

Сравнение эффектов трех глипролинов при пятидневном внутрибрюшинном введении

А.А. Колесникова, М.Ю. Флейшман, Ю.Б. Малофей, И.В. Толстенко, Н.В. Дузенко, А.А. Сальников

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

Резюме

На сегодняшний день зарегистрировано около 70 препаратов на основе регуляторных пептидов, в том числе пролинсодержащих, таких как ноотропы семакс и селанк. Актуально дальнейшее изучение свойств глипролиновых пептидных последовательностей с целью описания их нейропротекторных свойств и возможной разработки новых лекарственных средств на их основе. Цель исследования – сравнить эффекты влияния трех пептидов глипролинового ряда на морфометрические характеристики и пролиферативную активность клеток головного мозга белых крыс. **Материал и методы.** Половозрелым самцам крыс Вистар в течение 5 дней внутрибрюшинно вводили пептиды Thy-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (TKPRPGP), Arg-Pro-Gly-Pro (RPGP) и Pro-Gly-Pro-Leu (PGPL) в дозе 0,1 мг/кг. Контролем служили интактные животные и получавшие 0,9%-й раствор NaCl эквивалентно. На препаратах правого полушария мозга после окраски гематоксилином и эозином проводили морфоцитометрию. Оценивали размерные (площадь тел, ядер и ядрышек) и числовые (количество ядрышек) характеристики клеток. Рассматривали параметры нейронов и глиоцитов в пяти локализациях (II и V слой передне-теменной доли, II и V слой собственно теменной доли, поле CA1 гиппокампа). Применяя иммуногистохимическое окрашивание, определяли интенсивность пролиферации (маркер Ki-67, клон MIB1). **Результаты.** Пептид TKPRPGP в большей степени, чем RPGP и PGPL, изменял морфометрические показатели клеток нервной ткани и индекс пролиферации глиоцитов. В нашем эксперименте на пролиферативную активность нейронов максимально влияет глипролин PGPL. Аргининсодержащее соединение RPGP активирует пролиферативную активность глиоцитов. Лейцинсодержащее PGPL в большей степени изменяет морфометрические показатели нейронов. **Заключение.** Оба изученных тетрапептида влияют на морфометрические характеристики и пролиферативную активность клеток нервной ткани при пятикратном внутрибрюшинном введении в дозе 0,1 мг/кг. При сравнении глипролинов более выраженный эффект наблюдали после введения PGPL.

Ключевые слова: глипролины, пептиды, Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro, Arg-Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Leu.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность начальнику лаборатории молекулярной фармакологии пептидов ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт» академику РАН Н.Ф. Мясоедову.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № 124022900081-9.

Автор для переписки: Флейшман М.Ю., e-mail: marfl@yandex.ru

Для цитирования: Колесникова А.А., Флейшман М.Ю., Малофей Ю.Б., Толстенко И.В., Дузенко Н.В., Сальников А.А. Сравнение эффектов трех глипролинов при пятидневном внутрибрюшинном введении. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2024;44(6):105–113. doi: 10.18699/SSMJ20240610

Comparison of the effects of three glyprolines after five days of intraperitoneal administration

A.A. Kolesnikova, M.Yu. Fleishman, Yu.B. Malofey, I.V. Tolstenok, N.V. Duzenko, A.A. Salmikov

Far Eastern State Medical University of Minzdrav of Russia
680000, Khabarovsk, Murav'yeva-Amurskogo st., 35

Abstract

To date, about 70 drugs based on regulatory peptides have been registered, including proline-containing ones, such as the nootropics Semax and Selank. Further study of the properties of glyproline peptide sequences is relevant in order to describe their neuroprotective properties and the possible development of new drugs based on them. The purpose of the study was to compare the effects of three glyproline peptides on the morphometric characteristics and proliferative activity of brain cells in albino rats. **Material and methods.** Sexually mature Wistar male rats were intraperitoneally injected with the peptides Thy-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (TKPRPGP), Arg-Pro-Gly-Pro (RPGP) and Pro-Gly-Pro-Leu (PGPL) at a dose of 0.1 mg/kg for 5 days. The intact animals that received 0.9 % sodium chloride solution in equivalent volume served as controls. Morphocytometry was performed on preparations of the right hemisphere of the brain after staining with hematoxylin and eosin. The dimensional (area of bodies, nuclei, and nucleoli) and numerical (number of nucleoli) characteristics of cells were assessed. We examined the parameters of neurons and gliocytes in five localizations (the second and fifth layers of the anterior parietal lobe, the second and fifth layers of the parietal lobe, field CA1 of the hippocampus). Using immunohistochemical staining, the proliferation intensity was determined (marker Ki-67, clone MIB1). **Results.** The TKPRPGP peptide changed the morphometric parameters of nervous tissue cells and the gliocyte proliferation index to a greater extent than RPGP and PGPL. In our experiment, the proliferative activity of neurons is maximally influenced by glyproline PGPL. The arginine-containing compound RPGP activates the proliferative activity of gliocytes. Leucine-containing PGPL, to a greater extent, changes the morphometric parameters of neurons. **Conclusions.** Both studied tetrapeptides affect the morphometric characteristics and proliferative activity of nervous tissue cells when administered five times intraperitoneally at a dose of 0.1 mg/kg. When comparing glyprolines, a more pronounced effect was observed after the administration of PGPL.

Key words: glyprolines, peptides, Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro, Arg-Pro-Gly-Pro, Arg-Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Leu.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. The authors express their gratitude to the head of the laboratory of molecular pharmacology of peptides of the Federal State Budgetary Institution National Research Center “Kurchatov Institute”, academician of RAS N.F. Myasoedov.

Financing. The work was carried out within the framework of state assignment No. 124022900081-9.

Correspondence author: Fleishman M.Yu., e-mail: marfl@yandex.ru

Citation: Kolesnikova A.A., Fleishman M.Yu., Malofey Yu.B., Tolstenok I.V., Duzenko N.V., Salnikov A.A. Comparison of the effects of three glyprolines after five days of intraperitoneal administration. *Sibirskij nauchnyj medicinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2024;44(6):105–113. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20240610

Введение

Регуляторные пептиды, содержащие аминокислотную последовательность Pro-Gly-Pro, или глипролины, имеют множество биологических эффектов, в том числе и в отношении тканей головного мозга. Особенностью этих соединений является каскадный механизм действия, что позволяет рассчитывать на долговременный эффект даже при краткосрочном введении [1, 2]. Влияние регуляторных пептидов на регенеративные свойства и морфологические параметры тканей организма является предметом постоянного изучения. На сегодняшний день в мире зарегистрировано около 70 препаратов на их основе, 14 зарегистрировано в России [3]. Регуляторные глипролины поступают в организм из эндогенных и экзогенных источников. Большинство пролинсодержащих пептидов образуется в результате деградации коллагена или поступающих с пищей белков. Короткие олигопептиды с большим содержанием пролина получают также при деградации инсулинподобного фактора роста-1 (IGF-1). Продолжается изучение молекулярных механизмов

биологических эффектов глипролинов, предполагают рецепторно-опосредованные механизмы. Например, N-ацетилированный Pro-Gly-Pro (PGP) действует как лиганд рецепторов хемокинов CXCR1/2, взаимодействует с коллаген-специфическими рецепторами, а циклический глипролин контролирует биодоступность IGF-1, изменяя его связывание с протеином-3 [4, 5].

Данные литературы свидетельствуют о перспективности изучения как механизмов действия глипролинов, так и регулирования их уровня в организме и поиска мишеней для терапии заболеваний, зависимых от метаболизма пролинсодержащих пептидов [4]. Рассматривая фрагментацию белков внеклеточного матрикса и производство пептидных цитокинов (матрикинов), исследователи отмечают их способность к ремоделированию окружающих структур, повреждение которых усиливается с возрастом и при болезнях. N-ацетилированный PGP может оказывать противоположные эффекты на пролиферацию различных типов клеток, на заживление и процесс неоваскуляризации посредством CXCR2-зависимого

механизма, отмечается необходимость дальнейших хорошо спланированных мультимодальных исследований [5].

Глипролины обладают нейротропной и иммуномодулирующей активностью, реализуемой различными биохимическими путями. Ткани мозга характеризуются как высокочувствительные к стрессорным воздействиям различного генеза. Они отличаются высокой скоростью метаболизма и низкой скоростью регенерации [6, 7]. Эксперименты *in vitro* на клетках нейробластомы линии SH-SY5Y показали, что нейропротекторные свойства глипролинов, замещенных по N-концу, проявляют только соединения, потенциально способные метаболизироваться в биологических средах до циклопролилглицина. Этот аналог эндогенного пептида по фармакологической активности подобен пираретаму – оказывает положительное модулирующее действие на глутаматные AMPA-рецепторы и усиливает синтез нейротрофина BDNF [8]. Создатели пептидных препаратов отмечают, что пептиды могут иметь сложные и нелинейные корреляции между своей структурой и нейропротекторными свойствами. Наличие остатка RGP повышает метаболическую резистентность олигопептидов. Представляют интерес челночные пептиды, являющиеся переносчиками биологически активных молекул через гематоэнцефалический барьер. Комплексы интернализуемых пептидов и белков (например, с супероксиддисмутазой) обеспечивают эффективное проникновение фермента в целевой участок клетки, тем самым усиливая терапевтическое действие. Считается перспективным и синтез пептидов, образующихся путем слияния нескольких молекул с разными свойствами или имитирующих природные регуляторные вещества и гормоны [9]. Оценка интенсивности пролиферации и синтеза белка в нейронах и нейроглии животных, получавших различные пролинсодержащие пептиды, является продолжением работы по изучению эффектов потенциальных ноотропов.

Цель исследования – сравнить эффекты влияния глипролинов на морфометрические характеристики и пролиферативную активность клеток головного мозга белых крыс после пятидневного введения трех пептидов глипролинового ряда в дозе 0,1 мг/кг.

Материал и методы

Исследовали головной мозг половозрелых самцов Вистар (60 животных). Дизайн планировали в соответствии с требованиями Приказа № 199 МЗ РФ от 01.04.2016 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и

Директивы Европейского союза по защите животных, используемых в научных целях (2010/63/EU). При содержании крыс и выведении их из эксперимента руководствовались законом «О защите животных от жестокого обращения» (гл. V, ст. 104679-ГД от 01.12.1999). Протокол исследования утвержден на заседании этического комитета при ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 2 от 05.02.2019). В работе использовали пептиды Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (TKPRPGP), Arg-Pro-Gly-Pro (RPGP) и Pro-Gly-Pro-Leu (PGPL). Для проведения эксперимента формировали пять групп: «Интактные» ($n = 10$) – интактные животные; «NaCl» ($n = 20$) – крысы, получавшие в течение пяти дней внутрибрюшинные инъекции 0,9%-го раствора NaCl, «TKPRPGP» ($n = 10$), «RPGP» ($n = 10$) и «PGPL» ($n = 10$) – животные, получавшие в течение пяти дней внутрибрюшинные инъекции соответствующих пептидов в дозе 0,1 мг/кг, растворенных в 0,9%-м растворе NaCl.

Животных выводили из эксперимента на 6-е сутки путем быстрой декапитации под ингаляционным наркозом парами хлороформа. Правое полушарие мозга фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде, подвергали стандартной гистологической обработке [10], после чего изготавливали парафиновые срезы толщиной 7 мкм для окраски гематоксилином и эозином и последующего морфометрического исследования, а также срезы толщиной 3 мкм для иммуногистохимического окрашивания. Исследовали окрашенные гематоксилином и эозином препараты. Количество клеток в поле зрения подсчитывали визуально на увеличении $\times 1000$. Размерные характеристики клеток и органелл определяли при увеличении $\times 400$ с использованием программного обеспечения Флуденситоморфометрия (МЕКОС-ФДММ) «Мекос-Ц1» ООО «Медицинские компьютерные системы (МЕКОС)». Для определения морфометрических характеристик оценивали 25 клеток в каждой локализации. Для этого в пяти локализациях (II и V слои переднетеменной доли (ПТД), II и V слои собственно теменной доли (СТД), поле CA1 гиппокампа) оценивали размерные (площадь тел, ядер и ядрышек) и числовые (количество ядрышек) характеристики.

Указанные локации головного мозга были выбраны с учетом того, что вещества тестируются как потенциальные ноотропы. Слой V состоит из пирамидных клеток, аксоны которых составляют пирамидную систему (дающие ей начало пирамидные клетки находятся в предцентральной извилине), а верхние слои (I и II) относятся к ассоциативным путям коры. Гиппокамп – это от-

дел старой коры, который считается важным звеном связи с новой корой, обеспечивающим такие функции мозга, как внимание и память. Информация из различных регионов неокортекса поступает в гиппокамп, перерабатывается и возвращается в новую кору. Афферентные и эфферентные связи гиппокампа формируют циклические системы, в пределах которых происходит переработка информации. Афферентная связь представлена лимбическим кругом, который начинается от поля CA1. Лобная область коры большого мозга человека играет важную роль в организации и регуляции процессов, лежащих в основе сложных форм поведения и высших познавательных функций. Для иммуногистохимического окрашивания использовали набор Novolink TM Polymer Detection System (Leica Biosystems, США) в соответствии с протоколом производителя. На световом микроскопе «Микмед-6» АО «ЛМО», Россия ($\times 1000$, не менее 500 клеток в каждой локализации) подсчитывали меченые ядра (маркер Ki-67, клон MIB1), имеющие коричневое окрашивание, и определяли их процент среди немеченых. Одновременно подсчитывали количество нейронов и клеток глии в поле зрения.

Поскольку применение критерия Шапиро – Уилка показало, что распределение признаков отличалось от нормального, рассчитывали медиану и межквартильный интервал (Ме [Q1; Q3]). Различия между группами оценивали по критерию Вальда – Вольфовица и считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [11–13].

Результаты и их обсуждение

Показатели морфометрии клеток нервной ткани половозрелых самцов крыс Вистар в пяти локализациях представлены в табл. 1. В группе «TKPRPGP» по сравнению с группой «NaCl» статистически значимо уменьшалась площадь тел нейронов (II и V слои ПТД) и ядер (II и V слои ПТД и II слой СТД), увеличивалась суммарная площадь ядрышек (V слой СТД, поле CA1 гиппокампа), количество нейронов в поле зрения (II слой ПТД, V слой СТД и поле CA1 гиппокампа) и глиоцитов (II слой ПТД, II и V слои СТД, поле CA1 гиппокампа). Все эти изменения свидетельствуют о приближении изучаемых параметров к показателям в группе интактных животных по сравнению с показателями в группе с введением 0,9%-го раствора NaCl, т. е. о нивелировании глипролином TKPRPGP стрессорного эффекта процедуры внутрибрюшинного введения. В группе «RPGP» по сравнению с группой «NaCl» выявлено достоверное уменьшение площади ядер нейронов (V слой ПТД, II слой СТД), как сниже-

ние (V слой СТД и поле CA1 гиппокампа), так и увеличение количества нейронов в поле зрения (II и V слои ПТД), возрастание количества ядрышек (II и V слои ПТД, II слой СТД и поле CA1 гиппокампа). Введение пептида RPGP также приближало морфометрические показатели к показателям интактной группы по сравнению с группой «NaCl», в более глубоких слоях эффект выражен меньше.

У животных группы «RPGP» по сравнению с крысами группы «TKPRPGP» были статистически значимо больше площадь тел нейронов (II слой ПТД, V слой СТД) и количество ядрышек (II слой ПТД, II слой СТД и поле CA1 гиппокампа), меньше – суммарная площадь ядрышек (II слой ПТД, II СТД и поле CA1 гиппокампа), количество нейронов в поле зрения (V слой ПТД, V слой СТД и поле CA1 гиппокампа) и количество глиальных клеток в поле зрения (II и V слои СТД, поле CA1 гиппокампа). Перечисленные изменения указывают на возможное увеличение клеточного отека и уменьшение белоксинтетической активности клеток и их плотности. В группе «PGPL» по сравнению с группой «NaCl» достоверно больше количество нейронов (II и V слои ПТД) и клеток глии (II слой ПТД, II и V слои СТД) в поле зрения, т. е. показатели после введения пептида ближе к показателям в группе «Интактные».

Результаты, отражающие уровень пролиферативной активности клеток нервной ткани (доля клеток с наличием белка Ki-67), представлены в табл. 2. Нейроны являются медленно пролиферирующими клетками, размножение которых связано с определенными областями мозга с последующей миграцией [13], поэтому в некоторых группах метки были единичными либо отсутствовали, что в некоторых случаях обуславливало большую статистическую ошибку. Однонаправленные статистически значимые различия наблюдали между группами «PGPL» и «NaCl», в этом случае доля меченых нейронов больше в группе, получавшей пептид (V слой СТД и поле CA1 гиппокампа), также в данной группе доля меток была больше, чем в группе «TKPRPGP» (V слой ПТД и поле CA1 гиппокампа), что может указывать на нивелирование стрессового воздействия в обоих случаях. В группе «TKPRPGP» индекс пролиферации клеток глии достоверно больше, чем в группе «NaCl» (V слой ПТД), что свидетельствует о протективном эффекте пептида. Введение раствора аминокислотной последовательности RPGP привело к уменьшению пролиферативной активности глиоцитов по сравнению с показателями в группе «NaCl» (V слой СТД и поле CA1 гиппокампа) и в группе «TKPRPGP» (V слой ПТД, V слой СТД); назначение TKPRPGP

Таблица 1. Показатели морфометрии клеток нервной ткани самцов крыс Вистар в пяти локализациях

Table 1. Morphometric indices of nervous tissue cells of mature male Wistar rats in five localizations

Объект морфометрии	Интактные	NaCl	TKPRPGP	RPGP	PGPL
1	2	3	4	5	6
Площадь тел, ядер и ядрышек нейронов во II и V слоях ПТД, мкм ²					
Нейроны II слоя	97,60 [91,96-100,08]	142,69 [92,88; 149,96] **	100,90 [97,67; 104,42] ##	117,52 [108,06; 127,26] **.#	91,46 [88,48; 95,08] ^^
Нейроны V слоя	177,65 [160,80; 195,52]	221,32 [192,37; 243,89]	160,55 [136,87; 176,37] ##	171,31 [149,85; 217,74]	196,75 [120,96; 211,46] ##,^^
Ядра нейронов II слоя	54,22 [50,77; 60,39]	71,65 [52,22; 81,77]	56,60 [54,91; 62,26] ##	48,83 [40,64; 55,85]	53,56 [52,88; 55,34]
Ядра нейронов V слоя	95,80 [78,31; 106,45]	119,55 [100,80; 125,36]	80,84 [72,06; 89,64] ##	64,55 [58,98; 85,33] ##	106,86 [65,94; 113,36] ^^,†
Ядрышки нейронов II слоя	3,44 [3,21; 3,59]	3,96 [3,52; 4,34]	4,62 [4,06; 5,24]	3,66 [3,09; 3,92] ^^	4,16 [3,73; 4,35] ^^
Ядрышки нейронов V слоя	5,70 [4,30; 6,30]	6,15 [5,72; 6,69]	6,16 [5,69; 6,32]	5,01 [4,19; 5,87]	6,26 [3,98; 6,94]
Количество нейронов, ядрышек в нейроне и глиоцитов во II и V слоях ПТД					
Нейроны II слоя	16,15 [14,75; 20,21]	14,25 [14,12; 14,75] *	20,05 [17,60; 24,9] ##	21,30 [21,00; 21,4] ##,^^	23,06 [22,00; 24,10] ##,^^,††
Нейроны V слоя	28,90 [22,35; 35,94]	25,50 [25,50; 25,70] **	23,90 [22,99; 29,50] ##	22,80 [22,50; 23,00] ##,^^	27,95 [27,90; 28,12] ##,^^,†
Ядрышки, II слоя	1,29 [1,22; 1,43]	1,04 [1,00; 1,11] **	1,04 [1,04; 1,12]	1,36 [1,17; 1,49] ##,^^	1,00 [1,00; 1,00] ^,††
Ядрышки V слоя	1,16 [1,09; 1,23]	1,03 [1,00; 1,08]	1,08 [1,04; 1,18]	1,19 [1,09; 1,53] ##	1,00 [1,00; 1,00] #.^^,††
Глиоциты II слоя	22,50 [21,25; 27,45]	19,10 [18,72; 19,70] **	22,93 [20,49; 25,29] ##	20,60 [20,40; 20,80] ##	22,60 [22,50; 23,50] ##,^^,††
Глиоциты V слоя	7,60 [7,12; 8,58]	9,40 [9,00; 9,50] **	9,15 [7,45; 9,52] ##	7,10 [7,00; 7,10] ##	8,25 [7,80; 8,72] ##,^^,††
Площадь тел, ядер и ядрышек нейронов во II и V слоях СТД, мкм ²					
Нейроны II слоя	97,97 [97,27; 102,46]	118,00 [93,43; 125,08]	100,65 [96,41; 107,32]	106,48 [100,69; 116,58]	91,68 [88,02; 96,32] †
Нейроны V слоя	173,96 [168,27; 183,84]	203,04 [184,89; 222,57]	157,51 [145,72; 168,93]	211,47 [179,75; 222,13] ^	177,72 [163,77; 184,08]
Ядра нейронов II слоя	54,09 [46,67; 59,55]	66,74 [53,87; 74,18]	56,96 [54,87; 59,75] ##	33,61 [33,58; 50,62] ##,^^	51,05 [49,70; 57,73]
Ядра нейронов V слоя	92,51 [82,72; 99,15]	110,37 [98,91; 121,92]	87,02 [77,37; 94,88]	65,99 [57,49; 87,92]	96,56 [93,84; 103,55] †
Ядрышки нейронов II слоя	3,09 [2,85; 3,72]	3,88 [3,16; 4,19]	4,70 [4,21; 5,25]	3,45 [2,87; 4,23]^	3,95 [3,68; 4,28]

1	2	3	4	5	6
Ядрышки нейронов V слоя	5,40 [4,40; 6,07]	5,65 [5,28; 5,99]	6,15 [5,48; 6,48]	6,02 [4,59; 6,29]	5,91 [5,14; 6,91]
Количество нейронов, ядрышек в нейроне и глиоцитов во II и V слоях СТД					
Нейроны II слоя	18,00 [17,56; 19,08]	20,90 [20,80; 21,00]**	27,50 [27,00; 28,07]##	19,60 [19,37; 19,77]##,^^	22,20 [21,12; 23,10]##,^^,†
Нейроны V слоя	8,10 [7,18; 9,51]	8,25 [7,85; 8,72]**	10,30 [7,92; 12,62]##	5,15 [5,08; 5,25]##,^^	5,00 [6,00; 7,50]##,^^,††
Ядрышки II слоя	1,28 [1,14; 1,43]	1,08 [1,04; 1,20]**	1,08 [1,04; 1,15]	1,40 [1,34; 1,49]##,^	1,00 [1,00; 1,04]
Ядрышки V слоя	1,20 [1,14; 1,43]	1,01 [1,00; 1,07]**	1,08 [1,04; 1,15]	1,30 [1,09; 1,39]	1,00 [1,00; 1,00]†
Глиоциты II слоя	22,00 [20,25; 26,05]	19,20 [19,00; 19,50]**	26,30 [24,10; 27,87]##	23,30 [23,15; 23,45]##,^^	22,60 [22,52; 22,67]##,^^,††
Глиоциты V слоя	30,90 [24,35; 33,86]	24,50 [23,35; 25,55]**	30,36 [29,10; 33,19]##	26,20 [25,75; 26,50]##,^^	25,50 [25,00; 26,60]##,^^
Площадь тел, ядер и ядрышек нейронов в поле CA1 гиппокампа, мкм ²					
Нейроны	109,31 [91,39; 114,63]	113,43 [107,94; 171,61]**	111,53 [103,73; 122,96]	105,30 [102,47; 115,53]##,^^	102,33 [96,02; 117,83]##,††
Ядра нейронов	68,55 [52,37; 73,12]	71,78 [63,49; 103,09]	66,18 [63,34; 78,30]	66,08 [43,71; 69,98]	62,30 [60,39; 70,15]†
Ядрышки нейронов	3,64 [2,67; 4,30]	4,22 [3,61; 5,14]**	5,90 [5,45; 6,99]	4,09 [3,48; 4,41]##,^^	4,74 [4,17; 4,87]##,^
Количество нейронов, ядрышек в нейроне и глиоцитов в поле CA1 гиппокампа					
Нейроны	26,90 [24,81; 27,25]	26,50 [25,85; 27,72]	35,80 [30,37; 50,20]##	21,30 [21,00; 22,50]^^	22,50 [22,00; 23,50]^^
Ядрышки нейронов	1,35 [1,26; 1,55]	1,12 [1,04; 1,20]	1,16 [1,16; 1,29]	1,63 [1,36; 1,67]##,^^	1,00 [1,00; 1,03]^^,††
Глиоциты	6,27 [5,04; 9,68]	6,55 [6,32; 6,70]	9,90 [9,37; 10,80]##	5,50 [5,00; 6,00]^^	8,00 [7,60; 8,60]^^

Примечание. Обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей группы «Интактные» (* – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$); группы «NaCl» (# – при $p < 0,05$, ## – при $p < 0,01$); группы «TKPRPGP» (^ – при $p < 0,05$, ^^ – при $p < 0,01$); группы «RPGP» († – при $p < 0,05$, †† – при $p < 0,01$).

в большей степени приближает интенсивность пролиферации клеток глии к показателям группы «Интактные». В группе «PGPL» индекс пролиферации глиальных клеток больше, чем в группе «NaCl» (V слой ПТД, V слой СТД), таким образом, различия разнонаправленные. Глиоциты животных группы «PGPL» делятся хуже, чем крысы группы «TKPRPGP», в двух локализациях (V слой ПТД, V слой СТД). При сравнении групп

«PGPL» и «RPGP» статистически значимые различия говорят в пользу аргининсодержащего пептида (V слой ПТД и поле CA1 гиппокампа).

Таким образом, после пятидневных внутрибрюшинных инъекций трех пролинсодержащих пептидов в дозе 0,1 мг/кг самцам крыс Вистар получены экспериментальные данные о разнонаправленных изменениях морфометрических показателей и уровня пролиферации клеток

Таблица 2. Интенсивность пролиферации клеток нервной ткани самцов крыс Вистар в пяти локализациях

Table 2. Proliferation of nervous tissue cells of Wistar rat males in five localizations

Локализация	Интактные	NaCl	TKPRPGP	RPGP	PGPL
Количество Ki-67-меченных нейронов во II и V слоях ПТД, %					
II слой	0 [0; 0,27]	0,20 [0; 0,41]	0 [0; 0,23]	0,32 [0,32; 0,64]	0 [0; 0] ^-††
V слой	0,55 [0; 0,59]	0 [0; 0]**	0 [0; 0]	0 [0; 0]	1,32 [0,94; 1,57] ##,^^,†
Количество Ki-67-меченных клеток глии во II и V слоях ПТД, %					
II слой	1,02 [0,57; 4,58]	0,85 [0,43; 1,26]**	1,97 [0,77; 2,5]##	0,33 [0,32; 0,67]##,^^	0,31 [0,30; 0,61] ##,^^,††
V слой	1,65 [0,60; 3,11]	0,78 [0,39; 1,16]	4,88 [2,94; 6,26]###	0,89 [0,44; 1,30]^^	1,95 [1,67; 2,32] ##,^^,††
Количество Ki-67-меченных нейронов во II и V слоях СТД, %					
II слой	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0 [0; 0,25]	0 [0; 0]	0 [0; 0]
V слой	0 [0; 0]	0 [0; 0,26]	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0 [0; 0]
Количество Ki-67-меченных клеток глии во II и V слоях СТД, %					
II слой	0,99 [0,50; 2,45]	1,03 [0,34; 1,38]**	1,14 [0,83; 1,79]###	0,43 [0,32; 0,54]##,^^	1,11 [0,75; 1,37]**,##
V слой	1,72 [0,87; 2,54]	3,64 [3,22; 3,69]**	3,74 [1,78; 4,49]##	0,39 [0,28; 0,49]##,^^	0,43 [0,40; 0,92]##,^^
Количество Ki-67-меченных нейронов и клеток глии в поле CA1 гиппокампа, %					
Нейроны	0,16 [0; 0,37]	0,18 [0; 0,38]	0,22 [0; 0,30]###	0 [0; 0,47]	0,89 [0,46; 1,28]##,^^
Глиальные клетки	1,15 [0,25; 3,10]	9,92 [8,65; 10,81]**	0,61 [0; 4,00]###	2,00 [1,67; 3,64]##	0,54 [0; 0,57]##,†

Примечание. Обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей группы «Интактные» (* – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$), группы «NaCl» (# – при $p < 0,05$, ## – при $p < 0,01$), группы «TKPRPGP» (^ – при $p < 0,05$, ^^ – при $p < 0,01$), группы «RPGP» († – при $p < 0,05$, †† – при $p < 0,01$).

нервной ткани в пяти локализациях. Получение массива данных, привязанных к изменениям параметров клеток и экспрессии маркерных белков после воздействия пептидов, может считаться одним из этапов тестирования их нейропротекторных свойств. В дальнейшем необходимо экспериментальное выяснение каскадов метаболических систем, в модуляции которых участвуют глипролины, взаимосвязи между их структурой и функциями. Это позволит реализовать предсказание свойств пептидов, необходимых для планирования синтеза лекарств [9]. Таким образом, границы разработки пептидных лекарств могут быть дополнены за счет расширения «омиксных» технологий, основанных на достижениях геномики, транскриптомики, протеомики, метаболомики.

Заключение

Регуляторные пептиды, содержащие аминокислотную последовательность Pro-Gly-Pro, или глипролины, проявляют биологические эффекты в отношении тканей головного мозга, предполагают каскадный механизм действия. Это позволя-

ет рассчитывать на долговременный эффект даже при краткосрочном введении [1, 2]. На отечественном рынке в настоящее время присутствует недостаточное количество препаратов этой группы [14], соответственно, актуально изучение свойств новых глипролинов с целью описания их медикаментозного воздействия. Согласно нашим данным, пятикратное введение 0,9%-го раствора NaCl вызывает изменение ряда морфометрических показателей нейронов и нейроглии в исследуемых локализациях (II и V слой передне-теменной доли, II и V слой собственно теменной доли, поле CA1 гиппокампа) половозрелых самцов крыс Вистар. Некоторые из тестируемых пептидов в разной степени меняют ряд изученных параметров в сторону приближения к показателям в группе интактных животных. Эффекты пептида TKPRPGP при внутрибрюшинном введении в дозе 0,1 мг/кг в течение 5 дней более выражены, чем пептидов RPGP и PGPL (морфометрические показатели клеток нервной ткани, индекс пролиферации глиоцитов); глипролин PGPL эффективнее восстанавливает пролиферативную активность

нейронов; пептид RPGP в большей степени, чем PGPL, приближает показатели пролиферативной активности глиоцитов к показателям животных в интактной группе и в меньшей степени – морфометрические показатели нейронов.

Список литературы

1. Жуйкова С.Е. Глипролины – регуляторные пептиды с интегративным действием. *Интегратив. физиол.* 2020;1(4):303–316. doi: 10.33910/2687-1270-2020-1-4-303-316
2. Краснов И.Б., Красников Г.В., Бурцева Т.Д., Чельная Н.А. Реакция популяции нейронов спинномозгового узла L5 крыс на первичное и повторное моделирование эффектов невесомости. *Авиакосм. и экол. мед.* 2009;43(2):21–26.
3. Хавинсон В.Х. Лекарственные пептидные препараты: прошлое, настоящее, будущее. *Клин. мед.* 2020;98(3):65–177. doi.org/10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177
4. Misiura M., Miltyk W. Proline-containing peptides – new insight and implications: A review. *Biofactors.* 2019;45(6):857–866. doi: 10.1002/biof.1554
5. Jariwala N., Ozols M., Bell M., Bradley E., Gilmore A., Debelle L., Sherratt M.J. Matrikines as mediators of tissue remodeling: A Review. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2022;(185):114240. doi: 10.1016/j.addr.2022.114240
6. Stavchansky V.V., Filippenkov I.B., Remizova J.A., Denisova A.E., Mozgovoy I.V., Gubsky L.V., Myasoedov N.F., Andreeva L.A., Limborska S.A., Dergunova L.V. Insight into glyproline peptides' activity through the modulation of the inflammatory and neurosignaling genetic response following cerebral ischemia-reperfusion. *Genes (Basel).* 2022;13(12):2380. doi: 10.3390/genes13122380
7. Akimov M.G., Fomina-Ageeva E.V., Dudina P.V., Andreeva L.A., Myasoedov N.F., Bezuglov V.V. ACTH(6–9)PGP peptide protects SH-SY5Y cells from H₂O₂, tert-butyl hydroperoxide, and cyanide cytotoxicity via stimulation of proliferation and induction of prosurvival-related genes. *Molecules.* 2021;26(7):1878. doi: 10.3390/molecules26071878
8. Николаев С.В., Логвинов И.О., Колясникова К.Н., Кузнецова Е.А., Антипов П.И., Антипова Т.А. Нейропротекторные свойства *in vitro* новых глипролинов, замещенных по N-концу. *Фармакокинет. и фармакодинам.* 2020;(2):4–10. doi: 10.37489/2587-7836-2020-2-4-10
9. Dergunova L.V., Filippenkov I.B., Limborska S.A., Myasoedov N.F. Neuroprotective peptides and new strategies for ischemic stroke drug discoveries. A Review. *Genes (Basel).* 2023;14(5):953. doi: 10.3390/genes14050953
10. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. СПб.: СпецЛит, 2010. 95 с.
11. Медик В.А., Толмачев М.С., Фишман Б.Б. Статистика в медицине и биологии: Руководство. В

2-х томах. Т. 1. Ред. Ю.М. Комаров. М.: Медицина, 2000. 412 с.

12. Барвина А.Р. Современные правила применения параметрических и непараметрических критериев в статистическом анализе медико-биологических данных. *Мед. альм.* 2021;(1):64–73.

13. Васильев Ю.Г., Берестов Д.С. Гомеостаз и пластичность мозга: монография. Ижевск: ФГБОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2011. 216 с.

14. Справочник Видаль 2022: Лекарственные препараты в России. Ред. Е.А. Толмачева. М.: Видаль Рус, 2022. 1120 с.

References

1. Zhuikova S.E. Glyprolines: regulatory peptides with an integrative action. *Integrativnaya fiziologiya = Integrative Physiology.* 2020;1(4):303–316. [In Russian]. doi: 10.33910/2687-1270-2020-1-4-303-316
2. Krasnov I.B., Krasnikov G.V., Burtseva T.D., Chel'naya N.A. Reaction of the neuronal population of rat's L5 spinal ganglia to primary and repeated modeling of microgravity effects. *Авиакосмическая и экологическая медицина = Aerospace and Environmental Medicine.* 2009;43(2):21–26. [In Russian].
3. Khavinson V.Kh. Peptide medicines: past, present, future. *Клиническая медицина = Clinical Medicine.* 2020;98(3):165–177. [In Russian]. doi.org/10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177
4. Misiura M., Miltyk W. Proline-containing peptides – new insight and implications: A review. *Biofactors.* 2019;45(6):857–866. doi: 10.1002/biof.1554
5. Jariwala N., Ozols M., Bell M., Bradley E., Gilmore A., Debelle L., Sherratt M.J. Matrikines as mediators of tissue remodeling: A Review. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2022;(185):114240. doi: 10.1016/j.addr.2022.114240
6. Stavchansky V.V., Filippenkov I.B., Remizova J.A., Denisova A.E., Mozgovoy I.V., Gubsky L.V., Myasoedov N.F., Andreeva L.A., Limborska S.A., Dergunova L.V. Insight into glyproline peptides' activity through the modulation of the inflammatory and neurosignaling genetic response following cerebral ischemia-reperfusion. *Genes (Basel).* 2022;13(12):2380. doi: 10.3390/genes13122380
7. Akimov M.G., Fomina-Ageeva E.V., Dudina P.V., Andreeva L.A., Myasoedov N.F., Bezuglov V.V. ACTH(6–9)PGP peptide protects SH-SY5Y cells from H₂O₂, tert-butyl hydroperoxide, and cyanide cytotoxicity via stimulation of proliferation and induction of prosurvival-related genes. *Molecules.* 2021;26(7):1878. doi: 10.3390/molecules26071878
8. Nikolaev S.V., Logvinov I.O., Koliashnikova K.N., Kuznetsova E.A., Antipov P.I., Antipova T.A. The neuroprotective properties of analogues of substituted glyproline gzk-111 at the c-terminus *in vitro*. *Фармакокинетика и фармакодинамика = Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.* 2020;(2):4–10. [In Russian]. doi: 10.37489/2587-7836-2020-2-4-10

9. Dergunova L.V., Filippenkov I.B., Limborska S.A., Myasoedov N.F. Neuroprotective peptides and new strategies for ischemic stroke drug discoveries. A Review. *Genes (Basel)*. 2023;14(5):953. doi: 10.3390/genes14050953
10. Korzhevskii D.E., Gilyarov A.V. Fundamentals of histological technique. Saint-Petersburg: SpetsLit, 2010. 95 p. [In Russian].
11. Medik V.A., Tolmachev M.S., Fishman B.B. Statistics in medicine and biology: Guide. In 2 volumes. Vol. 1. Ed. Yu.M. Komarov. Moscow: Meditsina, 2000. 412 p. [In Russian].
12. Barvina A.R. Modern rules for the use of parametric and nonparametric tools in the statistical analysis of biomedical data. *Meditsinskiy al'manakh = Medical Almanac*. 2021;(1):64–73. [In Russian].
13. Vasil'ev Yu.G., Berestov D.S. Homeostasis and brain plasticity: monography. Izhevsk: FGBOU VPO Izhevskaya GSKhA, 2011. 216 p. [In Russian].
14. Vidal Directory 2022: Medicines in Russia Red. E.A. Tolmacheva. Moscow: Vidal' Rus, 2022. 1120 p. [In Russian].

Сведения об авторах:

Колесникова Анна Александровна, ORCID: 0000-0002-0773-9293, e-mail: anna-kostina-88@mail.ru
Флейшман Марина Юрьевна, д.м.н., ORCID: 0000-0002-9337-2801, e-mail: marfl@yandex.ru
Малофей Юлия Борисовна, к.б.н., ORCID: 0000-0001-5698-3665, e-mail: malofey2009@mail.ru
Толстенек Иван Владимирович, к.б.н., ORCID: 0000-0002-0822-3431, e-mail: toiv@bk.ru
Дузенко Надежда Владимировна, e-mail: nadya_duz@mail.ru
Сальников Антон Александрович, e-mail: anton231100@mail.ru

Information about the authors:

Anna A. Kolesnikova, ORCID: 0000-0002-0773-9293, e-mail: anna-kostina-88@mail.ru
Marina Yu. Fleishman, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-9337-2801, e-mail: marfl@yandex.ru
Yliya B. Malofey, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0001-5698-3665, e-mail: malofey2009@mail.ru
Ivan V. Tolstenok, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-0822-3431, e-mail: toiv@bk.ru
Nadezhda V. Duzenko, e-mail: nadya_duz@mail.ru
Anton A. Salnikov, e-mail: anton231100@mail.ru

Поступила в редакцию 02.07.2024
После доработки 18.07.2024
Принята к публикации 01.08.2024

Received 02.07.2024
Revision received 18.07.2024
Accepted 01.08.2024