

А. М. Менджеруцкий¹, Г. В. Карантыш¹, Г. А. Рыжак², С. В. Демьяненко¹

РЕГУЛЯЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И АКТИВНОСТИ КАСПАЗЫ-3 В МОЗГУ СТАРЫХ КРЫС КОРТЕКСИНОМ И ПИНЕАЛОНОМ В МОДЕЛИ ОСТРОЙ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

¹ Южный федеральный университет, 344010 Ростов-на-Дону, ул. Б. Садовая, 105/42; ² Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, 197110 Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3; e-mail: karantyshgv@mail.ru

Исследованы эффекты Кортиксина и Пинеалона на активность каспазы-3 в мозгу, IL-6 и TNF в сыворотке крови старых крыс при острой гипоксической гипоксии. Было высказано предположение, что Пинеалон в условиях гипоксии мозга способствует повышению нейрогенеза и снижению нейровоспалительных реакций до контрольного уровня. Кортиксин при острой гипоксической гипоксии снижает способность ткани мозга к программируемой гибели клетки, но сохраняет содержание IL-6 на высоком уровне.

Ключевые слова: старые крысы, Кортиксин, Пинеалон, цитокины, каспаза-3, острая гипоксическая гипоксия

В последнее время активно обсуждается вопрос о развитии воспалительных процессов в мозге в ранний период нарушения мозгового кровообращения [6, 10], регуляции транспорта цитокинов через гематоэнцефалический барьер после ишемического инсульта [15], а также о механизмах пептидной регуляции гибели клеток мозга путем апоптоза или некроза [1, 15]. Известно, что с возрастом при развитии глобальной ишемии мозга снижается интенсивность процесса апоптозной гибели клеток, зависимой от активности каспазы-3 [11], из-за уменьшения количества каспаза-3-иммунореактивных клеток [16]. Одновременно повышается провоспалительный статус мозга [10].

Выявление механизмов пептидной регуляции программированной гибели клеток при стрессе и старении остается одной из наиболее актуальных проблем биологии и медицины. В качестве герпротекторов в данной работе использовали пептидные препараты — «Кортиксин» и «Пинеалон». Согласно ранее полученным результатам исследования, данные препараты в модели окклюзии сонных артерий способствуют повышению выживаемости животных, снижают действие стрессогенного фактора на поведение животных, ве-

роятно, за счет влияния на медиаторный баланс [2]. В настоящее время доказано, что адаптивные перестройки на уровне поведения связаны с модуляцией протеолитической активности мозга, в частности активности каспазы-3 [4]. Сигналы, индуцирующие апоптоз, могут быть как внутри-, так и внеклеточными. К внутриклеточным сигналам, вызывающим апоптоз, относят АФК и вирусы, к внеклеточным — гормоны, цитокины, разные факторы роста [1]. Однако до сих пор не выяснены причины данных изменений под влиянием пептидов. Рядом авторов показано, что в тканях организма эффекты пептидных препаратов обусловлены их действием на уровне регуляции экспрессии генома [7, 9]. Вероятно, пептиды могут изменять экспрессию разных генов клетки, реализуя, таким образом, свою полифункциональность.

Целью данного исследования явилось изучение эффектов Кортиксина и Пинеалона на содержание и активность каспазы-3 в мозгу и на уровень IL-6 и TNF-α в сыворотке крови старых крыс в модели острой гипоксической гипоксии (ОГГ).

Материалы и методы

Эксперимент проведен на 18-месячных крысах. Всех животных содержали в условиях вивария на стандартном пищевом рационе с 12-часовым светотемновым режимом. При уходе за животными, питании и проведении экспериментов руководствовались рекомендациями ВОЗ, рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей.

Пептидные препараты предоставлены Санкт-Петербургским институтом биорегуляции и геронтологии. Аминокислотный спектр Кортиксина представлен 15 аминокислотами. Также препарат

содержит микроэлементы, регулирующие процессы клеточной динамики и апоптоза. Пинеалон (*Glu-Asp-Arg*) — трипептид, содержащий глутаминовую, аспарагиновую кислоты и аргинин. Пинеалон обладает способностью стимулировать функциональную активность основных клеточных элементов ткани мозга, снижать уровень спонтанной гибели клеток, усиливать регенераторно-адаптационные процессы в клетках.

Подопытные животные были разделены на группы:

1-я — крысы ($n=20$), которым в течение 5 дней вводили 0,9% раствор *NaCl* (контрольная группа);

2-я — животные ($n=20$), которым в течение 5 дней вводили 0,9% раствор *NaCl*, затем моделировали ОГГ;

3-я — крысы ($n=20$), которым внутрибрюшинно вводили Кортексин в дозе 1 мг/кг массы тела в течение 5 дней (Кортексин);

4-я — крысы ($n=20$), которым внутрибрюшинно вводили Пинеалон в дозе 10 мкг/кг массы тела в течение 5 дней (Пинеалон);

5-я — животные ($n=20$), которым внутрибрюшинно вводили Кортексин в дозе 1 мг/кг массы тела в течение 5 дней, затем моделировали ОГГ (Кортексин + ОГГ);

6-я — животные ($n=20$), которым внутрибрюшинно вводили Пинеалон в дозе 10 мкг/кг массы тела в течение 5 дней, затем моделировали ОГГ (Пинеалон + ОГГ).

В работе использовали модель ОГГ, которую моделировали путем помещения крыс в приточно-вытяжную барокамеру при 66,41 кПа (3500 м над уровнем моря) на 3 ч. Через 24 ч животных декапитировали, мозг извлекали на холоду и выделяли кору и стволые структуры, собирали кровь.

Активность каспазы-3 определяли флуориметрическим методом [8]. Активность каспазы-3 рассчитывали по разности скоростей накопления свободного 7-амино-4-метилкумарина в пробах (Sigma, США) и выражали в пмоль/мин на мг белка. Концентрацию *IL-6* и *TNF-α* в сыворотке крови животных определяли твердофазным иммуноферментным методом с помощью коммерческих наборов соответствующих реагентов («eBioscience», Platinum ELISA) согласно инструкциям производителей. Исследования выполнены на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Alisei» (производство Италия). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica for Windows 6.0.

Результаты и обсуждение

Одним из маркеров апоптозной гибели клеток является каспаза-3, активация которой ведет к развитию нейродегенеративных процессов, связанных как с хроническими, так и с острыми нарушениями мозгового кровообращения. Однако при старении повышение активности каспазы-3 также может быть связано и с ее другими свойствами — неапоптозными [12].

В ходе исследования выявлены региональные особенности активации каспазы-3 в головном мозгу крыс в модели ОГГ и предварительного введения пептидных препаратов (табл. 1). Через сутки после ОГГ происходило значительное повышение активности фермента в коре больших полушарий (на 131%, $p<0,001$) и ствольных структурах (на 82%, $p<0,001$) мозга.

Введение Кортексина животным приводило к изменению активности каспазы-3 в коре больших полушарий, тогда как после введения Пинеалона обнаружено возрастание активности протеазы в ствольных структурах мозга относительно 1-й группы крыс. В условиях предварительного введения Кортексина перед ОГГ наблюдали снижение активности каспазы-3 в структурах мозга до уровня контрольных показателей. Введение Пинеалона перед ОГГ способствовало снижению активности фермента в мозгу относительно 2-й группы животных. При этом в ствольных структурах активность фермента была выше уровня животных контрольной группы.

При изучении содержания цитокинов в сыворотке крови крыс учитывали, что поступление цитокинов в ЦНС возможно через гематоэнцефалический барьер, целостность которого существенно нарушается при разных экстремальных состояниях

Таблица 1

Активность каспазы-3 (пмоль/мин на мг белка) в мозгу старых крыс, $M \pm m$

Группа	Кора больших полушарий	Ствольные структуры
1-я (контрольная)	0,82±0,10	1,03±0,14
2-я (ОГГ)	1,89±0,06*	1,87±0,31*
3-я (Кортексин)	0,63±0,08*	1,16±0,20
4-я (Пинеалон)	1,18±0,12	1,31±0,11*
5-я (Кортексин + ОГГ)	0,92±0,07	1,04±0,16
6-я (Пинеалон + ОГГ)	0,99±0,11	1,42±0,08*

Примечание. Здесь и в табл. 2: * Достоверные отличия показателей относительно контрольного уровня при $p<0,05$

Таблица 2

Влияние пептидов на содержание *IL-6* и *TNF-α* в сыворотке крови старых крыс, $M \pm m$

Группа	<i>IL-6</i> , пк/мл	<i>TNF-α</i> , пк/мл
1-я (контрольная)	27,17±1,06	90,89±3,57
2-я (ОГГ)	990,46±43,17*	103,61±4,36
3-я (Кортексин)	53,92±2,35*	82,51±3,41
4-я (Пинеалон)	33,46±1,23	93,31±4,22
5-я (Кортексин + ОГГ)	350,51±15,87*	88,72±3,49
6-я (Пинеалон + ОГГ)	34,13±0,97	67,96±3,26*

[3, 14]. Согласно полученным результатам, в сыворотке крови повышается содержание *IL-6* при ОГГ (в 36 раз, $p < 0,0001$), а также при введении Кортексина (у крыс контрольной группы на 98 % и у крыс, которым моделировали ОГГ, — в 13 раз, $p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

Известно, что *IL-6* в мозге может индуцировать каскад нейродегенеративных изменений [13]. Можно предположить, что при ОГГ запускаются процессы, способствующие повышению риска развития нейровоспаления. Введение Кортексина перед ОГГ снижало уровень *IL-6* в модели ОГГ, однако его содержание превышало контрольное значение. Введение Пинеалона при ОГГ (в отличие от Кортексина) блокировало повышение содержания *IL-6*. Также при введении трипептида перед ОГГ выявлено понижение уровня *TNF* на 25 % ($p < 0,05$) относительно 1-й группы, что ассоциируют со снижением развития нейровоспаления в мозгу [15].

Предположительно, установленные эффекты Пинеалона связаны со следующим. С одной стороны, аминокислотный состав Пинеалона (*Glu-Asp-Arg*) близок к составу *RGD*-последовательности каспазы-3 (аргинин—глицин—аспартат) вблизи активного ее центра, которая вовлечена во внутримолекулярное взаимодействие, придающее молекуле профермента конформацию, при которой протеазная активность снижена [11]. С другой стороны, с возрастом происходит снижение активности каспазы-3 в мозге, и повышение ее активности может происходить на фоне активации нейрогенеза [16], что наблюдали в стволовых структурах под влиянием Пинеалона у старых крыс относительно контрольной группы. Также известно, что аргининсодержащие пептиды, к которым относится Пинеалон, минимизируют проявления окислительного стресса и активируют систему «синтаза оксида азота — оксид азота» [5], снижая

вероятность развития нейровоспалительных процессов.

Полученные результаты дают основание предположить, что введение Пинеалона старым крысам способствует в условиях ОГГ повышению активности нейрогенеза и снижению нейровоспалительных реакций до контрольного уровня. При введении Кортексина при ОГГ, напротив, снижается активность каспазы-3 относительно 3-й группы, но остается значительно повышенным содержание *IL-6* по сравнению с контрольным. Это свидетельствует о модуляции данным препаратом связанных с апоптозом процессов при сохранении высокого риска развития нейровоспаления.

Выводы

В условиях острой гипоксической гипоксии у старых крыс происходит значительное возрастание активности каспазы-3 в мозгу и содержания *IL-6* в сыворотке крови.

При введении Кортексина происходит повышение содержания *IL-6* в сыворотке крови, особенно в модели острой гипоксической гипоксии.

При введении Пинеалона в стволовых структурах мозга старых крыс повышается активность каспазы-3, однако препарат предотвращает чрезмерный рост ее активности в модели острой гипоксической гипоксии.

Литература

1. Белушкина Н.Н., Северин С.Е. Молекулярные основы патологии апоптоза // Арх. пат. 2001. Т. 63. № 1. С. 51–60.
2. Демьяненко С.В., Ивонина К.О., Карантыш Г.В. и др. Эффекты Кортексина и Пинеалона на выживаемость, поведение и активность каспазы-3 крыс в модели окклюзии сонных артерий // Валеология. 2012. № 2. С. 26–32.
3. Еникеев Д.А., Нургалева Е.А., Александров М.А. и др. Цитокины и постшемические нарушения микроциркуляции мозга крыс после смертельной кровопотери // Мед. вестн. Башкортостана. 2009. № 2. С. 86–89.
4. Кудряшова И.В., Гуляева Н.В., Степаничев М.Ю. Естественная активация каспазы-3 необходима для развития инструментального поведения в постнатальном онтогенезе // Журн. высш. нервн. деят. 2007. № 6. С. 702–711.
5. Лебедько О.А., Тимошин С. С. Корректирующие эффекты регуляторных пептидов в системе органов дыхания на фоне повторной блокады синтеза оксида азота, индуцированной введением L-NAME // Дальневост. мед. журн. 2006. № 3. С. 86–89.
6. Титов В.Н. Роль макрофагов в становлении воспаления, действие интерлейкина-1, интерлейкина-6 и активность гипоталамо-гипофизарной системы // Клин. лаб. диагностика. 2003. № 12. С. 3–12.
7. Хавинсон В.Х., Шатаева Л.К. Модель комплементарного взаимодействия коротких пептидов с двойной спиралью ДНК // Мед. акад. журн. 2005. Т. 5. № 1. С. 15–23.
8. Яковлев А.А., Перегуд Д.И., Павлова Т.В. Эффекты острого введения пентилентетразола и пентилентетразо-

лового киндинга: окислительный стресс и активность NO-синтазы в мозге // Нейрохимия. 2004. Т. 21. № 1. С. 58–67.

9. Ambati S., Duan J., Hartzell D.L. et al. GIP-dependent expression of hypothalamic genes // *Physiol. Res.* 2011. Vol. 60. P. 941–950.

10. Denes A., Ferenczi S., Kovacs K.J. Systemic inflammatory challenges compromise survival after experimental stroke via augmenting brain inflammation, blood-brain barrier damage and brain oedema independently of infarct size // *J. Neuroinflammation.* 2011. Vol. 8. P. 164–177.

11. Gulyaeva N., Kudryashov I., Kudriashova I. Caspase activity is essential for long term potentiation // *J. Neurosci. Res.* 2003. Vol. 73. P. 853–864.

12. He Z., Meschia J.F., Brott T.J. et al. Aging is neuroprotective during global ischemia but leads to increased caspase-3 and

apoptotic activity in hippocampal neurons // *Curr. Neurovasc. Res.* 2006. Vol. 3. P. 181–186.

13. Li Y., Barger S.W., Liu L. et al. S100 β induction of the pro-inflammatory cytokine interleukin-6 in neurons // *J. Neurochem.* 2000. Vol. 74. 143–150.

14. Lindsberg P.J., Strbian D., Karjalainen-Lindsberg M.-L. Mast cell as early responders in the regulation of acute blood-barrier changes after cerebral ischemia and hemorrhage // *J. cerebr. blood flow metab.* 2010. Vol. 30. P. 689–702.

15. Pan W., Kastin A.J. Tumor necrosis factor and stroke: role of the blood-brain barrier // *Prog. Neurobiol.* 2007. Vol. 83. № 6. P. 363–374.

16. Tang H., Wang Y., Xie L. et al. Effect of the neural precursor proliferation level on neurogenesis in rat brain during aging and after ischemia // *Neurobiol. Aging.* 2009. Vol. 30. № 2. P. 299–308.

Adv. geront. 2014. Vol. 27. № 1. P. 94–97

A.M. Mendzeritsky¹, G.V. Karantysh¹, G.A. Ryzhak², S.V. Demyanenko¹

REGULATION OF CONTENT OF CYTOKINES IN BLOOD SERUM AND OF CASPASE-3 ACTIVITY IN BRAINS OF OLD RATS IN MODEL OF SHARP HYPOXIC HYPOXIA WITH CORTEXIN AND PINEALON

¹ Southern Federal University, 105/42 ul. B. Sadovaya, Rostov-on-Don 344010; e-mail: karantyshgv@mail.ru;

² Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, 3 Dynamo pr., St. Petersburg 197110

While studying the effects of Cortexin and Pinealon (*Glu-Asp-Arg*) on the caspase-3 activity in the brain, an interleukin-6 and a factor of tumor necrosis in blood serum of old rats under the sharp hypoxic hypoxia it was suggested that in hypoxia of brain conditions Pinealon forwards the increase of the neurogenesis and the decrease neuroinflammatory reactions to a reference level. With the sharp hypoxic hypoxia Cortexin reduces an ability of brain tissue of programmed cells death, but saves the content of interleukin-6 at high level.

Key words: old rats, Cortexin, Pinealon, cytokines, caspase-3, sharp hypoxic hypoxia