

УДК 577.27

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕПТИДЫ ЗАЩИЩАЮТ НЕЙРОНЫ МОЗГА ОТ ГИПОКСИИ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ IN VIVO

© 2008 г. Л. С. Козина, А. В. Арутюнян, С. Л. Стволинский,
М. С. Степанова, М. Г. Маклецова, В. Х. Хавинсон

Представлено академиком В.П. Скулачевым 11.07.2007 г.

Поступило 30.07.2007 г.

Короткие пептиды, охарактеризованные в исследованиях, выполненных ранее в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН [1–3], обладают способностью защищать нейроны от окислительного стресса [4], однако в опытах *in vitro* их действие проявляется при высоких (миллимолярных) концентрациях. Их прямая антиоксидантная активность невелика, и по этой причине биологический эффект может быть опосредован через природную систему антиоксидантной защиты [5]. Если это справедливо, протекторное действие этих пептидов в условиях целого организма может проявляться при концентрациях, приближенных к физиологическим. Проверка этого предположения и явилась темой настоящего исследования. Целью данной работы было изучение в экспериментах *in vivo* защитного влияния ряда коротких регуляторных пептидов (вилон, эпیتالон, пинеалон и везуген) при окислительном стрессе, вызванном воздействием на животных гипобарической гипоксии.

В экспериментах использовали крыс-самцов линии Wistar массой 185–200 г. Окислительный стресс создавали с помощью острой гипобарической гипоксии, моделируя ее в барокамере с регулируемым протоком воздуха, что предотвращает развитие гиперкапнии [6]. С помощью вакуумного насоса давление в барокамере снижали за 1 мин до конечного значения 0.125 атм. В таких условиях животных выдерживали до остановки дыхания, после чего возвращали животных в условия нормального давления, подавая в камеру атмосферный воздух в течение 1 мин.

Регистрировали следующие параметры: время (с) до потери дыхания “на высоте”; время (с) вос-

становления позы, т.е. период времени от остановки дыхания до момента, когда животное после “спуска с высоты” и восстановления дыхания в условиях нормобарии восстанавливало нормальную позу; время (с) реституции, измеряемое как общая продолжительность периода восстановления физиологической активности после гипоксического воздействия. Для выявления защитного действия исследуемых пептидов оценивали смертность и коэффициент реституции (отношение продолжительности времени реституции к времени до остановки дыхания в барокамере).

Для статистической обработки данных использовали критерии Крускала–Уоллиса и Манна–Уитни; достоверными считали отличия при $p < 0.05$.

Исследуемые пептиды вилон (Lys-Glu), везуген (Lys-Glu-Asp), пинеалон (Glu-Asp-Arg) и эпیتالон (Ala-Glu-Asp-Arg) вводили в дозе 10 мкг/кг массы животного внутривентриально ежедневно в течение 5 сут, предшествующих гипоксии. Крысы контрольной группы получали внутривентриально инъекции физиологического раствора по такой же схеме. Численность животных в каждой группе составляла 10 особей.

Установлено (табл. 1), что все регуляторные пептиды при внутривентриальном введении, предшествующем гипобарической гипоксии, способны значительно увеличивать резистентность животных к гипоксии – время до потери дыхания с 72 с (контроль) возрастало до 149–188 с (вилон, пинеалон, эпیتالон); везуген был наименее эффективен (88 с). В то же время для него, как и для эпیتالона, обнаружено наиболее быстрое восстановление позы после снятия гипоксического воздействия – оно находилось на уровне контрольных значений. Для вилон и пинеалона эта величина была несколько выше, что соответствовало более длительному времени, в течение которого животные сохраняли дыхание при гипоксии. Общее время реституции в случае вилон и пинеалона возрастало относительно контроля, а у везугена и эпیتالона оставалось на уровне контроля. Соответственно наилучший коэффициент

Санкт-Петербургский институт
биорегуляции и геронтологии
Северо-Западного отделения
Российской академии медицинских наук
Научный центр неврологии
Российской академии медицинских наук, Москва

Таблица 1. Влияние регуляторных пептидов на физиологические характеристики крыс, перенесших воздействие острой гипобарической гипоксии

Исследуемое соединение	Время до потери дыхания, с	Время восстановления позы, с	Время реституции, с	Коэффициент реституции (3/1)	Смертность, %
Контроль	72 ± 10	126 ± 21	202 ± 32	2.8	10
Вилон	149 ± 47 ($p < 0.08$)	152 ± 31	302 ± 50 ($p < 0.08$)	2.0	20
Везуген	88 ± 9	111 ± 16	194 ± 24	2.2	10
Пинеалон	184 ± 30 ($p < 0.014$)	152 ± 16	291 ± 35 ($p < 0.1$)	1.6	10
Эпиталон	150 ± 38 ($p < 0.08$)	103 ± 28	185 ± 33	1.2	20

Примечание. Критерий достоверности указан относительно контрольной группы животных, получавших инъекции физиологического раствора.

реституции обнаруживался для пинеалона и эпиталона, хотя последний характеризовался и большей смертностью животных (табл. 1). По совокупности признаков пинеалон можно признать наиболее эффективным протектором, обеспечивающим наилучшую адаптацию крыс к гипоксическому воздействию. Поэтому в следующей серии экспериментов мы использовали пинеалон для исследования его эффекта в условиях пренатальной гипобарической гипоксии.

В этих опытах самки крыс были подвергнуты гипобарической гипоксии на 10-й день беременности – в срок, при котором у потомства происходит закладка нервной системы [7]. Острую гипобарическую гипоксию инициировали, как описано выше, после чего половине животных вводили пинеалон (5 внутрибрюшинных инъекций через день в дозе 10 мкг/кг массы тела), другая группа животных, служившая контролем, получала внутрибрюшинно по такой же схеме физиологический раствор. Оценивали количество животных в потомстве, их физиологическое поведение, а также устойчивость изолированных нейронов мозжечка к окислительному стрессу.

Численность потомства от животных, перенесших гипоксию, составляла 9 ± 3 особи, а в группе, получавшей пинеалон – 14 ± 2 ($p < 0.05$), что приближалось к нормальному физиологическому уровню, типичному для интактных животных. На 12-й день часть подросших животных была декапитирована, и их мозжечок был использован для цитометрического анализа. Оставшихся животных в возрасте 4 недель использовали для оценки их поведения в тесте “открытое поле”.

Суспензию гранулярных клеток мозжечка получали, как описано ранее [8, 9], и индуцировали окислительный стресс, инкубируя клетки с пероксидом водорода или лигандом глутаматных рецепторов NMDA-класса, NMDA (N-метил-D-аспаратом). Уровень активных форм кислорода (АФК) и гибель нейронов определяли с помощью

внутриклеточных зондов карбоксиметокси-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (CDCF-DA, 100 мкМ) и иодистого пропидия (PI, 5 мкМ), используя проточный цитометр EPICS XL фирмы “Beckman Coulter” (США).

Инкубация нейронов с пероксидом водорода (20 мМ в течение 20 мин) или с NMDA (1 мМ в течение 40 мин) вызывала резкое возрастание гибели нейрональных клеток (рис. 1а, б). При этом в суспензии нейронов, полученных от животных, рожденных от гипоксических самок и не леченных пинеалоном, наблюдалось двукратное увеличение гибели клеток, вызываемое пероксидом водорода, в то время как для нейронов, полученных из потомства от леченных самок, эта величина не превышала 40%. Исходный уровень мертвых нейронов в первичной культуре также был почти вдвое ниже в случае нейронов, выделенных из мозжечка животных, полученных от леченных пинеалоном крыс. Таким образом, клетки, выделенные из мозжечка животных, рожденных от крыс, получавших пинеалон, обладают большей устойчивостью к окислительному стрессу.

При исследовании уровня АФК в тестируемых клетках обнаружено, что гипоксия приводит к резкому (почти в 3 раза) увеличению исходного (стационарного) уровня АФК. На этом фоне индукция окислительного стресса у нейронов с помощью неспецифического фактора (пероксида водорода) вызывает прирост свободных радикалов, который мало отличается для гипоксических животных обеих групп (получавших и не получавших пинеалон). В то же время по реакции на NMDA нейроны этих животных существенно различались. На фоне высокого стационарного уровня АФК NMDA не вызывал дополнительного роста свободных радикалов в нейронах потомства гипоксических крыс, как это наблюдается в случае интактных нейронов [7], а в нейронах потомства гипоксических крыс, леченных пинеалоном, даже понижал их рост (рис. 2). Этот факт показывает, что пинеалон защищает нейрональ-

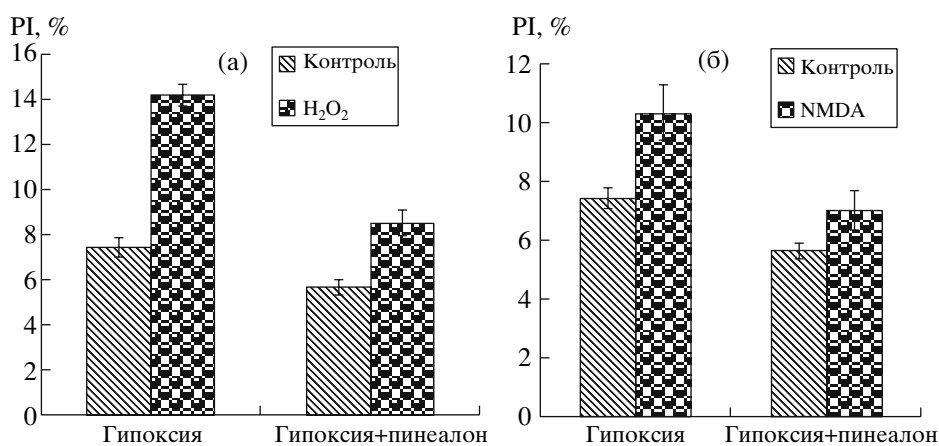


Рис. 1. Доля мертвых клеток в первичной культуре нейронов мозжечка крыс при инкубации с пероксидом водорода (а) или с NMDA (б). Инкубация с 20 мМ пероксида водорода – 20 мин, с 1 мМ NMDA – 40 мин.

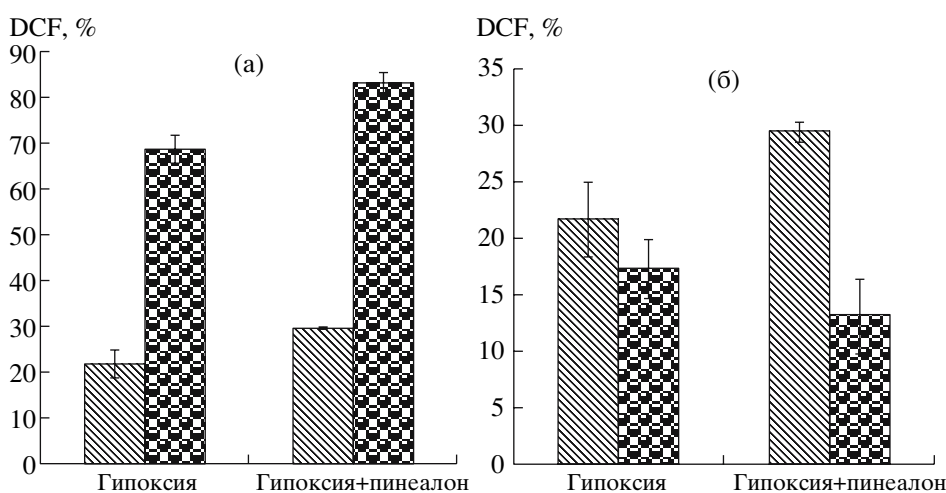


Рис. 2. Уровень активных форм кислорода в первичной культуре нейронов при инкубации с пероксидом водорода (а) или NMDA (б). Условия, как на рис. 1.

ные клетки от эксайтотоксического действия NMDA.

Поскольку не было обнаружено аналогии между уровнем смертности нейронов и ростом АФК при индукции окислительного стресса, можно заключить, что защита клеток от гибели осуществляется пинеалом не путем прямого ограничения продукции АФК, а иным механизмом, возможно, связанным с повышением устойчивости мембран, как это наблюдалось нами ранее в модельных экспериментах с осмотическим гемолизом эритроцитов, индуцируемым в присутствии пинеалона. Нельзя исключить, что эффект пинеалона реализуется через увеличение устойчивости внутренней системы антиоксидантных ферментов, как это показано для других биорегуляторов [4, 5].

В возрасте 4 недель подопытные животные были подвергнуты тестированию в “открытом

поле”. При этом регистрировали горизонтальную активность животных (ГА) – количество пересеченных квадратов за фиксированное время (3 мин), вертикальную активность (ВА) – количество стоек; количество обследованных норок, характеризующее исследовательскую активность животных; число эпизодов груминга; количество выходов в центр поля, количество болюсов, характеризующих тревожность и эмоциональную активность животных. Потомство животных, разделенное по реакции их матерей на гипобарическую гипоксию в период беременности на 2 разные группы – чувствительную к гипоксии и устойчивую к ней – анализировали по отдельности. Данные представлены в табл. 2. У потомства, как чувствительных, так и устойчивых к гипоксии крыс, получавших пинеалон, ГА и ВА были достоверно выше, чем у потомства крыс, подвергшихся гипоксии и не получавших этого пептида. При этом у потомства, полученно-

Таблица 2. Физиологические параметры, характеризующие поведение животных в тесте “открытое поле”

Параметр	Чувствительные к гипоксии (n = 6)	Чувствительные к гипоксии + пинеалон (n = 11)	Устойчивые к гипоксии (n = 9)	Устойчивые к гипоксии + пинеалон (n = 12)
ГА	36 ± 6.9	53 ± 5.1 <i>p</i> < 0.05	45 ± 3.3	57 ± 3.3 <i>p</i> < 0.05
ВА	2 ± 0.8	5 ± 0.8 <i>p</i> < 0.05	2 ± 0.6	6 ± 1.1 <i>p</i> < 0.05
Норковая активность	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.6	2.7 ± 0.7	3 ± 0.5
Число эпизодов груминга	1.5 ± 0.8	3.5 ± 1.2	8.7 ± 2.9	10 ± 2.4
Кол-во болюсов	2.7 ± 0.4	1.8 ± 0.6	2.0 ± 0.7	4.1 ± 0.8
Число выходов в центр поля	0.01 ± 0.1	0.27 ± 0.1	0.17 ± 0.1	0.13 ± 0.1

Примечание. *p* характеризует достоверность относительно группы гипоксических животных, не получивших пинеалон.

го от устойчивых к гипоксии крыс, ГА была несколько выше, чем от чувствительных к гипоксии крыс, поэтому эффект пинеалона проявлялся более выражено в группе чувствительных к гипоксии животных. На исследовательскую активность (обследование норки) достоверного влияния пинеалон не оказывал.

У потомства чувствительных к гипоксии крыс пинеалон заметно увеличивал частоту груминга и количество выходов в центр открытого поля, хотя это увеличение было недостоверным вследствие разброса индивидуальной реакции животных. В противоположность этому действие пинеалона на потомство устойчивых к гипоксии животных не проявлялось.

Представленные данные демонстрируют, что пинеалон обладает выраженным антигипоксическим действием. Отчетливая протекторная способность пинеалона, направленная на увеличение устойчивости нейронов к гипоксическому стрессу, имеет сложную природу, которая основана не столько на ограничении роста АФК, происходящего в клетках в ответ на стрессорное воздействие, сколько на ограничении эксайтотоксического действия NMDA. Его эффект может проявляться

сильнее на метаболизм мозга стресс-чувствительных особей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. Пептидные биорегуляторы и старение. СПб.: Наука, 2003. 223 с.
2. Лысенко А.В., Арутюнян А.В., Козина Л.С. Пептидная регуляция адаптации организма к стрессорным воздействиям. СПб.: Изд-во Военно-мед. Академии, 2005. 208 с.
3. Kozina L.S., Arutjunyan A.V., Khavinson V.Kh. // Arch. Gerontol. Geriatr. 2007. V. 44. Suppl. 1. P. 213–216.
4. Arutjunyan A., Boldyrev A., Kozina L. // Adv. Gerontol. 2007. V. 20. № 3. P. 17.
5. Кольтовер В.К. В сб.: XX Съезд физиологического общества им. И.П. Павлова. Тез. докладов (4–8 июня 2007 г.). М.: Издат. дом “Русский врач”, 2007. С. 48.
6. Boldyrev A.A., Stvolinsky S.L., Tyulina O.V. et al. // Cell. and Mol. Neurobiol. 1997. V. 17. № 2. P. 259–271.
7. Федорова Т. Н., Маклецова М. Г., Куликов А.В. и др. // ДАН. 2006. Т. 408. № 1. С. 132–135.
8. Oyama O., Carpenter D.O., Chikahisa L. et al. // Brain Res. 1996. V. 728. № 1. P. 121–124.
9. Boldyrev A.A., Song R., Dyatlov V.A. et al. // Cell. Mol. Neurobiol. 2000. V. 20. № 4. P. 433–450.