

Р. Д. Дейко¹, С. Ю. Штрыголь¹, А. А. Колобов²,
А. А. Ходаковский³, И. Л. Черешнюк³

**ВЛИЯНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО НЕЙРОПРОТЕКТОРА
ACETYL-(D-LYS)-LYS-ARG-ARG-AMIDE (КК-1) НА НЕЙРОДЕСТРУКЦИЮ
И НЕЙРОАПОПТОЗ У КРЫС ПРИ ОСТРОМ НАРУШЕНИИ
МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ**

¹Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

²ФГУП «Научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»
ФМБА России, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

³Винницкий национальный медицинский университет им. Н. И. Пирогова,
г. Винница, Украина

Статья посвящена результатам экспериментального изучения оригинального пептидергического нейропротектора Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide (КК-1), являющегося гомологом первичной аминокислотной последовательности АКТГ₁₅₋₁₈. На модели 20-минутной ишемии-реперфузии головного мозга (ГМ) у крыс изучали влияние КК-1 на содержание в крови маркеров нейродеструкции – нейрон-специфической енолазы (НСЕ) и белка S-100 в остром периоде ишемии. На этой же модели изучали влияние КК-1 на содержание фрагментированной ДНК в ядрах нейронов лобной части ГМ (маркер апоптоза). Установлено, что терапевтическое введение КК-1 (1 раз в сутки ежедневно на протяжении 4 суток интраназально) способствует снижению уровней НСЕ, S-100 и количества фрагментированной ДНК (в 2,3; 5,3 и 1,5 раза соответственно относительно контрольной патологии). По нормализации маркеров нейродеструкции и нейроапоптоза КК-1 превосходит известный нейропротектор цитиколин. По результатам исследования сделан вывод, что способность тетрапептида КК-1 уменьшать нейродеструкцию и нейроапоптоз в зоне ишемического поражения ГМ является звеном его политропного механизма нейропротекторного действия.

Ключевые слова: тетрапептиды, церебральная ишемия, нейродеструкция, нейроапоптоз, эксперимент.

ВВЕДЕНИЕ

Лечение острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК), в частности ишемического инсульта, является до сих пор нерешенной задачей современной медицины и фармации [1]. Актуальным вопросом является создание современных нейропротекторных средств, необходимой характеристикой терапевтического действия которых является политропный механизм. В соответствии с современными представлениями, такое средство должно реализовывать лечебный эффект путём угнетения двух основных патогенетических процессов, развивающихся при ОНМК: нейроапоптоза и некроза в нервной ткани [2, 3]. Большинство известных нейропротекторов демонстрируют недостаточную клиническую эффективность и большое количество побочных реакций. Потенциальными нейропротекторами, максимально соответствующими приведенным требованиям, являются эндогенные нейроре-

гуляторные пептиды и средства, созданные на их основе (например, семакс, ноопепт). Такие лекарственные средства характеризуются мощным нейропротекторным эффектом, опосредованным рецепторными и нерепторными механизмами [4, 5]. Как правило, такая активность пептидергических нейропротекторов сопровождается выраженным ноотропным действием и благоприятным спектром психотропных эффектов, в целом обеспечивая максимальную редукцию неврологических, поведенческих, когнитивных и эмоциональных нарушений у больных ишемическим инсультом [6].

В НИИ особо чистых биопрепаратов (г. Санкт-Петербург) под руководством д-ра биол. наук Колобова А. А. был создан ряд конформационно ограниченных тетрапептидов, гомологичных первичной аминокислотной последовательности АКТГ₁₅₋₁₈. Их структура в общем виде выражается формулой Acetyl-Lys-Lys-Arg-Arg-amide. Характерной чертой строения молекул

новых фармакологических средств стало наличие D-форм лизина или/и аргинина, а также их N-метилированных производных. Таким образом, удалось достигнуть фармакокинетической стойкости к действию аминопептидаз крови и обеспечить относительно длительное действие нейропептидов в организме на протяжении 24 часов, а также отсутствия токсических свойств [7].

Скрининг нейропротекторной активности по критерию ранней выживаемости крыс (4 суток) при модельном ОНМК свидетельствует о высоком защитном потенциале синтезированных соединений (67–83% выживших животных против 10–20% в контроле) [8, 9]. По антигипоксическим свойствам (модель нормобарической гипоксической гипоксии с гиперкапнией) среди 11 гомологичных соединений лидером оказался Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide (лабораторный шифр КК-1) [9]. Позже для КК-1 установили благоприятный спектр сопутствующих психотропных свойств (ноотропное, алко- и актопротекторное действие при отсутствии выраженного седативного, депрессогенного влияния и усиления действия стимуляторов ЦНС) [10]. В эксперименте КК-1 также эффективно редуцирует когнитивный и неврологический дефицит (НД) при ОНМК, улучшает двигательную, ориентировочно-исследовательскую активность и уменьшает эмоциональную лабильность [11].

Механизмы антиишемического действия КК-1 не установлены. Представляет интерес выяснение влияния КК-1 на выраженность некроза и апоптоза в ГМ животных при ОНМК [12, 13].

Цель работы – экспериментально изучить влияние КК-1 на экспрессию специфических маркеров нейродеструкции – нейрон-специфической енолазы (НСЕ) и белка S-100, а также специфичного маркера нейроапоптоза – фрагментированной ДНК в остром периоде ОНМК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нейропротекторное действие тетрапептида КК-1 оценивали на 20 беспородных крысах-самцах массой 180–220 г. При выполнении эксперимента придерживались «Общих этических принципов экспериментов с животными» (Киев, 2001),

гармонизированных с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для эксперимента или с другой научной целью» (Страсбург, 1985). Животных рандомизировали на 4 группы по 5 особей: 1 группа – ложнооперированные (ЛО), которым выполняли все элементы хирургического вмешательства, кроме окклюзии сосудов; 2 – контрольная патология (ишемия-реперфузия (ИР) головного мозга); 3 – животные с ИР, получавшие препарат сравнения цитиколин в дозе 250 мг/кг внутривентрикулярно (в/в) (Сомазина, Ferrer International; SA, Испания); 4 – животные с ИР, получавшие тетрапептид КК-1 (0,02 мг/кг интраназально (и/н)). Все препараты вводили в терапевтическом режиме ежедневно 1 раз в сутки. Период наблюдения составил 4 суток.

Модель ИР воспроизводили путём наложения клипс на обе общие сонные артерии длительностью 20 мин под пропофоловым наркозом (60 мг/кг, в/в) [2, 14, 15]. Крысам группы контрольной патологии (КП) интраназально вводили 0,9% раствор NaCl в объеме, эквивалентном объему раствора КК-1.

Активность НСЕ и содержание белка S-100 в сыворотке крови измеряли на 4 сутки (острая фаза ишемического повреждения) после ИР методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов NSE ELISA KIT (DAI, США) и S 100 ELISA KIT (Fujirebio Diagnostics Inc., Швеция) на приборе компании «Hipson» (Чешская Республика) [16].

Фрагментацию ДНК в ядрах нейронов лобной части ГМ крыс исследовали методом проточной цитометрии [17, 18]. Ядерную суспензию получали путем добавления к ткани мозга раствора для исследования ядерной ДНК CyStain DNA (Partec, Германия), которая позволяет одновременно экстрагировать ядра и метить ядерную ДНК дамидинофенилиндолом. Использовали также специальные одноразовые фильтры CellTrics 50 мкм (Partec, Германия). Ядерные суспензии биоптата мозга готовили сразу после забора материала и промывки холодным (от +4 °С до +8 °С) фосфатносолевым буфером pH 7,4 (Sigma, США). Анализ проводили на многофункциональном научно-исследовательском цитометре «Partec PAS» (Partec, Германия). Для каждого образца ядерной суспензии проводили анализ 10 тыс. событий [17].

Распределение ДНК у разных животных приведено на гистограммах с использованием линейной шкалы. Анализ фрагментации ДНК выполнен с использованием программного обеспечения FloMax (Partec, Германия) путём выделения Sub-G1 участка на ДНК-гистограммах [17].

Результаты обрабатывали статистически. В случае нормального распределения использовали t-критерий Стьюдента, в

случае его отсутствия – T-критерий Манна-Уитни. Статистически достоверными считали результаты при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На 4 сутки реперфузионного периода уровень НСЕ в сыворотке крови крыс группы КП возрастает на 183,5% (таблица 1) в сравнении с показателем ложнооперированных животных ($p < 0,05$).

Таблица 1 – Влияние тетрапептида КК-1 на уровень нейрон-специфической енолазы в сыворотке крови крыс при ишемии-реперфузии головного мозга

Условия эксперимента	Нейрон-специфическая енолаза, нг/мл
ЛО, n=5	0,886±0,034
ОНМК (КП), n=5	2,512±0,115* (+ 183,5)
ОНМК + цитиколин 250 мг/кг, в/б, n=5	1,698±0,045*# (+ 91,65)
ОНМК + КК-1 0,02 мг/кг, и/н, n=6	1,116±0,014*^# (+ 25,96)

Примечание: 1. ЛО – ложнооперированные, КП – контрольная патология; 2. Статистически значимые различия ($p \leq 0,05$): * – с группой ЛО, ^ – с группой цитиколина, # – с группой КП. 3. В скобках – % изменений к группе ЛО.

В этих же условиях уровень другого маркера нейродеструкции – белка S-100 – повышается в 13,4 раза ($p < 0,05$). Такие показатели (таблица 2) свидетельствуют в

пользу массивной гибели ткани ГМ и, согласно литературным данным, превалирования некротического типа гибели нейронов над апоптотическим [12].

Таблица 2 – Влияние тетрапептида КК-1 на уровень белка S-100 в сыворотке крови крыс при ишемии-реперфузии головного мозга

Условия эксперимента	Белок S-100, нг/мл
ЛО, n=5	0,496±0,030
ОНМК (КП), n=5	6,668±0,266* (+ 1244,36)
ОНМК + цитиколин 250 мг/кг, в/б, n=5	2,238±0,093*# (+ 351,21)
ОНМК + КК-1 0,02 мг/кг, и/н, n=6	1,248±0,038*^# (+ 151,61)

Примечание: 1. ЛО – ложнооперированные, КП – контрольная патология; 2. Статистически значимые различия ($p \leq 0,05$): * – с группой ЛО, ^ – с группой цитиколина, # – с группой КП. 3. В скобках – % изменений к группе ЛО.

Тетрапептид КК-1 предупреждает резкое повышение НСЕ и S-100. В частности, уровень НСЕ возрастает только на 26% по сравнению с показателем животных группы ЛО. Этот показатель соответственно в 2,3 и 1,5 раза меньше, чем в группах КП и цитиколина ($p < 0,05$). Также наблюдается менее выраженный рост содержания белка S-100 в сыворотке крови крыс. Он составляет 151,6% уровня ложнооперированных крыс, что в 5,3 и 1,8 раза меньше соответствующего показателя групп КП и цитиколина ($p < 0,05$).

Снижение уровня маркеров нейродеструкции на фоне терапии тетрапептидом КК-1 свидетельствует об уменьшении очага некротической гибели нейронов в зоне

ишемии, а также об угасании процесса глиоцитарного замещения погибших нейронов [19, 20, 21]. Такое действие исследуемого нейропептида объясняет его способность повышать выживаемость, снижать неврологический и когнитивный дефицит при ОНМК, реализуя интегральный защитный эффект при ишемии ГМ.

Данные, приведенные в таблице 3, свидетельствуют о статистически достоверном росте уровня фрагментированной ДНК в группе КП в 2,7 раза через 96 ч после моделирования ОНМК. Такая динамика указывает на формирование очага повреждения мозговой ткани путем нейроапоптоза [12]. Типичная гистограмма крысы из группы ЛО приведена на рисунке 1,

Таблица 3 – Влияние тетрапептида КК-1 на уровень фрагментированной ДНК в головном мозге крыс при ишемии-реперфузии

Условия эксперимента	Фрагментация ДНК через 96 ч, %
ЛО, n=5	6,332±0,838
ОНМК (КП), n=5	17,250±0,672* (+ 172,43)
ОНМК + цитиколин 250 мг/кг, в/б, n=5	12,906±0,497*# (+ 103,82)
ОНМК + КК-1 0,02 мг/кг, и/н, n=6	11,528±0,336^*# (+ 82,06)

Примечание: 1. ЛО – ложнооперированные, КП – контрольная патология; 2. Статистически значимые различия (p≤0,05): * – с группой ЛО, ^ – с группой цитиколина, # – с группой КП. 3. В скобках – % изменений к группе ЛО.

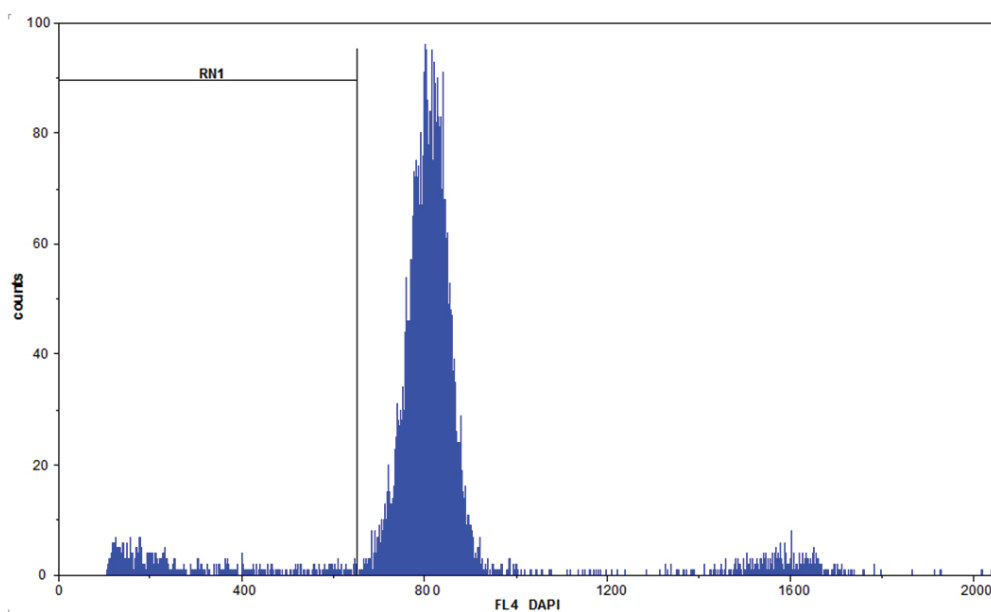


Рисунок 1 – RN1 (Sub-G1) – 6,13%. Фрагментация ДНК (6,13%) в ядрах нейронов коры головного мозга ложнооперированной крысы. Проточная цитометрия

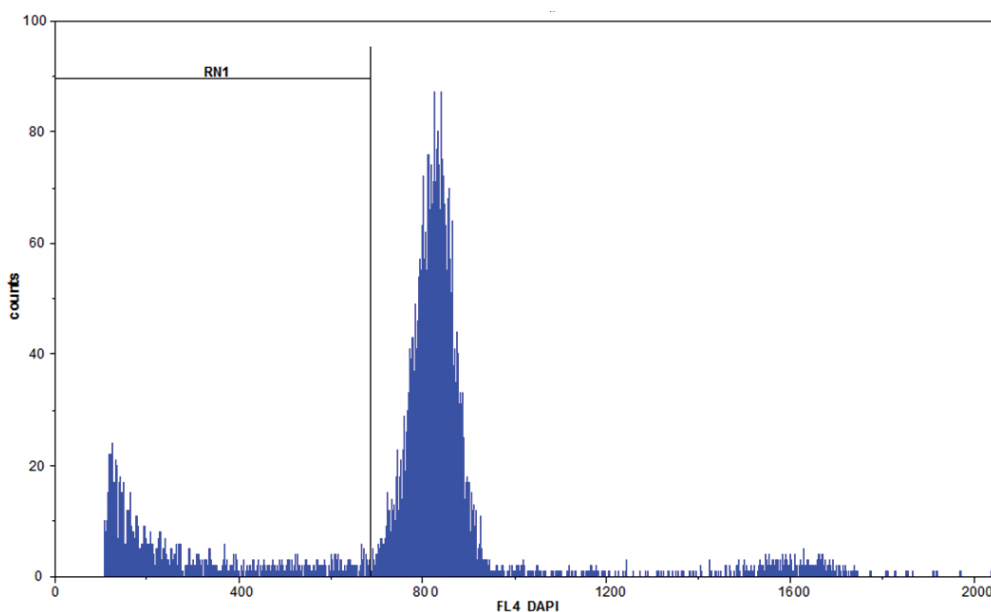


Рисунок 2 – RN1 (Sub-G1) – 17,94%. Фрагментация ДНК (17,94%) в ядрах нейронов коры головного мозга крысы группы контрольной патологии (церебральная ишемия-реперфузия). Проточная цитометрия

из группы КП – на рисунке 2.

Нейропептид КК-1 статистически достоверно снижает содержание фрагментированной ДНК в 1,5 раза ($p < 0,05$), превышая цитиколин. Из полученных экспериментальных данных можно сделать вывод,

что тетрапептид КК-1 реализует церебро-протекторное действие за счет предотвращения апоптотической гибели нейронов.

Типичные гистограммы крыс из групп цитиколина и КК-1 приведены на рисунках 3 и 4 соответственно.

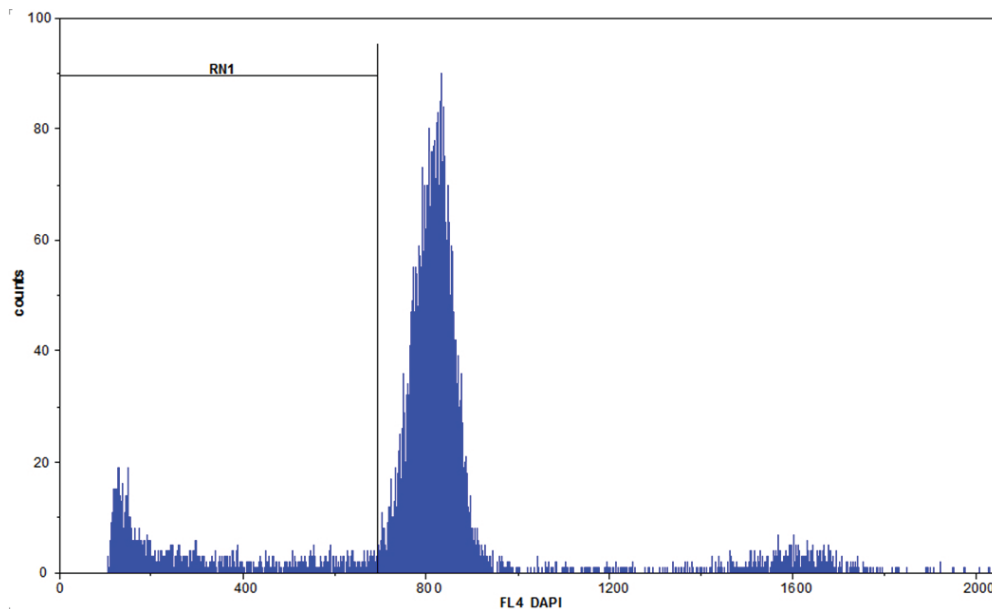


Рисунок 3 – RN1 (Sub-G1) – 14,52%. Фрагментация ДНК (14,52%) в ядрах нейронов коры головного мозга крысы с моделью церебральной ишемии-реперфузии, получавшей лечение цитиколином. Проточная цитометрия

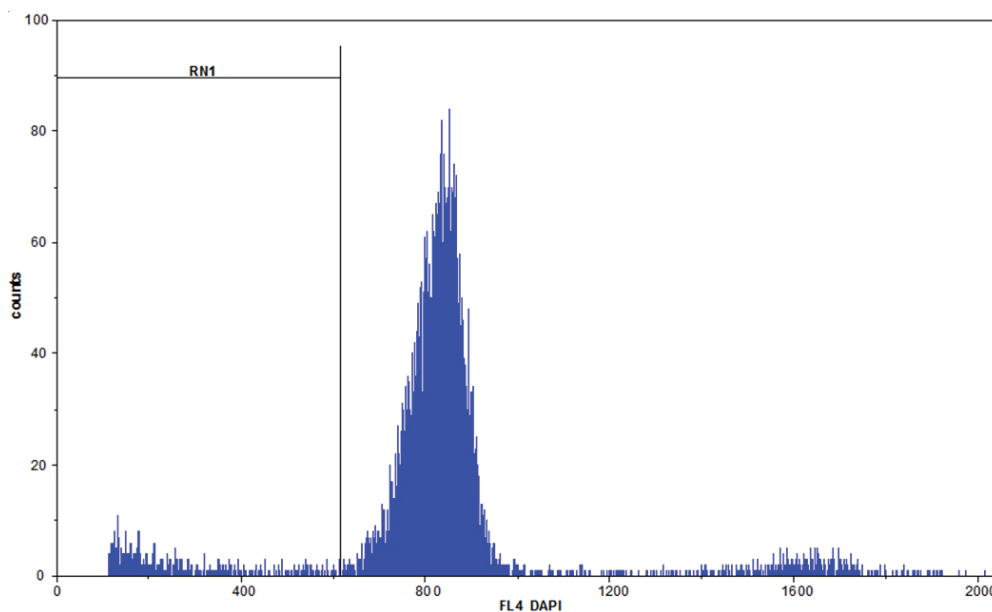


Рисунок 4 – RN1 (Sub-G1) – 6,78%. Фрагментация ДНК (6,78%) в ядрах нейронов коры головного мозга крысы с моделью церебральной ишемии-реперфузии, получавшей лечение тетрапептидом КК-1. Проточная цитометрия

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Экспериментальная 20-минутная ишемия-реперфузия головного мозга крыс формирует стойкий очаг некротической и апоптотической гибели нейронов, проявляющийся ростом уровня нейрон-специфической енолазы (на 183,5%), белка S-100 (в 13,4 раза) и фрагментированной ДНК (в 2,7 раза).

2. Тетрапептид КК-1 оказывает терапевтическое действие при модельном ОНМК. Оно проявляется уменьшением процессов нейродеструкции и нейроапоптоза. Уровень маркеров обоих патологических процессов уменьшается в 2,3 (NSE), 5,3 (S-100) и 1,5 раза (фрагментированная ДНК) относительно группы КП. По этим свойствам КК-1 превышает цитиколин – известный нейропротектор.

3. Способность тетрапептида КК-1 уменьшать нейродеструкцию и нейроапоптоз в зоне ишемического поражения ГМ является звеном его политропного механизма нейропротекторного действия.

SUMMARY

R. D. Deiko, S. Yu. Shtrygol, A. A. Kolobov,
O. A. Khodakovskiy, I. L. Chereshniuk
THE INFLUENCE OF NEW
NEUROPROTECTOR ACETYL-(D-LYS)-
LYS-ARG-ARG-AMIDE (KK-1)
ON NEURODESTRUCTION AND
NEUROAPOPTOSIS OF RATS IN
CONDITIONS OF ACUTE STROKE

The article described results of the experimental investigation of original peptidergic neuroprotector Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide (KK-1), which is homologue of the ACTH_{15-18}} primary amino acids sequence. The influence of KK-1 on the content of neurodestruction markers – neuron-specific enolase (NSE) and S-100 protein in the blood in conditions of 20-min brain ischemia-reperfusion was investigated. The influence of KK-1 on fragmented DNA level into neuron nucleus of frontal brain part (apoptosis marker) was investigated in the same conditions. It was founded that once-daily for 4 days therapeutic intranasally KK-1 administration contributes decrease of the NSE, S-100 and fragmented DNA levels (in 2.3, 5.3 and 1.5 times respectively compared with control group). KK-1 normalizes the levels of neurodestruction and apoptosis markers better than well-known

neuroprotector citicoline. Thus, the obtained results make possible to draw a conclusion that KK-1 capabilities to reduce the neurodestruction and apoptosis into brain injury zone are the link of its neuroprotective action polytropic mechanism.

Keywords: tetrapeptides, cerebral ischemia, neurodestruction, neuroapoptosis, experiment.

ЛИТЕРАТУРА

1. Віничук, С. М. Гострий ішемічний інсульт / С. М. Віничук, М. М. Прокопів. – К.: Наукова думка, 2006. – 159 с.

2. Manual of Stroke Models in Rats / Edited by Yanling Wang-Fisher. – London, New York: CRC Press, 2009. – 332 p.

3. Molecular pharmacology: from DNA to drug discovery / J. Dickenson [et al.]. – New York: John Wiley&Sons Ltd., 2013. – 409 p.

4. Острая церебральная недостаточность / В. И. Черний [и др.]; под ред. В. И. Черния. – 4-е изд., испр. и доп. – Донецк: Издатель Заславский А. Ю., 2010. – 434 с.

5. Encyclopedia of Molecular Pharmacology / Edited by Offermans S., Rosenthal W. – 2nd edition. – Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 2008. – 1505 p.

6. Психофармакологический профиль ноотропоподобных пептидов / П. Д. Шабанов [и др.] // Психофармакология и биологическая наркология. – 2009. – Т. 9. – Вып. 1–2. – С. 2517–2523.

7. Стресс-протекторная активность синтетического пептида CH₃CO-Lys-Lys-Arg-Arg-NH₂ (протектина) / Ю. А. Ковалицкая [и др.] // Биоорг. химия. – 2009. – № 35 (4). – С. 493–500.

8. Церебропротекторные свойства оригинальных пептидов, гомологичных первичной последовательности АКТГ15-18 (экспериментальное исследование) / Р. Д. Дейко [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2015. – № 2. – Т. 14. – С. 27–30.

9. Патент № 2537560 С2 Россия, МПК C07K 5/11 (2006.1) A61K 38/07 (2006.1) A61P 25/00 (2006.1) Тетрапептид и средство, обладающее церебропротекторной и антиамнестической активностями (варианты) / Дейко Р.Д., Кампе-Немм Е.А., Колобов А.А., Шпень В.М., Штрыголь С.Ю.; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «На-

учно-производственная фирма «ВЕРТА» (RU). – Заявка 2013119051/04, 25.04.2013; заявл. 25.04.2013; опубл. 10.01.2015. – Бюл. № 1, 2015. – 13 с.

10. Дослідження психотропних властивостей та взаємодії з речовинами пригнічувальної та збуджувальної дії нових олігопептидів, гомологічних первинній амінокислотній послідовності ділянки АКГГ 15-18 / Р. Д. Дейко [та інш.] // Український біофармацевтичний журнал. – 2015. – № 1 (36). – С. 14–20.

11. Корекція неврологічних і когнітивних порушень при церебральній ішемії оригінальними нейроактивними олігопептидами / Р. Д. Дейко [та інш.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – № 1. – С. 24–29.

12. Нейрон-специфические белки – маркеры энцефалопатии при тяжелой сочетанной травме / Е. В. Григорьев [и др.] // Медицина неотложных состояний. – 2010. – № 2 (27). – С. 72–76.

13. Knight R. A. Cell death in disease: from 2010 onwards / R. A. Knight, G. Melino // Cell Death Dis. – 2011. – V. 2. – P. 202.

14. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. докт. мед. наук А. Н. Миронова. – Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

15. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Дж. П. Хьюстон; пер. с англ. Е. Н. Живописцевой; под ред. проф. А. С. Батуева. – М.: Высшая школа, 1991. – 399 с.

16. Семененко, А. І. Динаміка активності нейрон-специфічної енолази та вмісту білка S 100 у крові щурів за умов гострого порушення мозкового кровообігу та курсового введення 0,9% розчину NaCl / А. І. Семененко // Фармакологія та лікар-

ська токсикологія. – 2013. – № 6 (36). – С. 9–13.

17. Ходаківський, О. А. Дослідження впливу похідного адамантану адемолау на фрагментацію ДНК ядер нейронів лобних часток кори за ішемії-реперфузії головного мозку у щурів / О. А. Ходаківський, І. Л. Черешнюк // Укр. вісник психоневрол. – 2013. – Т. 21, № 1 (74). – С. 26–28.

18. Ходаковский, А. А. Особенности формирования постреперфузионного повреждения нейронов – характеристика модели «ишемия-реперфузия». Новые направления и перспективы развития современной церебропротекторной терапии ишемического инсульта / А. А. Ходаковский, Л. И. Маринич, О. В. Багаури // Врач-аспирант. – 2013. – № 3 (58). – С. 69–76.

19. Нейропротекция: модели, механизмы, терапия / Под ред. М. Бэра; пер. с англ.; под ред. В. П. Зыкова, П. Р. Камчатнова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 429 с.

20. El Ali, Ayman. The role of pericytes in neurovascular unit remodeling in brain disorders / Ayman. El Ali, P. Thériault, S. Rivest // Int. J. Mol. Sci. – 2014. – № 15. – P. 6453–6474.

21. Nouh, A. Ischemic posterior circulation stroke: a review of anatomy, clinical presentations, diagnosis, and current management / A. Nouh [et al.] // Frontiers in Neurology. – 2014. – Vol. 5. – Article 30.

Адрес для корреспонденции:

61002, Украина,
г. Харьков, ул. Пушкинская, 53,
Национальный фармацевтический
университет, кафедра фармакологии,
тел. (057) 706 30 69,
e-mail: roman.deyko@mail.ru,
Дейко Р. Д.

Поступила 02.12.2015 г.