

УДК 525.235; 538.958

## **ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА СЕМАКС ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ ПО ОЦЕНКЕ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ**

Власова И.М., Буравцов Д.Е., Салецкий А.М.

*МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: vlasovairina1979@mail.ru*

В работе исследовано нейропротекторное действие препарата Семакс на ткани головного мозга при ишемическом инсульте (ишемии головного мозга) по оценке свободнорадикального повреждения липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) сыворотки крови крыс методами флуоресцентного анализа.

В наших предыдущих исследованиях оптико – спектральными методами были зарегистрированы отличия в ЛПНП сыворотки крови животных, перенесших экспериментальную ишемию головного мозга, по сравнению с ЛПНП сыворотки крови контрольной группы здоровых животных. Эти изменения состояли в свободнорадикальном окислительном повреждении ненасыщенных жирных кислот внешнего амфипатического фосфолипидного слоя ЛПНП сыворотки крови животных после ишемии головного мозга. Зарегистрированные изменения ЛПНП, произошедшие вследствие ишемии головного мозга, нами были объяснены в рамках свободнорадикальной теории окислительного стресса. При ишемии происходит повышенное образование активных форм кислорода (АФК) по двум причинам. Первая из них – нарушение окислительного фосфорилирования в тканях головного мозга, приводящее к образованию супероксид-радикала  $O_2^{\bullet-}$ . Вторая – включение воспалительной линии защиты организма при некрозе ткани головного мозга, т.е. активация макрофагов и нейтрофилов, производящих множество свободнорадикальных соединений ( $O^{\bullet-}_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $NO^{\bullet}$ ) за счёт своих ферментативных систем. Накопление при ишемии свободнорадикальных продуктов в ткани мозга приводит к их последующему попаданию в кровь и к повреждению компонентов крови, в частности, к модификации липопротеинов (особенно этому подвержены ЛПНП) крови.

Среди исследований механизмов защиты головного мозга от повреждения при ишемии большую роль сейчас играют работы, связанные с изучением медикаментозных препаратов, обладающих нейропротекторным действием. Одним из таких препаратов является синтетический полипептид Семакс (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro).

Семакс – это синтетический полипептид, аналог фрагмента 4-7 адренокортикотропного гормона (АКТГ), лишенный гормональной активности. Семакс усиливает сопротивление организма при гипоксии и ишемии головного мозга.

## МЕТОДЫ

Работа проводилась на сыворотке крови крыс ( $n = 28$ ) популяции Вистар (молодые самки массой  $200 \pm 30$  г.). Животные делились на две равные группы: в первой группе ( $n = 14$ ) внутрибрюшинно вводился препарат Семакс (100 мкл на 100 г. веса), во второй (контрольной) группе ( $n = 14$ ) внутрибрюшинно вводился физиологический раствор в том же объеме. В обеих группах проводилась экспериментальная ишемия головного мозга. Животные предварительно наркотизировались внутрибрюшинной инъекцией хлоралгидрата (350 мг/мл). Полная глобальная ишемия головного мозга достигалась путём прекращения тока крови через обе внутренние сонные артерии на 2 часа. Первое введение Семакса в первой группе и физиологического раствора во второй группе проводилось спустя 15 мин после начала процедуры ишемии. Второе введение Семакса в первой группе и физиологического раствора во второй группе было выполнено уже после окончания процедуры ишемии головного мозга, спустя 15 мин после реперфузии.

В обеих группах животных с целью оценки фармакокинетического действия препарата Семакс было проведено несколько заборов крови: 1 забор – до операции ишемии головного мозга, 2 забор – спустя 1 сутки после операции, 3 забор – спустя 2 суток после операции, 4 забор – спустя 3 суток после операции, 5 забор – спустя 5 суток после операции, 6 забор – спустя 7 суток после операции, 7 забор – спустя 10 суток после операции. Из образцов крови получали сыворотку крови.

Флуоресцентно – спектральные исследования проводились с помощью спектрофлуориметра LS 55 (Perkin Elmer).

При возбуждении сыворотки крови светом с длиной волны  $\lambda_{возб} = 350$  нм спектры флуоресценции измерялись в диапазоне от 400 нм до 600 нм. Измерены спектры флуоресценции образцов сыворотки крови обеих групп животных, полученных в различные дни для изучения кинетики действия Семакса, а также произведено усреднение спектров в каждой из этих двух групп животных.

Влияние Семакса на уровень окислительного стресса организма по оценке повреждения ЛПНП сыворотки крови также было исследовано с помощью флуоресцентного молекулярного зонда родамина 6Ж, который добавлялся в исследуемые образцы сыворотки обеих групп

животных в концентрации 60 мкМ. Флуоресценция родамина 6Ж в образцах сыворотки крови регистрировалась в диапазоне 540 – 660 нм при возбуждении светом с длиной волны  $\lambda_{\text{возб}} = 530$  нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследований были проведены измерения спектров флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 350$  нм) полученных в различные дни образцов сыворотки крови крыс обеих групп: как группы, получавшей Семакс, так и контрольной группы, получавшей физиологический раствор.

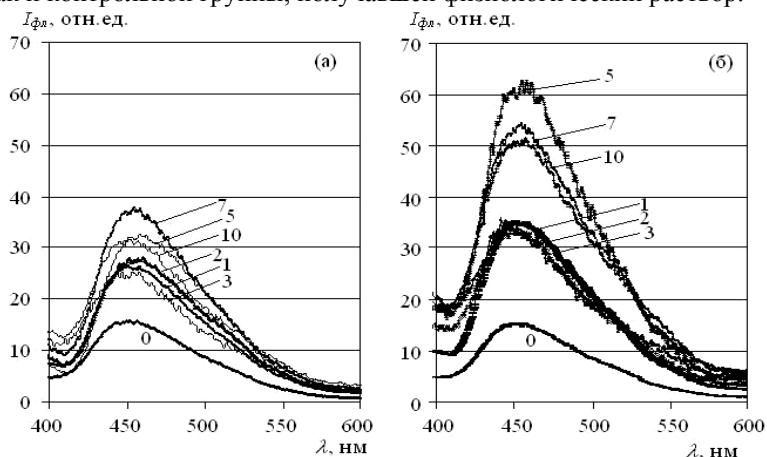


Рис. 1. Спектры флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 350$  нм) сыворотки крови крыс, получавших либо Семакс (а), либо физиологический раствор (б), в различные дни (номер спектра обозначает номер дня после проведения ишемии головного мозга, 0-измерение проведено до процедуры ишемии).

На рис. 1 представлены спектры флуоресценции образцов сыворотки крови крыс, перенесших экспериментальную ишемию головного мозга, и получавших либо Семакс (а), либо физиологический раствор (б). После процедуры ишемии головного мозга наблюдается увеличение интенсивности в максимуме спектров флуоресценции сыворотки крови в обеих группах животных по сравнению с интенсивностью в максимуме спектров флуоресценции сыворотки крови животных до ишемии головного мозга. Данный эффект объясняется в рамках свободнорадикальной теории окислительного стресса. При ишемии головного мозга в его тканях образуются АФК, которые затем попадают в кровоток и повреждают фосфолипидные

компоненты ЛПНП, окисляя их и образуя в них вместо ненасыщенных жирных кислот липопероксидные соединения.

На рис. 2 представлена диаграмма, отражающая зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции ( $\lambda_{возб} = 350$  нм) сыворотки крови животных двух групп от номера дня после проведения процедуры экспериментальной ишемии головного мозга. В первые 3 дня после процедуры ишемии головного мозга отличия между двумя группами животных. Существенные отличия начинаются после 3 дня после ишемии головного мозга. Хотя в обеих группах наблюдается увеличение интенсивности в максимумах спектров флуоресценции сыворотки крови, но при этом в контрольной группе животных, получавших физиологический раствор, это увеличение намного больше (в 1,9 раза по сравнению с третьим днем после операции) по сравнению с группой животных, получавших Семакс (в 1,5 раза по сравнению с третьим днем после операции).

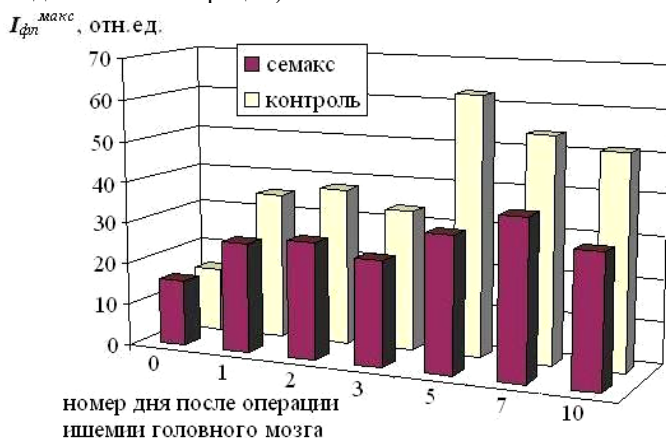


Рис. 2. Зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции ( $\lambda_{возб} = 350$  нм) сыворотки крови животных двух групп (получавших либо Семакс, либо физиологический раствор) от номера дня после проведения процедуры экспериментальной ишемии головного мозга (0-столбцы – представляют интенсивность в максимуме спектра флуоресценции сыворотки крови животных до проведения ишемии головного мозга).

Данный эффект скорее всего объясняется влиянием препарата Семакс на воспалительную линию защиты организма, включающуюся при некрозе ткани головного мозга вследствие ишемической процедуры. Усиление производства АФК и продуктов пероксидного окисления липидов в клетках тканей головного мозга является универсальным

ответом клеток на начальной стадии воспаления вследствие некроза ткани после ишемии. В очаге воспаления, образовавшемся при некрозе ткани, продукты пероксидного окисления липидов модулируют метаболическую активность фагоцитирующих клеток. Таким образом, первичные продукты пероксидного окисления липидов, образовавшиеся вследствие сбоев окислительного фосфорилирования, оказывают существенное влияние на включение и развитие воспалительной реакции. Так запускается порочный круг или состояние «хронического окислительного стресса», для поддержания которого необходимо поступление фагоцитирующих клеток и наличие субстратов окисления – ненасыщенных жирных кислот.

Воспалительная линия защиты организма включается не сразу после ишемии головного мозга, а спустя 2-3 дня. Как видно, у группы животных, получавших Семакс, сильных окислительных повреждений компонентов крови спустя 3 дня после ишемической операции не наблюдается, что указывает на влияние Семакса на уровень работы воспалительной линии защиты при ишемии головного мозга – Семакс останавливает хронический окислительный стресс.

Нейропротекторное действие Семакса на уровень окислительного стресса в тканях головного мозга по оценке свободнорадикального повреждения компонентов крови при ишемии головного мозга также было исследовано при помощи использования флуоресцентного зонда родамина 6Ж.

На рис. 3 представлена диаграмма, отражающая зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 530 \text{ нм}$ ) родамина 6Ж, добавленного в сыворотку крови животных двух групп, от номера дня после проведения процедуры экспериментальной ишемии головного мозга. Видно, что после ишемии головного мозга наблюдается увеличение интенсивности в максимуме спектров флуоресценции родамина 6Ж, добавленного в сыворотку крови, в обеих группах животных. В первые 3 дня после процедуры экспериментальной ишемии головного мозга отличия между двумя группами животных в интенсивностях в максимумах спектров флуоресценции родамина 6Ж в сыворотке крови незначительны. Однако, начиная с 3 дня после ишемии головного мозга, наблюдается сильное увеличение (в 1,5 раза относительно третьего дня после ишемии) флуоресценции родамина 6Ж, добавленного в сыворотку крови животных, получавших физиологический раствор, по сравнению с группой животных, получавших Семакс (в 1,2 раза относительно третьего дня после ишемии). Следовательно, с помощью

флуоресцентного зонда родамина 6Ж по оценке свободнорадикального повреждения компонентов крови подтверждено уменьшение окислительного повреждения тканей головного мозга под действием препарата Семакс.

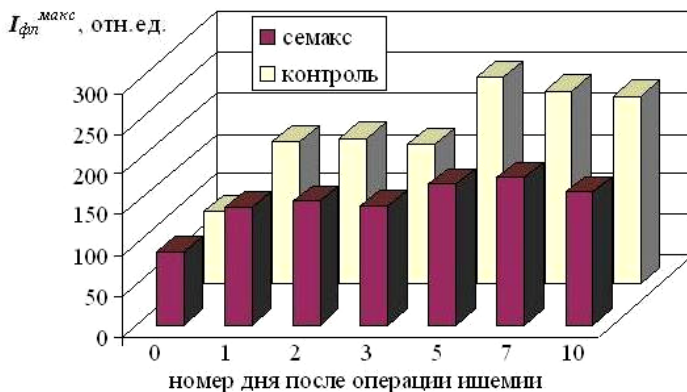


Рис. 3. Зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 530 \text{ нм}$ ) родамина 6Ж (60 мкМ), добавленного в сыворотку крови животных двух групп (получавших либо Семакс, либо физиологический раствор), от номера дня после проведения процедуры экспериментальной ишемии головного мозга (0-столбцы – представляют интенсивность в максимуме спектра флуоресценции родамина 6Ж, добавленного в сыворотку крови животных до проведения ишемии головного мозга).

Как указывалось выше, при ишемии головного мозга происходит повышенное образование АФК по двум причинам. Первая из них – нарушение окислительного фосфорилирования в тканях головного мозга. Вторая – включение воспалительной линии защиты организма при некрозе ткани головного. Вследствие сбоя окислительного фосфорилирования в клетках тканей головного мозга АФК образуются сразу после ишемии головного мозга или в течение 1 дня. Включение воспалительной линии защиты организма при некрозе тканей головного мозга при ишемии происходит позднее – спустя 2 - 3 дня после ишемической процедуры. Как видно из наших экспериментов, препарат Семакс уменьшает окислительный стресс в тканях головного мозга при ишемии, уменьшая вклад второй причины – уменьшая производство свободнорадикальных соединений при включении воспалительной линии защиты организма и останавливая хронический окислительный стресс.