірно, ноотропний ефект семаксу реалізується через підвищення рівня BDNF (від англ. brain-derived neurotrophic factor) та NGF (від англ. nerve growth factor) у нервовій тканині, оскільки пептид вибірково впливає на транскрипцію генів цих нейротрофінів та їх рецепторів у корі головного мозку [4, 5].

Семакс також має місцеву анальгезивну дію, що виявляється у зниженні рівня больової поведінки у щурів у різних моделях периферичних невротатій [6, 7] і досягається модуляцією потоку ноцицептивних сигналів. Значна роль у перетворенні ноцицептив-

ного сигналу належить глутаматергічним синапсам первинних аферентних нейронів спінальних гангліїв (СГ), що здійснюють передачу сенсорних сигналів з периферії у спинний мозок, а також вторинним аферентним нейронам дорсального рогу (ДР), які інтегрують больовий сигнал і передають його у висхідному напрямку. У багатьох відділах мозку функціонування глутаматергічної нейропередачі пов'язане з викидом нейротрофінів. Рецептори останніх (trkA, trkB) широко експресуються у глутаматних синапсах, що робить цю систему придатною для дослідження динамічної регуляції збуджувальної передачі та синаптичної пластичності. У зв'язку з цим ми припустили, що антиноцицептивні та нейропротекторні ефекти семаксу частково можуть бути реалізовані через вплив на механізми передачі больового сигналу у сенсорних синапсах, а також через підвищення активності синаптичної передачі у спинному мозку.

Мета нашої роботи – визначити вплив тривалого культивування нейронів СГ і ДР з семаксом на рівень синапатичної активності *in vitro*, а також на короткочасну пластичність нейропередачі в сенсорних синапсах.

## МЕТОДИКА

*Ко-культура нейронів СГ і ДР.* Методика сумісного культивування нейронів СГ і ДР не відрізнялася від описаної раніше [8]. СГ та ДР люмбального відділу виділяли у неонатальних щурів лінії Вістар. Сегменти ДР обробляли 0,2%-м розчином трипсину (тип XI) протягом 8 хв (37°C), СГ – 0,2%-м розчином пронази протягом 7 – 8 хв (37°C). Після механічної дезагрегації, яку проводили з використанням різних за діаметром кінчика пастерівських піпеток, нейрони висівали на покриті полі-L-орнітином чашки Петрі (щільність клітин у ко-культурах – близько 30 тис. од/см<sup>2</sup>). Культури інкубували при 37°C і 5% CO<sub>2</sub> у повітряному середовищі. Розчин для культивування виготовляли на базі

мінімального середовища Ігла з додаванням 10% кінської сироватки, 2,3 г/л NaHCO<sub>3</sub>, 8 мкг/мл інсуліну, 50 од/мл бензилпеніциліну натрієвої солі та 50 мкг/мл стрептоміцину сульфату. Проліферацію гліальних клітин у культурах пригнічували цитозин-А-D-арабінофуранозидом (5 мкмоль/л). Пептид семакс у концентраціях 10 та 100 мкмоль/л додавали до середовища на 4-ту добу культивування, після відміни цитозин-А-D-арабінофуранозиду. Заміну культурального середовища, що містило семакс, проводили з інтервалом у 5 діб. Протягом дозрівання ко-культури додатково не збагачували ростовими факторами. Електрофізіологічні експерименти проводили на 16-ту добу культивування.

*Електрофізіологія.* З використанням методу patch-clamp у конфігурації «ціла клітина» у парі синаптично зв'язаних нейронів, реєстрували спонтанні і мініатюрні збуджувальні постсинаптичні струми (сВПСС і мВПСС відповідно) у нейронах ДР, а також моносинаптичні збуджувальні постсинаптичні струми (вВПСС), викликані в нейронах ДР генерацією потенціалів дії (ПД) ноцицептивними нейронами СГ. Ноцицептивний фенотип пресинаптичних нейронів СГ визначали відповідно до морфофункціональних показників (малий розмір соми, форма і параметри ПД, чутливість до капсаїцину).

Експериментальний фізіологічний розчин містив (ммоль/л): NaCl – 140; KCl – 3; CaCl<sub>2</sub> – 2; MgCl<sub>2</sub> – 2; глюкоза – 10; HEPES – 20; pH 7,4 (доведено NaOH); внутрішньоклітинний розчин у patch-піпетках – калію глюконату – 155; EGTA – 0,5; MgCl<sub>2</sub> – 1; HEPES – 20; pH 7,4 (доведено KOH). Підтримуваний потенціал на нейронах ДР був -70 мВ. Реєстрацію мЗПСС у нейронах ДР проводили у позаклітинному розчині, що містив 0,5 ммоль/л Ca<sup>2+</sup>, 10 ммоль/л Mg<sup>2+</sup> та 0,25 мкмоль/л тетродотоксину. Експерименти проводили при 20–22°C. При реєстрації глутаматергічних постсинаптичних струмів гальмівну передачу блокували додаванням у позаклітинний розчин специфічних блокаторів ГАМК<sub>A</sub>- та

гліцинових рецепторів (бікукуліну метіодиду, стрихніну). Заміну розчинів, які доповнювалися блокаторами іонотропних глутаматних рецепторів (DNQX, D<sub>L</sub>-AP5), проводили зі швидкістю 2 мл/хв.

Для оцінки короткочасної пластичності в сенсорних синапсах розраховували коефіцієнт парної стимуляції (КПС) як частку від пікових значень амплітуд двох послідовно зареєстрованих (з інтервалом 200 мс) вВПСС:  $KPC = \frac{вВПСС2}{вВПСС1}$ . Коефіцієнти варіації (CV) розраховували як відношення стандартного відхилення амплітуд вВПСС до їх середнього значення.

Числові результати представлені як середні  $\pm$  похибка середнього; розміри вибірки усереднення подані в дужках. Перевірку гіпотези про належність вибірки до нормально розподіленої генеральної сукупності проводили за тестом Шапіро-Уїлка. Для статистичного порівняння розподілів аналізованих величин використовували критерій узгодженості Пірсона ( $\chi^2$ ). Для визначення рівня значущості розбіжностей між середніми значеннями в групах використовували критерій *t* Стьюдента. Рівні значущості розбіжностей позначені у тексті, в таблицях та на рисунках.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для визначення впливу семаксу на рівень синаптичної активності в ко-культури аналізували частоту виникнення, а також амплітуди сВПСС у нейронах ДР. Реєстрували сВПСС, опосередковані викидом глутамату. Вони мали швидку кінетику наростання і спаду (час наростання  $2,31 \pm 0,58$  мс; спаду –  $4,50 \pm 0,92$  мс;  $n = 6$ ). Середні значення амплітуд сВПСС лінійно залежали від величин підтримуваних потенціалів на нейронах ДР. Потенціал реверсії сВПСС становив  $5,12 \pm 2,31$  мВ ( $n = 5$ ). Позаклітинна аплікація блокаторів іонотропних глутаматних рецепторів DNQX (10 мкмоль/л) та D<sub>L</sub>-AP5 (10 мкмоль/л) призводила до повного блокування сВПСС.

*Семакс викликає підвищення частоти сВПСС в нейронах ДР.* Інкубація нейронів за наявності семаксу протягом 12 діб призводила до підвищення частоти виникнення сВПСС у нейронах ДР (рис. 1, 2).

При культивуванні з пептидом у концентрації 10 мкмоль/л цей показник підвищувався на  $71,7 \pm 1,8$  % ( $n = 6$ ;  $P < 0,001$ ), а при концентрації 100 мкмоль/л – на  $93,9 \pm 3,1$  % ( $n = 6$ ;  $P < 0,001$ ) щодо контролю. Розподіли частот

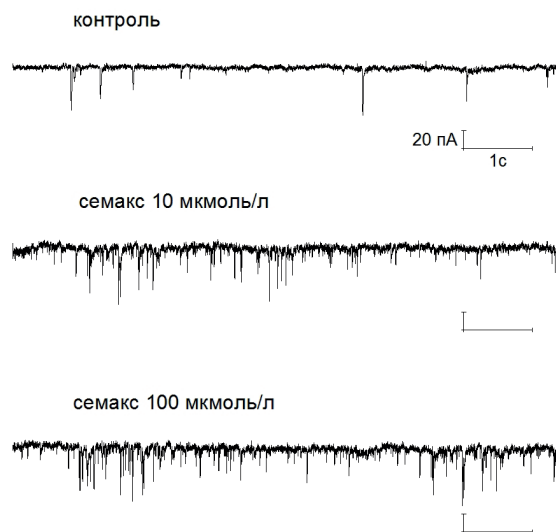


Рис.1. Зміна спонтанної активності в спільній культурі нейронів спінальних гангліїв (СГ) та дорсального рогу (ДР) спинного мозку внаслідок тривалого культивування (12 діб *in vitro*) з пептидом семакс. Приклади реєстрацій глутаматергічних спонтанних постсинаптичних струмів у нейронах ДР: у контролі, при культивуванні з семаксом у концентраціях 10 та 100 мкмоль/л

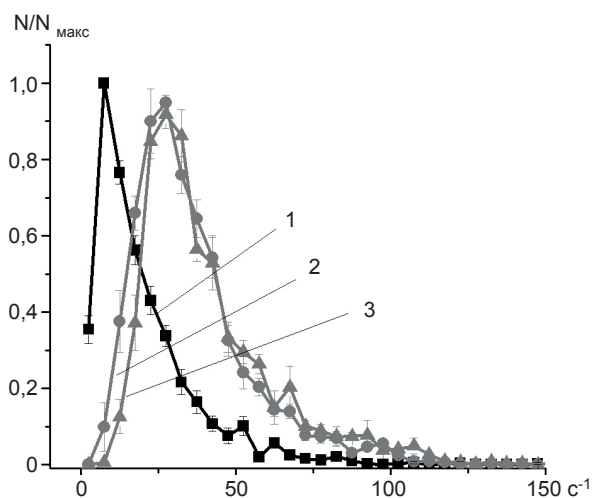


Рис.2. Підвищення частоти глутаматергічних спонтанних постсинаптичних струмів (сВПСС) в нейронах дорсального рогу при тривалому культивуванні (12 діб *in vitro*) з семаксом. Усереднені розподіли частот сВПСС нормовані на максимальне значення (N/N<sub>макс</sub>). 1 – контроль; 2, 3 – групи нейронів, культивованих з семаксом у концентрації 10 мкмоль/л і 100 мкмоль/л відповідно

сВПСС у нейронах, інкубованих з семаксом, статистично вірогідно відрізнялися від контрольних значень. Моді та медіани частотних гістограм сВПСС у нейронах, попередньо культивованих з семаксом, також були істотно вищими за контроль (табл. 1). Розподіли частот сВПСС у групах нейронів, культивованих при різних концентраціях пептиду істотно не відрізнялися ( $P > 0,1$ ). Але середні значення частоти, а також медіани частотних гістограм сВПСС у нейронах ДР, інкубованих з семаксом у концентрації 100 мкмоль/л, були вірогідно вищими (на  $12,9 \pm 3,2\%$   $n = 6$ ;  $P = 0,02$ ) за такі при культивуванні з семаксом у меншій концентрації.

Представлені результати свідчать про посилення синаптичної активності в нейронних мережах ко-культур під впливом семаксу. Як відомо, підвищення частоти спонтанних постсинаптичних відповідей нейронів у процесі їх *in vitro* диференціювання тісно корелює зі збільшенням числа функціональних синапсів на постсинаптичних нейронах [9], тобто з підвищенням рівня синаптогенезу. Провідна роль у процесах формування, дозрівання та стабілізації синапсів у нейронах ЦНС належить нейротрофінам (NGF, BDNF тощо), транскрипція генів і рецепторів котрих посилюється під впливом семаксу [4,5]. Таким чином, можна припустити, що пептид надає опосередкований стимулювальний вплив на формування глутаматергічних синапсів на нейронах ДР у ко-культурі з нейронами СГ, імовірно через стимуляцію синтезу нейротрофінів.

*Семакс підвищує амплітуду і квантовий вміст сВПСС у нейронах ДР.* Амплітудні розподіли сВПСС у контролі та в нейронах, культивованих з семаксом, характеризувалися наявністю декількох рівновіддалених піків, які апроксимувалися сумою кривих Гауса (рис. 3).

Середня відстань між піками таких гістограм відповідала першій моді ( $-20,6 \pm 0,8$  пА;  $n = 36$ ) розподілів, що свідчить про чітко виражений багатоквантовий характер вивільнення глутамату в синапсах ко-культивованих нейронів. Крім того, моді амплітудних розподілів сВПСС були кратними моді унімодальних амплітудних гістограм мВПСС ( $-20,5 \pm 0,7$  пА;  $n = 7$ ), які інтерпретуються

Таблиця 1. Показники розподілів частот глутаматергічних спонтанних постсинаптичних струмів (с<sup>-1</sup>), зареєстрованих у нейронах дорсального рогу на 16-ту добу *in vitro* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Показники	Контроль	Семакс	
		10 мкмоль/л	100 мкмоль/л
Середнє значення	21,17±1,15	36,34±0,67*	41,04±1,29*,**
Мода, с <sup>-1</sup>	14,09±1,12	24,45±2,43*	22,95±2,11*
Медіана, с <sup>-1</sup>	15,18±0,73	31,74±0,71*	34,49±0,73*,**

\* статистично вірогідна різниця у порівнянні зі значеннями у контролі;

\*\* статистично вірогідна різниця при порівнянні показників між групами культивування з семаксом.

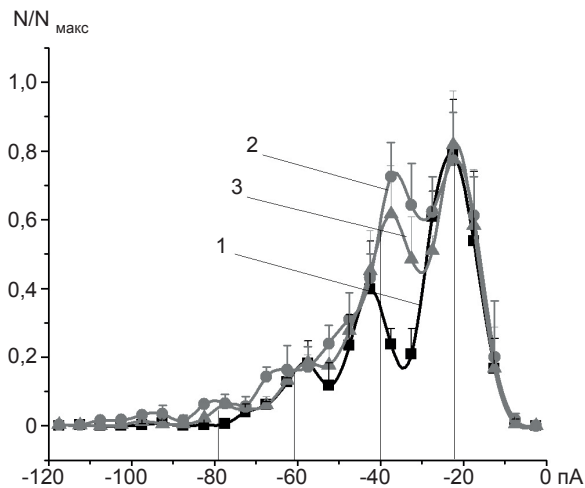


Рис.3. Вплив тривалого культивування (12 діб *in vitro*) з семаксом на амплітуду глутаматергічних спонтанних постсинаптичних струмів (сВПСС) у нейронах дорсального рогу. Суперпозиція усереднених полімодальних амплітудних розподілів сВПСС (амплітуди нормовані на максимальні значення;  $N/N_{\max}$ ) у контролі (1), на тлі культивування з пептидом у концентраціях 10 (2) та 100 (3) мкмоль/л. Вертикальні лінії вказують на середні значення мод амплітудних гістограм

як значення синаптичного струму внаслідок викиду одиничного кванту глутамату в синапсах культивованих нейронів [10]. Кінетика мВПСС відповідала такій сВПСС (час наростання  $3,07 \pm 0,35$  мс,  $\tau$  спаду  $5,51 \pm 0,53$  мс;  $n = 5$ ). На тлі культивування з семаксом амплітуди мВПСС істотно не змінювалися порівняно з контролем. Середня частота мВПСС також вірогідно не відрізнялася від контрольних значень:  $0,36 \pm 0,07$   $s^{-1}$  ( $n = 5$ ) у контролі,  $0,34 \pm 0,09$   $s^{-1}$  ( $n = 4$ ) та  $0,40 \pm 0,06$   $s^{-1}$  ( $n = 4$ ) при культивуванні нейронів з 10 та 100 мкмоль/л семаксу, відповідно.

Розподіли амплітуд сВПСС у нейронах ДР, що культивувалися з пептидом, відріз-

нялися від контрольної групи ( $P < 0,001$ ) більшим числом піків при відносно постійній середній відстані між ними. Також відзначалося деяке підвищення частоти спостереження 2- і 4-квантових подій, як це видно при порівнянні амплітудних гістограм (див. рис. 3). Відмінності у розподілах амплітуд сВПСС у групах культивування з пептидом при різних концентраціях не сягали статистично значущого рівня.

Середні значення амплітуд сВПСС, а також значення медіан амплітудних розподілів, зареєстрованих у нейронах ДР при культивуванні з семаксом, були несуттєво, але вірогідно вищими за контрольні (табл. 2).

Значення сВПСС у групах нейронів, інкубованих з пептидом, зростали не більше ніж на 13,5% відносно контролю. Підвищення амплітуди сВПСС при культивуванні з пептидом спостерігалось паралельно зі збільшенням квантового вмісту (див. табл. 2).

Відповідно до біноміальної моделі, прийнятної для опису ймовірності вивільнення глутамату в синапсах досліджуваних нейронів [11], квантовий вміст залежить від ймовірності викиду окремих квантів та числа зон викиду нейромедіатора. Для глутаматергічних ВПСС ймовірність викиду пресинаптичних везикул є прямопропорційною частоті мВПСС, тобто частоті викиду поодиноких квантів глутамату. У наших експериментах тривале культивування нейронів з семаксом не змінювало цей показник порівняно з контролем. Отже, підвищення ефективності багатовезикулярного викиду в нейронних мережах ко-культур на тлі інкубації з семаксом вочевидь реалізується внаслідок зростання кількості глутаматергічних синапсів на ней-

Таблиця 2. Показники амплітудних розподілів сВПСС, зареєстрованих у нейронах дорсального рогу на 16-ту добу *in vitro* ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Показники	Контроль	Семакс	
		10 мкмоль/л	100 мкмоль/л
Середнє значення, пА	$-33,50 \pm 2,58$	$-37,85 \pm 3,45^*$	$-35,32 \pm 3,20^*$
Медіана, пА	$-30,38 \pm 2,78$	$-34,48 \pm 3,36^*$	$-29,52 \pm 2,92^*$
Квантовий вміст	$1,54 \pm 0,08$	$1,97 \pm 0,11^*$	$1,91 \pm 0,09^*$

\* статистично вірогідна різниця у порівнянні зі значеннями у контролі.

ронах ДР під впливом пептиду.

Семакс модулює короточасну пластичність у ноцицептивних сенсорних синапсах на нейронах ДР. Для оцінки впливу семаксу на короточасну пластичність у сенсорних синапсах досліджували одну з її найбільш поширених форм – пластичність при парній стимуляції (ППС). З використанням методу парної patch-clamp реєстрації стимулювали пресинаптичний нейрон СГ ноцицептивного фенотипу парами імпульсів з інтервалом 200 мс і відводили викликані глутаматергічні ВВПСС у нейроні ДР. Зареєстровані струми були опосередковані переважно активацією AMPA-рецепторів [12].

У нейронних парах після культивування з семаксом реєстрували ВВПСС значно більшої амплітуди, ніж у контролі (рис. 4).

Середні значення амплітуд струмів у контролі становили  $-74,2 \pm 7,8$  пА ( $n = 8$ ), при культивуванні з пептидом у концентрації 10 мкмоль/л  $-155,5 \pm 7,2$  пА ( $n = 6$ ;  $P < 0,001$ ), у концентрації 100 мкмоль/л  $-144,7 \pm 19,4$  пА ( $n = 7$ ;  $P < 0,01$ ). Таке підвищення цього показника ймовірно є результатом збільшення числа сенсорних синапсів на нейронах ДР у процесі культивування під впливом семаксу.

Тривале культивування нейронів СГ і ДР з семаксом суттєво впливало на параметри

ППС: КПС істотно підвищувався для нейронів, культивованих з пептидом (див. рис. 4). У контрольній групі відзначалася виражена депресія ВВПСС при парній стимуляції нейронів СГ (КПС =  $0,53 \pm 0,028$ ;  $n = 8$ ). Після інкубації з семаксом (10 та 100 мкмоль/л) ступінь депресії значно знижувався: КПС в цих групах нейронних пар становив  $0,91 \pm 0,072$  ( $n = 6$ ;  $P < 0,01$ ) та  $0,95 \pm 0,026$  ( $n = 7$ ;  $P < 0,001$ ) відповідно.

При аналізі ППС порівнювали коефіцієнти варіації амплітуд 1-го та 2-го ВВПСС (CV1 та CV2). Для нейронних пар контрольної групи співвідношення CV2/CV1 становило  $1,49 \pm 0,11$  ( $n = 8$ ). Таке збільшення варіації 2-го ВВПСС в порівнянні з 1-м вказує на пресинаптичні механізми розвитку депресії при парній стимуляції [13], пов'язані зі зменшенням імовірності викиду медіатора при відповіді на 2-й стимул у парі. Після культивування нейронів СГ і ДР з пептидом у концентраціях 10 та 100 мкмоль/л співвідношення CV2/CV1 були достовірно нижчими за контроль і становили  $1,02 \pm 0,09$  ( $n = 6$ ;  $P < 0,05$ ) та  $1,11 \pm 0,13$  ( $n = 7$ ;  $P < 0,01$ ) відповідно. Як видно, у цих групах нейронів підвищення варіації 2-го ВВПСС порівняно з 1-м є незначним, що вказує на стабілізацію ймовірності викиду глутамату під впливом семаксу. Пред-

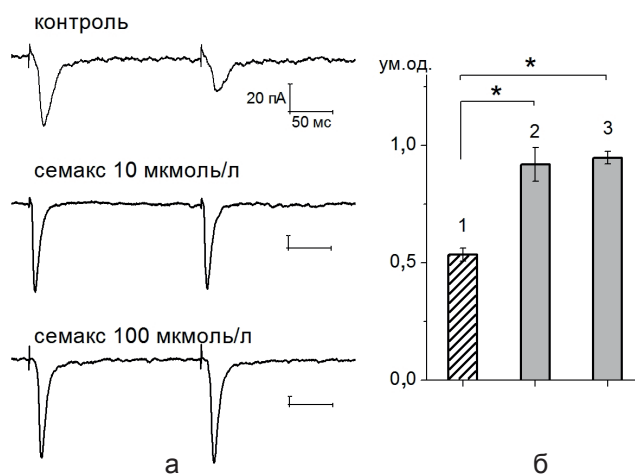


Рис.4. Ефекти тривалого культивування (12 днів *in vitro*) з семаксом на пластичність при парній стимуляції в ноцицептивних сенсорних синапсах: а – усереднені записи збуджувальних постсинаптичних струмів в ноцицептивних синапсах у контролі (1), на тлі культивування з пептидом у концентраціях 10 (2) та 100 (3) мкмоль/л; б – гістограма середніх значень коефіцієнтів парної стимуляції. \* статистично вірогідна різниця порівняно з контролем

ставлені результати з одного боку вказують на те, що на тлі дії семаксу пластичність при парній стимуляції стає менш вираженою, а з іншого боку – свідчать про здатність пептиду підвищувати рівень надійності синаптичної передачі в сенсорних синапсах.

Отже, пептид семакс при тривалому впливі у концентраціях 10 та 100 мкмоль/л сприяє підвищенню синаптичної активності в нейронних мережах спільно культивованих нейронів СГ і ДР. В умовах *in vitro* пептид стимулює функцію глутаматергічних синапсів на нейронах ДР, а також підвищує ймовірність багатовезикулярного викиду в нейронних мережах ко-культур. У ноцицептивних сенсорних синапсах семакс вочевидь діє на пресинаптичну терміналь, підвищуючи рівень надійності передачі соматосенсорної інформації в умовах фізіологічно детермінованої частоти імпульсної активності аферентних нейронів.

*Ця робота є частиною проекту спільних українсько-російських наукових досліджень НАН України та Російського фонду фундаментальних досліджень «Вивчення клітинних механізмів нейропротекторної дії гліпролінів при системних пошкодженнях нейронів» (номер реєстрації 0114U005000).*

**М.С.Шипшина, Н.С. Веселовский,  
Н.Ф. Мясоедов, С.И. Шрам, С.А. Федулова**

### **ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА СЕМАКС НА СИНАПТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И КРАТКОВРЕМЕННУЮ ПЛАСТИЧНОСТЬ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКИХ СИНАПСОВ КО-КУЛЬТИВИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ СПИНАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ ДОРСАЛЬНОГО РОГА СПИННОГО МОЗГА**

Исследовано влияние длительного культивирования (12 суток *in vitro*) нейронов спинальных ганглиев (СГ) и нейронов дорсального рога (ДР) с пептидом семакс на уровень синаптической активности в ко-культурах, а также на кратковременную пластичность в сенсорных синапсах. Показано, что культивирование нейронов с пептидом в концентрациях 10 та 100 мкмоль/л способствовало повышению частоты глутаматергических спонтанных постсинаптических токов, регистрируемых в нейронах

ДР на  $71,7 \pm 1,8$  и на  $93,9 \pm 3,1$  % соответственно. Семакс существенно не влиял на амплитуду и частоту миниатюрных глутаматергических токов, но повышал амплитуду спонтанных постсинаптических токов, а также квантовое содержание. Результаты свидетельствуют о повышении эффективности многовезикулярного выброса глутамата в нейронных сетях ко-культур при инкубации с пептидом. Следует отметить также изменения основных параметров кратковременной пластичности в сенсорных синапсах под действием семакса: 1) повышение коэффициента парной стимуляции от  $0,53 \pm 0,028$  до  $0,91 \pm 0,072$  и  $0,95 \pm 0,026$ ; 2) снижение соотношения коэффициентов вариации постсинаптических токов (CV2/CV1) от  $1,49 \pm 0,11$  до  $1,02 \pm 0,09$  и  $1,11 \pm 0,13$  соответственно. Полученные результаты указывают на стимулирующее влияние семакса на активность глутаматергических синапсов в нейронных сетях ко-культур, а также на способность пептида эффективно модулировать кратковременную пластичность в сенсорных синапсах.

Ключевые слова: спинальные ганглии; дорсальный рог спинного мозга; глутамат; постсинаптические токи; синаптическая активность; кратковременная пластичность; пептид семакс.

**M.S. Shypshyna<sup>1</sup>, N.S. Veselovsky<sup>1</sup>,  
N.F. Myasoedov<sup>2</sup>, S.I. Shram<sup>2</sup>, S.A. Fedulova<sup>1</sup>**

### **EFFECT OF PEPTIDE SEMAX ON SYNAPTIC ACTIVITY AND SHORT-TERM PLASTICITY OF GLUTAMATERGIC SYNAPSES OF CO-CULTURED DORSAL ROOT GANGLION AND DORSAL HORN NEURONS**

The influence of long-term culturing (12 days *in vitro*) of dorsal root ganglion (DRG) and dorsal horn (DH) neurons with peptide Semax on the level of synaptic activity at co-cultures, as well as short-term plasticity in sensory synapses were studied. It has been shown that neuronal culturing with peptide at concentrations of 10 and 100  $\mu\text{M}$  led to increasing the frequency of spontaneous glutamatergic postsynaptic currents in DH neurons to  $71.7 \pm 1.8\%$  and  $93.9 \pm 3.1\%$  ( $n=6$ ;  $P<0.001$ ). Semax has a not significant effect on the amplitude and frequency of miniature glutamatergic currents, but causes an increase of the amplitudes of spontaneous postsynaptic currents, as well as elevates the quantum content. The data show the increase of multivesicular glutamate release efficiency in neural networks of co-cultures following incubation with the peptide. Also Semax (10 and 100  $\mu\text{M}$ ) induces changes of the basic parameters of short-term plasticity in sensory synapses: (1) increasing the paired-pulse ratio from  $0.53 \pm 0.028$  ( $n=8$ ) to  $0.91 \pm 0.072$  ( $n=6$ ,  $P<0.01$ ) and  $0.95 \pm 0.026$  ( $n=7$ ;  $P<0.001$ ); (2) reducing the ratio of the coefficients of variation (CV2/CV1) from  $1.49 \pm 0.11$  ( $n=8$ ) to  $1.02 \pm 0.09$  ( $n=6$ ;  $P<0.05$ ) and  $1.11 \pm 0.13$  ( $n=7$ ;  $P<0.01$ ) respectively. The results indicate a stimulating effect of Semax on the activity of glutamatergic

synapses in neural networks of co-cultures, as well as the ability of the peptide to effectively modulate the short-term plasticity in sensory synapses.

Key words: dorsal root ganglion; dorsal horn of the spinal cord; glutamate; postsynaptic currents; synaptic activity; short-term plasticity; peptide Semax.

<sup>1</sup>*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

<sup>2</sup>*Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow, Russia*

## REFERENCES

1. Stavchansky VV, Yuzhakov VV, Botsina AY, Skvortsova VI, Bondurko LN, Tsyganova MG, Limborska SA, Myasoedov NF, Dergunova LV. The effect of Semax and its C-end peptide PGP on the morphology and proliferative activity of rat brain cells during experimental ischemia: a pilot study. *J Mol Neurosci.* 2011; 45(2):177-85.
2. Polunin GS, Makarov IA, Shirshikov IK, Makashova NV. The efficacy of the antioxidant preparation Histochrome in the treatment of hemophthalmos in hypertension and diabetes mellitus. *Vestn Oftalmol.* 2000; 116(2):19-20.
3. Kamkin AG, Kiseleva IS, Kositskiĭ GI. Role of ACTH fragments in regulating electrogenesis and electrotonic synaptic interaction of pond snail neurons. *Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova.* 1986; 72(7):908-20 [Russian].
4. Dmitrieva VG, Povarova OV, Skvortsova VI, Limborska SA, Myasoedov NF, Dergunova LV. Semax and Pro-Gly-Pro activate the transcription of neurotrophins and their receptor genes after cerebral ischemia. *Cell Mol Neurobiol.* 2010; 30(1):71-9.
5. Shadrina M, Kolomin T, Agapova T, Shram S, Slominsky P, Lymborska S, Myasoedov N. Comparison of the temporary dynamics of NGF and BDNF gene expression in rat hippocampus, frontal cortex, and retina under Semax action. *J Mol Neurosci.* 2010; 41(1):30-5.
6. Ivanova DM, Levitskaya NG, Andreeva LA, Kamenskii AA, Myasoedov NF. Comparative study of analgesic potency of ACTH4-10 fragment and its analog semax. *Bull Exp Biol Med.* 2007; 143(1):5-8.
7. Manchenko DM, Glazova NI, Levitskaia NG, Andreeva LA, Kamenskii AA, Miasoedov NF. Nootropic and analgesic effects of Semax following different routes of administration. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 2010; 96(10):1014-23 [Russian].
8. Shypshyna MS, Veselovsky MS. Characteristics of sensory neurotransmission in co-culture of neurons from the dorsal root ganglion and dorsal horn spinal cord in rats. *Fiziol Zh.* 2010; 56(4):26-36 [Ukrainian].
9. Gottmann K, Pfrieger FW, Lux HD. The formation of glutamatergic synapses in cultured central neurons: selective increase in miniature synaptic currents. *Brain Res Dev Brain Res.* 1994; 81(1):77-88.
10. Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B. Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *J. Physiol.* 1990; 430:213-249.
11. Shypshyna MS, Veselovsky MS. Properties of quantum release of glutamate and glycine in synapses between co-cultured primary afferent and spinal dorsal horn neurons. *Neurophysiology.* 2013; 45(2):103-108.
12. Shypshyna MS, Fedulova SA, Veselovsky NS. Induction of long-term depression of synaptic transmission in a co-culture of DRG and spinal dorsal horn neurons of rats. *Neurophysiology.* 2011; 43(4):261-270.
13. Wilcox KS, Dichter MA. Paired pulse depression in cultured hippocampal neurons is due to a presynaptic mechanism independent of GABA<sub>B</sub> autoreceptor activation. *J Neurosci.* 1994; 14(3): 1775-88.

*Матеріал надійшов до редакції 09.11.2014*