

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА «СЕЛАНК» НА УРОВЕНЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ И ТОНКОЙ КИШКЕ БЕЛЫХ КРЫС НА МОДЕЛИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

Марина Юрьевна ФЛЕЙШМАН, Иван Владимирович ТОЛСТЕНОК,
Алексей Андреевич ИННОКЕНТЬЕВ

Дальневосточный государственный медицинский университет Минздрава России
680000, г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, 35

Изучали влияние пептида «Селанк» на показатели окислительного стресса в ткани головного мозга и тонкой кишки белых крыс на фоне травматического стресса. **Материал и методы.** В качестве модели черепно-мозговой травмы (ЧМТ) была использована модель «ЧМТ в результате падения груза». В эксперименте формировали три группы: «контроль интактный» (введение изотонического раствора хлорида натрия), «контроль с травмой» (модель ЧМТ + введение изотонического раствора хлорида натрия), ««Селанк» с травмой» (модель ЧМТ + введение раствора пептида в дозе 0,1 мг/кг массы тела). Все растворы вводили внутривентрикулярно в объеме 0,5 мл в течение 5 дней, во 2-й и 3-й группе первая инъекция – через 3 ч после ЧМТ. Для оценки процессов свободно-радикального окисления в тканях животных применяли метод хемилюминесценции (ХЛ). Анализ проводили в гомогенатах свежего биоматериала, результаты, полученные в милливольтгах, рассчитывали на 1 грамм влажной ткани и представляли в относительных единицах. **Результаты.** Посттравматическое стрессорное воздействие в тканях головного мозга привело к интенсификации процессов свободно-радикального окисления. Наблюдалась гиперпродукция свободных радикалов, гидроперекисей липидов, увеличилась скорость образования перекисных радикалов. В гомогенатах тонкой кишки белых крыс стрессорное воздействие не вызвало достоверных изменений в значениях ХЛ. Введение пептида «Селанк» в дозе 0,1 мг/кг после травматического стресса привело к достоверному снижению показателей ХЛ в исследуемых тканях.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, глипролины, пептид «Селанк», хемилюминесценция, окислительный стресс.

В Российской Федерации черепно-мозговая травма (ЧМТ) составляет примерно 40 % от общего числа травматических состояний, является «одной из главных причин инвалидизации и смертности населения» [5, 6, 10, 21]. Вопрос о необходимости и эффективности нейропротективной терапии в острый период ЧМТ актуален [4]. ЧМТ нарушает деятельность мозга вследствие возникновения его первичных и вторичных повреждений. Некроз тканей мозга, повреждение нейронов и глиальных клеток, синаптические разрывы, разрывы и тромбоз сосудов относятся к первичным повреждениям, тяжесть которых зависит от локализации, силы и способа внешнего воздействия. В результате последующего каскада биохимических, воспалительных и иммунологических реакций и развития окислительного стресса возникают вторичные повреждения [16], выраженность которых во многом зависит от уровня оказания хирургической и медикамен-

тозной помощи [13, 19, 23]. От степени коррекции вторичных повреждений мозга впоследствии будет зависеть возвращение речевых навыков, разработка моторики, устранение проблем опорно-двигательного аппарата и болевого синдрома, коррекция психологического состояния. Профилактика уменьшения вторичных повреждений является главным резервом улучшения исходов лечения ЧМТ [14].

По некоторым данным [8], в первые часы после ЧМТ развивается биоэнергетическая гипоксия с последующим нарушением электрон-транспортной функции терминального участка дыхательной цепи [11] с развитием окислительного стресса [15]. Головной мозг имеет высокую предрасположенность к индукции активных форм кислорода и активации окислительного стресса вследствие высокого содержания фосфолипидов, катехинов, олеиновой кислоты, ионов Fe^{2+} , крайне низкого содержания глутатионпе-

Флейшман М.Ю. – д.м.н., доцент, главный научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории, e-mail: marfl@yandex.ru

Толстенок И.В. – к.б.н., доцент кафедры химии, e-mail: toiv@bk.ru

Иннокентьев А.А. – аспирант

роксидазы и почти полного отсутствия каталазы [12]. Окислительный стресс способствует росту заболеваемости и смертности после ЧМТ [9], его профилактика должна быть максимально ранней и максимально эффективной [3]. Для терапии в посттравматический период в настоящее время используются антигипоксанта, такие как «Мексидол» [3], ноотропные препараты, содержащие цитиколин («Рекогнан» и др.), холина альфосцерат («Глиатилин»), а также пептидные последовательности, относящиеся к глипролинсодержащим пептидам: так, Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro под торговым названием «Семакс 0,1 %» имеет в качестве показаний к применению состояния после ЧМТ. Достаточное количество комбинаций для синтеза новых пептидов в молекуле Pro-Gly-Pro определяет перспективы их применения как биологических регуляторов организма и дальнейшего поиска новых эффектов пептидов [1].

На основе тетрапептида тафцина (Thr-Lys-Pro-Arg) в Институте молекулярной генетики РАН синтезирован гептапептид пролонгированного действия «Селанк» (Trh-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro), обладающий ангиопротекторной, антидепрессивной и антиамнестической активностью, влияет на когнитивные функции мозга. «Селанк» способен регулировать синтез BDNF (нейротрофический фактор мозга) [7], который уменьшает тяжесть ишемии и ускоряет восстановление после ЧМТ [20]. Сведения о влиянии пептида «Селанк» на уровень окислительного стресса при ЧМТ отсутствуют.

Целью настоящего исследования было изучение влияния глипролинсодержащего пептида «Селанк» в дозе 0,1 мг/кг на процессы свободнорадикального окисления в гомогенатах тонкой кишки и головного мозга белых крыс на модели закрытой черепно-мозговой травмы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен на беспородных белых крысах-самцах массой 120–160 г. Животные приучались к рукам экспериментаторов в течение 11 дней в условиях вивария для исключения феномена «реакция на новизну обстановки». Животные содержались при температуре 18–20 °С, обычном 12-часовом световом режиме и свободном доступе к воде и пище. Всего в эксперименте использовали 25 животных. Места содержания животных и производственные помещения подвергались периодической санитарной обработке, не оказывающей влияния на результаты исследования. Животные всех экспериментальных групп находились в одинаковых условиях, водный и пищевой режим – *ad libitum*.

Эксперимент выполнен в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.), и приказом Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12 августа 1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

В качестве модели ЧМТ была использована модель «ЧМТ в результате падения груза». ЧМТ наносилась путем свободного падения груза на голову. Высота падения рассчитывалась в зависимости от веса животного. При данной модели ЧМТ выявляются различные повреждения мозга, от сотрясения головного мозга до очаговых ушибов, сопровождающихся вторичной гибелью нервных клеток на отдалении. Также отмечены нарушения когнитивной и двигательной функций.

В эксперименте формировали три группы: «контроль интактный» (введение изотонического раствора хлорида натрия), «контроль с травмой» (модель ЧМТ + введение изотонического раствора хлорида натрия), ««Селанк» с травмой» (модель ЧМТ + введение раствора пептида). В первый день эксперимента вторая и третья группы были подвергнуты смоделированной закрытой ЧМТ легкой степени тяжести. В последующие 5 дней животным третьей группы вводили «Селанк» (внутрибрюшинно в область пупартовой связки, в оптимальной для исследования эффектов препарата дозе 0,1 мг/кг массы тела, в объеме 0,5 мл). Крысы первой и второй групп получали эквивалентное количество 0,9%-го раствора натрия хлорида. На шестой день животные выводились из эксперимента путем декапитации. В качестве анестетика использовали хлороформ.

Для оценки процессов свободнорадикального окисления в тканях животных применяли метод хемилюминесценции (ХЛ). Анализ проводили в гомогенатах свежего биоматериала, результаты, полученные в милливольтгах, рассчитывали на 1 грамм влажной ткани и выражали в относительных единицах. ХЛ регистрировали на люминесцентном спектрометре LS 50B («PerkinElmer», Великобритания), сигнал стандартизировали с использованием встроенной программы «Finlab». Алгоритм метода включал определение следующих показателей [2]:

- Ssp – интенсивность генерации свободных радикалов (светосумма за 1 минуту спонтанной ХМЛ);
- h – содержание гидроперекисей липидов (максимум быстрой вспышки Fe²⁺-индуцированного свечения);

– Sind-1 – скорость образования перекисных радикалов (светосумма за 2 минуты после быстрой вспышки Fe²⁺-индуцированной ХМЛ);

– Slum – интенсивность продукции гидроксил-радикалов (светосумма за 1 минуту люминол-зависимой ХМЛ);

– Н – максимум H₂O₂-индуцированной люминол-зависимой ХМЛ;

– Sind-2 – светосумма за 2 минуты H₂O₂-индуцированной люминол-зависимой ХМЛ.

Величины Н и Sind-2 обратно коррелируют с перекисной резистентностью и активностью антирадикальной защиты соответственно.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (*M*), ошибку среднего арифметического значения (*m*), и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ данных ХЛ гомогенатов мозга белых крыс показал, что посттравматическое стрессорное воздействие в группе «контроль с травмой» привело к интенсификации процессов свободнорадикального окисления (таблица). Наблюдается гиперпродукция свободных радикалов (показатель Ssp увеличился в 2,18 раза), увеличение содержания гидроперекисей липидов (повышение показателя h в 6,02 раза) и скорости образования перекисных радикалов (повышение показателя Sind-1 в 4,34 раза). В то же время активация процессов свободнорадикального окисления сопровождается усилением антирадикальной защиты (показатель Sind-2 уменьшился в 4,8 раза) и увеличением резистентности к пере-

кисному окислению (величина Н уменьшилась в 1,6 раза). Снизилась интенсивность продукции гидроксил-радикалов (показатель Slum уменьшился в 3,27 раза). Введение пептида «Селанк» после травматического воздействия снизило выраженность посттравматического окислительного стресса: все исследуемые показатели ХЛ гомогенатов мозга белых крыс не отличались от показателей группы «Контроль интактный».

Анализ хемилюминограмм гомогенатов тонкой кишки белых крыс показал, что стрессорное воздействие (ЧМТ) не вызвало достоверных изменений в значениях ХЛ, кроме усиления перекисной резистентности (уменьшение показателя Н в 2,05 раза), по сравнению с группой «контроль интактный» (см. таблицу). Введение пептида «Селанк» в дозе 0,1 мг/кг после травматического стресса привело к существенному снижению показателей ХЛ по сравнению с группой «контроль с травмой»: интенсивность генерации свободных радикалов (Ssp), содержание гидроперекисей липидов (h) и скорость образования перекисных радикалов (Sind-1) уменьшились соответственно в 2,77, 2,84 и 3,08 раза. Наблюдали ослабление активности антирадикальной защиты и перекисной резистентности при введении «Селанка» (увеличение показателей Sind-2 и Н в 2,43 и 19,6 раза соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ

После травматического воздействия в ткани мозга наблюдали дисбаланс между активностью процессов генерации активных форм кислорода и антиоксидантной системы защиты. Введение пептида «Селанк» привело к уменьшению последствий окислительного стресса – показатели ХЛ не отличались от значений в группе «контроль

Таблица

Показатели ХЛ в гомогенатах мозга белых крыс

Показатель, отн. ед.	Гомогенаты мозга			Гомогенаты тонкой кишки		
	Контроль интактный (n = 8)	Контроль с травмой (n = 8)	«Селанк» с травмой (n = 8)	Контроль интактный (n = 8)	Контроль с травмой (n = 8)	«Селанк» с травмой (n = 8)
Ssp	0,50 ± 0,07	1,08 ± 0,23*	0,48 ± 0,14 [#]	0,50 ± 0,10	0,72 ± 0,17	0,26 ± 0,07 [#]
h	0,88 ± 0,04	5,30 ± 0,55*	0,86 ± 0,15 [#]	0,89 ± 0,10	1,25 ± 0,19	0,44 ± 0,08 [#]
Sind-1	1,31 ± 0,03	5,68 ± 0,80*	1,33 ± 0,31 [#]	1,36 ± 0,19	1,85 ± 0,39	0,60 ± 0,14 [#]
Slum	0,98 ± 0,15	0,30 ± 0,04*	1,02 ± 0,26 [#]	0,81 ± 0,14	0,78 ± 0,24	0,78 ± 0,09
Н	4,63 ± 0,91	2,78 ± 1,48	7,13 ± 1,46	3,97 ± 0,65	1,94 ± 0,51*	38,01 ± 8,52* [#]
Sind-2	4,37 ± 0,32	0,91 ± 0,05*	5,27 ± 0,55 [#]	2,92 ± 0,32	2,96 ± 1,01	7,18 ± 0,99* [#]

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – группы «контроль интактный», # – группы «контроль с травмой».

интактный» (см. таблицу). В ходе эксперимента мы не наблюдали достоверных изменений основных показателей ХЛ в ткани тонкого кишечника. Исключением стал уровень перекисной резистентности, который увеличивался после нанесения ЧМТ и скачкообразно, почти в 10 раз, уменьшился после введения пептида «Селанк» (см. таблицу). Это свидетельствует о резком снижении активности антиоксидантной антирадикальной системы защиты. Таким образом, при сравнении состояния процессов свободнорадикального окисления в тканях мозга и тонкого кишечника на модели ЧМТ отмечаем более выраженные изменения показателей ХЛ ткани мозга.

Снижение антиоксидантной антирадикальной защиты (Sind-2) и увеличение способности биологического объекта к перекисному окислению (Н) отмечались во всех исследуемых тканях в группах «Селанк» с травмой». Возможно, это связано с повышенной продукцией оксида азота (NO). Рост генерации NO может вызывать нейротоксичность и гибель нейронов [9]. В концентрации около 1 мкМ оксид азота способен нитрозировать критические белки, такие как поли(АДФ-рибоза)полимеразы (poly(ADP-ribose) polymerases, PARP) [24] – ферменты, катализирующие перенос остатков АДФ-рибозила от NAD⁺ для дальнейшего образования связываемой с белком поли-АДФ-рибозильной цепи, которая составляет основу для восстановления структуры ДНК. Избыточная активность белков семейства PARP истощает запасы АТФ и в последующем приводит к нарушению функционирования митохондрий [22]. Аналогичные результаты получены в проведенных нами ранее исследованиях: при введении крысам аргининсодержащих пептидов Arg-Gly-Pro и Pro-Arg-Pro-Gly-Pro в дозировке 1 мг/кг наблюдалось увеличение значения Sind-2 [17, 18], последний входит в состав исследуемого нами пептида «Селанк». Возможная причина снижения антирадикальной защиты и увеличения интенсивности процессов свободнорадикального окисления в тканях тонкого кишечника – гиперпродукция оксида азота, образующегося из аргинина. После ЧМТ в исследуемых тканях (мозг, тонкий кишечник) пептид «Селанк» в дозе 0,1 мг/кг снижал интенсивность свободнорадикальных процессов, содержание гидроперекисей липидов, скорость образования перекисных радикалов липидной природы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На модели закрытой ЧМТ выявлены антиоксидантные свойства пептида «Селанк», более выраженные в отношении тканей головного мозга.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Структурно-функциональные исследования пептидов – основа создания новых лекарственных препаратов // Эксперим. и клин. фармакология. 2015. 78. (Прил.). 6.
2. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И., Козлов А.В., Осипов А.Н., Рошупкин Д.И. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. 1992. 29. 3–250.
3. Говорова Н.В. Окислительный стресс и его медикаментозная коррекция мексидолом при черепно-мозговой травме // Неотлож. мед. помощь. 2013. (2). 36–40.
4. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. М.: Медицина, 2000. 328 с.
5. Даминов В.Д., Германович В.В. Применение глиатилина в комплексном лечении больных, перенесших черепно-мозговую травму // Новости медицины и фармации. 2013. (438). 9–12.
6. Дерюгина А.В., Шумилова А.В. Влияние цитофлавина на окислительный стресс и активность Na/K-АТФазы эритроцитов после черепно-мозговой травмы // Журн. неврологии и психиатрии. 2017. (11). 51–55.
7. Иноземцева Л.С., Карпенко Е.А., Долотов О.В., Левицкая Н.Г., Каменский А.А., Андреева Л.А., Гривенников И.А. Пептид «Селанк» регулирует экспрессию BDNF в гиппокампе крысы *in vivo* при интраназальном введении // Докл. АН. 2008. 421. (6). 842–844.
8. Кармен Н.Б. К механизму нейропротекторного действия клонидина // Анестезиология и реаниматология. 2005. (3). 53–57.
9. Клычникова Е.В., Тазина Е.В., Кордонский А.Ю., Трифонов И.С., Годков М.А., Крылов В.В. Динамика показателей окислительного стресса, уровня оксида азота и глюкозы у пострадавших с черепно-мозговой травмой средней степени тяжести // Нейрохимия. 2014. 31. (2). 164–170.
10. Коновалов А.Н., Лихтерман Л.Б., Потанов А.А. Клиническое руководство по черепно-мозговой травме в трех томах: том II. М.: Антидор, 1998. 675 с.
11. Лукьянова Л.Д. Роль биоэнергетических нарушений в патогенезе гипоксии // Патол. физиология и эксперим. терапия. 2004. (2). 2–11.
12. Львовская Е.И., Садова В.А., Сумная Д.Б., Держинский Н.В. Состояние процессов липидной перекисидации в острый период тяжелой черепно-мозговой травмы // Человек. Спорт. Медицина. 2010. (6). 82–84.

13. Потапов А.А., Крылов В.В., Гаврилов А.Г., Кравчук А.Д., Лихтерман Л.Б., Петриков С.С., Талыпов А.Э., Захарова Н.Е., Ошоров А.В., Солодов А.А. Рекомендации по диагностике и лечению тяжелой черепно-мозговой травмы. Часть 1. Организация медицинской помощи и диагностика // *Вопр. нейрохирургии*. 2015. 79. (6). 100–106.
14. Пурас Ю.В., Талыпов А.Э., Крылов В.В. Декompрессивная трепанация черепа в раннем периоде тяжелой черепно-мозговой травмы // *Нейрохирургия*. 2011. (3). 19–26.
15. Русаков В.В., Долгих В.Т., Чесноков В.И., Солодников Н.Н. Роль окислительного стресса в формировании кардиодепрессии при тяжелой изолированной черепно-мозговой травме (экспериментальное исследование) // *Общ. реаниматология*. 2009. 5. (1). 48–53.
16. Талыпов А.Э., Мятчин М.Ю., Куксова Н.С., Иоффе Ю.С., Кордонский А.Ю. Медикаментозная нейропротекция в остром периоде черепно-мозговой травмы средней степени тяжести // *Мед. совет*. 2015. (10). 82–92.
17. Толстенок И.В., Брагина В.В., Флейшман М.Ю. Влияние глипролина (PGP) и его аргининсодержащего аналога (RGP) на процессы язвообразования в слизистой оболочке желудка белых мышей на модели НПВП-гастропатии // *Дальневост. мед. журн*. 2016. (4). 74–77.
18. Толстенок И.В., Лебедько О.А., Андреева Л.А., Иннокентьев А.А., Флейшман М.Ю. Влияние аргининсодержащего глипролина PRPGP на синтез ДНК и свободнорадикальное окисление в слизистой оболочке желудка белых мышей на модели индометацин-индуцируемого язвообразования // *Тихоокеан. мед. журн*. 2017. (3). 50–53.
19. Adams J.H., Graham D.I. An introduction to neuropathology. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994. 309 p.
20. Almeida R.D., Manadas B.J., Melo C.V., Gomes J.R., Mendes C.S., Graos M.M., Carvalho A.P., Duarte C.B. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways // *Cell Death Differ*. 2005. 12. 1329–1343.
21. Khalili H., Niakan A., Ghaffarpasand F. Effects of cerebrolysin on functional recovery in patients with severe disability after traumatic brain injury: A historical cohort study // *Clin. Neurol. Neurosurg*. 2017. 152. 34–38.
22. Piskunova T.S., Yurova M.N., Ovsyannikov A.I., Semenchenko A.V., Zabezhinski M.A., Popovich I.G., Wang Z.Q., Anisimov V.N. Deficiency in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) accelerates aging and spontaneous carcinogenesis in mice // *Curr. Gerontol. Geriatr. Res*. 2008. 11. 11.
23. Saatman K.E., Duhaime A.C., Bullock R., Maas A.I., Valadka A., Manley G.T. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies // *J. Neurotrauma*. 2008. 25. 719–738.
24. Thomas D.D., Ridnour L.A., Isenberg J.S., Flores-Santana W., Switzer C.H., Donzelli S., Hussain P., Vecoli C., Paolocci N., Ambs S., Colton C.A., Harris C.C., Robert D.D., Wink D.A. The chemical biology of nitric oxide: implication in cellular signaling // *Free Radic. Biol. Med*. 2008. 45. 18–31.

EFFECTS OF PEPTIDE SELANK ON OXIDATIVE STRESS IN THE BRAIN AND THIN INTESTINE OF WHITE RATS ON EXPERIMENTAL MODEL OF TRAUMATIC BRAIN INJURY

Marina Yurievna FLEYSHMAN, Ivan Vladimirovich TOLSTENOK,
Aleksey Andreevich INNOKENT'EV

Far-Eastern State Medical University of Minzdrav of Russia

Effects of glyproline-containing peptide Selank on oxidative stress parameters in the brain and thin intestine were studied. **Material and methods.** Traumatic brain injury (TBI) was induced in rats by a shock model (weight drop method). Three groups were formed: «Intact control» (injection of sodium chloride isotonic solution), «control with TBI» (TBI model + injection of sodium chloride isotonic solution), «“Selank” with TBI» (TBI model + injection of peptide solution at a dose of 0.1 mg/kg body weight). All solutions were administered intraperitoneally in a volume of 0.5 ml for 5 days, in groups 2 and 3 the first injection was introduced in 3 hours after TBI. The evaluation of free radical oxidation processes in animal tissues was performed by chemiluminescence method. Analysis was performed in homogenates of fresh biomaterial, the results, obtained in millivolts, were calculated per 1 gram of wet tissue and were presented in relative units. **Results.** Post-traumatic effects in brain tissue have led to the intensification of free radical oxidation processes. Hyperproduction of free radicals, lipid hydroperoxides was observed, the rate of peroxide radical formation increased. In homogenates of white rat small intestine the stress effect did not cause a change in chemiluminescence parameters. Peptide «Selank» administration at a dose of 0.1 mg/kg after traumatic stress led to a significant decrease in all chemiluminescence indices in the tissues.

Key words: traumatic brain injury, glyprolines, peptide «Selank», chemiluminescence, oxidative stress.

*Fleyshman M. Yu. – doctor of medical sciences, chief researcher of the central research laboratory,
e-mail: marfl@yandex.ru*

*Tolstenok I. V. – candidate of biological sciences, associate professor of the department of chemistry,
e-mail: toiv@bk.ru*

Innokent'ev A. A. – postgraduate student