

bro blastic activation of hepatic stellate cell in collagen // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 4820-4828.

11. Ju C., Tacke F. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies // Cell. Mol. Immunol. – 2016. – Vol. 13. – P. 316-27.

12. Kaufman D., Fairchild K. D. Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants // Clinical Microbiology Reviews. – 2004. – Vol. 17, № 3. – P. 638-680.

13. Paula M.O., Fonseca D.M, Wowk P.F., et al. Host genetic background affects regulatory T-cell activity that influences the magnitude of cellular immune response against Mycobacterium tuberculosis // Immunol. Cell. Biol. – 2010. – Vol. 89, № 42. – P. 526-534.

14. Zitka O., Kukacka J., Krizkova S., Huska D., Adam V., Masarik M., Prusa R., Kizek R. Matrix metalloproteinases // Curr. Med. Chem. – 2010. – Vol. 17, № 31. – P. 3751-3768.

Координаты для связи с авторами: Мозолева Софья Павловна – аспирант кафедры патологической анатомии НГМУ; Надеев Александр Петрович – д-р мед. наук, зав. кафедрой патологической анатомии, профессор НГМУ, тел. +7-913-928-80-34, e-mail: nadeevngma@mail.ru; Позднякова Светлана Васильевна – д-р биол. наук, профессор кафедры фармакологии НГМУ; Агеева Татьяна Августовна – д-р мед. наук, профессор кафедры патологической анатомии НГМУ.



УДК 612.015.1:616.341-018.822]:617.51-001.4:599.323.4-092.9

М.Ю. Флейшман, И.В. Толстенков, А.А. Иннокентьев

ВЛИЯНИЕ ГЛИПРОЛИНСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА «СЕЛАНК» НА АКТИВНОСТЬ ЗОН ЯДРЫШКОВОГО ОРГАНИЗАТОРА В ЭПИТЕЛИОЦИТАХ ТОНКОЙ КИШКИ БЕЛЫХ КРЫС

Дальневосточный государственный медицинский университет,
680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8-(4212)-76-13-96, г. Хабаровск

Резюме

Изучали параметры нуклео-нуклеолярного аппарата (средняя площадь ядра, средняя суммарная площадь ядрышек, среднее количество ядрышек) в эпителиоцитах двенадцатиперстной кишки белых крыс после нанесения черепно-мозговой травмы и введения пептида Tyr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro («Селанк»). В первой группе животные получали 0,9 % раствор хлорида натрия (без травматизации черепа), во второй группе – наносили травму и вводили 0,9 % раствор хлорида натрия, третья группа получала «Селанк» после травмы. На 6-е сутки после нанесения травмы животные выводились из эксперимента. Полученные гистологические срезы двенадцатиперстной кишки окрашивали по методу Ag-NORs. После черепно-мозговой травмы имело место снижение размеров ядер эпителиоцитов, суммарной площади и количества ядрышек. Введение пептида «Селанк» приводило к коррекции постстрессорных изменений в эпителии кишечника.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, глипролины, ядрышки.

M.Yu. Fleishman, I.V. Tolstenok, A.A. Innokentev

INFLUENCE OF GLYPROLINE-CONTAINING MEDICATION «SELANK» ON NUCLEAR ORGANIZER REGIONS ACTIVITY IN DUODENUM EPITHELIUM OF WHITE RATS

Far Eastern State Medical University, Khabarovsk

Summary

The authors studied the effect of glyprolines-containing medication «Selank» on Nuclear Organizer Regions (NORs) activity in duodenum epithelium of white rats after traumatic brain injury. In this experiment, Selank was intraperitoneally injected to rats (first injection in 3 hours after traumatic brain injury) in a daily dose of 1 mg/kg for 5 days. The animals were sacrificed by decapitation on day 6. Parameters of NORs were evaluated by computer cytomorphometry on a complex image analyzer in duodenum epithelium of white rats stained using AgNOR technique. The area of duodenum epitheliocytes nuclei, number of nucleoli, and total area of nucleoli above the nucleus were analyzed. The areas of the nuclei and NOR were calculated from measurements of 50 cells. Thus, traumatic brain injury reduces the activity of NOR in duodenum epitheliocytes in comparison with the control. Against the background of traumatic brain injury, peptide significantly increased the NOR activity.

Key words: traumatic brain injury, glyprolines, nucleoli.

Аминокислотные последовательности, включающие Gly и Pro, обладают собственным спектром биологической активности, а также способны стабилизировать пептидные молекулы. Глипролин Pro-Gly-Pro (PGP), присоединенный к последовательности Tyr-Lys-Pro-Arg, известен под торговым названием «Селанк». Этот лекарственный препарат обладает выраженными анксиолитическими свойствами [7, 10]. В работе Т.Н. Соллертинской и соавт. был выявлен компенсаторный эффект пептида «Селанк» при всех типах невротических расстройств у приматов, а также антиэпилептический эффект [13]. Описано антистрессорное влияние глипролинов: глипролины уменьшают стрес-

согенное нарушение поведения у экспериментальных животных [8].

Одним из классических проявлений стрессорных реакций является нарушение целостности слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. Серьезную клиническую проблему представляют эрозивно-язвенные нарушения желудка и тонкого кишечника у пациентов с черепно-мозговой травмой [16].

Целью исследования было изучить влияние глипролинсодержащего пептида «Селанк» на эпителиоциты тонкого кишечника белых крыс, подвергнутых закрытой черепно-мозговой травме.

Материалы и методы

В работе использовали 25 половозрелых беспородных белых крыс-самцов массой 280-320 г. Эксперимент проводился в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации, приказа Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики», «Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях».

В работе использовали ударную модель черепно-мозговой травмы (ЧМТ) (WDM – weight drop method). В зависимости от веса животного, рассчитывается масса груза и высота его падения [4].

Было сформировано три экспериментальные группы:

- 1-я группа – «Контроль» – крысы, которым ЧМТ не наносили и в течение 5 дней внутрибрюшинно инъецировали 1 мл 0,9 % NaCl (n=8);
- 2-я группа – «ЧМТ» – крысы, которым наносили ЧМТ и внутрибрюшинно в течение 5 дней вводили 1 мл 0,9 % NaCl (n=8);
- 3-я группа – «ЧМТ + Селанк» – животные, которым через 3 часа после нанесения ЧМТ, а в последующем на 2-е, 3-е, 4-е и 5-е сутки внутрибрюшинно вводили пептид «Селанк» (Tyr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro) в дозе 1 мг/кг массы тела (n=9).

Результаты и обсуждение

У животных, подвергнутых черепно-мозговой травме, в клетках генеративной зоны эпителия двенадцатиперстной кишки происходило достоверное снижение всех исследуемых морфометрических показателей: средняя площадь ядра и средняя суммарная площадь ядрышек снижались на 20 %, а среднее количество ядрышек – на 10 %, по сравнению с контрольной группой (таблица).

В настоящее время считается, что параметры ядрышек отражают анаболическую активность клеток. В быстропролиферирующих клеточных популяциях, к которым относится кишечный эпителий, состояние ядрышек также может косвенно отражать пролиферативную активность ткани. В работе Kobayakov D.S., et al. был сделан вывод о том, что интенсивность аргирофилии прямо пропорциональна потенциальной активности ядрышка. Была выявлена линейная зависимость между количеством РНК-полимераз в клетке и количеством гранул AgNO₃. Это позволило производить

На 6-е сутки животные выводились из эксперимента путем быстрой декапитации с использованием хлороформа в качестве анестезирующего средства.

Тотчас после выведения животных из эксперимента, фрагмент двенадцатиперстной кишки был помещен в 10 % раствор формалина и, после фиксации, подвергнут гистологической обработке по принятой в лаборатории методике. Поперечные срезы двенадцатиперстной кишки были окрашены азотно-кислым серебром по методу AgNORs [9]. Морфометрическую обработку материала осуществляли на анализаторе изображений «МЕКОС-Ц». Кариометрию и нуклеолометрию осуществляли в 50 эпителиоцитах генеративной зоны на продольных срезах крипт кишечника.

Статистический анализ проводили с помощью пакета функций для статистической обработки ПО Statistica 10.0 и Microsoft Excel 2016. Для каждой группы значений представлено среднее арифметическое значение показателя и стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Достоверность различий анализировали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия между значениями рассматривались как достоверные при выполнении условия $p < 0,05$.

оценку степени активности зон ядрышка и клетки в целом, в зависимости от их состояния [15]. Изменение состояния нуклео-нуклеолярного аппарата клетки может быть важным показателем реакции на стрессорное воздействие [3].

Таблица

Показатели цитоморфометрии в клетках покровного эпителия двенадцатиперстной кишки белых крыс

Группа	Средняя площадь ядра	Средняя суммарная площадь ядрышек	Среднее количество ядрышек
Контроль, n=8	40,09±1,58	2,57±0,11	2,32±0,05
ЧМТ, n=8	32,25±3,08*	2,05±0,09*	2,11±0,05*
ЧМТ+Селанк, n=9	40,49±2,89	2,44±0,07**	2,41±0,06**

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «Контроль», ** – $p < 0,05$ по сравнению с группой «ЧМТ».

Выявленные постстрессорные изменения в эпителиоцитах двенадцатиперстной кишки можно объяснить активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы при стрессе, повышением концентрации глюкокортикоидных гормонов в крови [5]. Совокупная стимуляция симпатoadреналовой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систем приводят к снижению кровотока в органах ЖКТ. Возникающая тканевая ишемия способна индуцировать морфологические изменения [14].

Введение пептида Tyr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro («Селанк») после нанесения ЧМТ корректировало параметры нуклео-нуклеолярного аппарата эпителиоцитов. Показатели средней суммарной площади ядрышек и среднего количества ядрышек достоверно увеличивались в сравнении с группой «ЧМТ» (таблица). В отношении всех трех исследуемых показателей цитоморфометрии (таблица), наблюдали отсутствие достоверных отличий между контрольной группой и группой «ЧМТ+Селанк».

В работе И.П. Ашмарина и соавт. был проведен анализ распределения пептидов PGP и Tyr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro по тканям и органам белых крыс. Было выявлено, что глипролиновые пептиды тропны к тканям желудочно-кишечного тракта [1]. С.Е. Жуйкова и соавт. в своей работе показали, что глипролиновый трипептид Pro-Gly-Pro оказывает выраженный гастропротективный противоязвенный эффект на различных

моделях язвообразования, включая стрессорные язвы [6]. При протеолизе пептида «Селанк» возможно образование фрагментов глипролинов, в том числе Pro-Gly-Pro, препятствующих развитию стрессогенных нарушений микроциркуляции в слизистой кишечника [12]. Глипролины обладают прямым сосудорасширяющим действием [2]. Предотвращение снижения локального кровотока, вызванного действием ulcerогенного фактора, считают одним из механизмов гастропротективного действия пептида «Селанк» [11]. Результаты проведенного исследования демонстрируют протективное действие пептида «Селанк» на состояние слизистой тонкого кишечника при черепно-мозговой травме.

Введение пептида «Селанк» регулирует постстрессорное угнетение белоксинтетической активности эпителиоцитов тонкого кишечника белых крыс, подвергнутых черепно-мозговой травме.

Авторы выражают благодарность д-ру хим. наук, академику Н.Ф. Мясоедову и канд. хим. наук Л.А. Андреевой (отдел химии физиологически активных веществ Института молекулярной генетики РАН) за предоставление субстанции пептида «Селанк». Работа проводилась в рамках государственного задания по теме «Участие регуляторных пептидов глипролинового ряда в поддержании тканевого гомеостаза в физиологических условиях и при развитии патологии».

Литература

1. Ашмарин И.П., Багликова К.Е., Эдеева С.Е. и др. Сравнительный анализ распределения глипролинов при разных способах введения // Биоорганическая химия. – 2008. – Т. 34, № 4. – С. 464-470.
2. Бакаева З.В., Бадмаева К.Е., Сергеев И.Ю. Влияние глипролинов на норадреналиновый тонус изолированного кольцевого сегмента аорты крысы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 135. – № 4. – С. 390-393
3. Бакуев М.М., Магомедов К.К., Шахбанов Р.К., Магомедов М.А. Состояние антиоксидантных систем при различных патологических состояниях организма // Известия Дагестанского государственного педагогического университета. Естественные и точные науки. – 2012. – № 3. – С. 62-67.
4. Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Шевченко К.В., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. Синтез и исследования простых глипролинов // Нейрохимия. – 2016. – Т. 33, № 3. – С. 230-237.
5. Даев Е.В. О стрессе, гемокоммуникации у мышей и физиологической гипотезе мутационного процесса // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 10. – С. 1299-1310.
6. Жуйкова С.Е., Бадмаева К.Е., Бакаева З.В., Самонина Г.Е. Противоязвенные эффекты трипептида PGP и его возможных метаболитов (PG, GP, глицина и пролина) на разных моделях вызова язв у крыс // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2004. – № 5. – С. 585-588.
7. Зозуля А.А., Незнамов Г.Г., Сюняков Т.С. [и др.] Эффективность и механизмы действия нового пептидного анксиолитика «Селанка» при терапии генерализованного тревожного расстройства и неврастении // Журнал Неврологии и Психиатрии им. Корсакова. – 2008. – Т. 108, № 4. – С. 38-48.
8. Копылова Г.Н., Бакаева З.В., Бадмаева С.Е., Умарова Б.А. и др. Терапевтические эффекты глипролинов (PGP, GP, PG) в отношении стрессогенных нарушений поведения крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 143, № 2. – С. 124-128.
9. Коржевский Д.Э. Метод выявления ядрышек в ядрах клеток разных тканей // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1990. – Т. 98. – № 2. – С. 58-60.
10. Мясоедов Н.Ф., Иллариошкин С.Н., Журавлева Е.Ю., Вереютин И.А. Нейропсихологические расстройства при дрожательной форме болезни Паркинсона и эссенциальном треморе: возможности коррекции новым пептидным препаратом Селанк // Клиническая фармакология и терапия. – 2013. – № 22 (5). – С. 81-84.
11. Павлов Т.С. Противоязвенные эффекты Селанка и его фрагментов: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.13, 02.00.10 / Павлов Тенгис Саналович. – Москва, 2006. – 24 с.
12. Смирнова Е.А. Протекторное действие глипролинов и Семакса на стрессогенные нарушения микроциркуляции в брыжейке крыс: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.13 / Смирнова Елена Александровна. – Москва, 2005 – 24 с.
13. Соллертинская Т.Н., Шорохов М.В., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А. Пептидные биорегуляторы Семакс и Селанк в компенсации нарушенных когнитивных функций и межполушарной асимметрии у приматов // Асимметрия. – 2014. – Т. 8, № 4. – С. 53-65.

14. Умарова Б.А., Копылова Г.Н., Лелекова Т.В., Смирнова Е.А. и др. Механизм протекторного действия глипролинов при стрессе и воспалении // *Нейрохимия*. – 2008. – Т. 25, № 1-2. – С. 119-123.
15. Kobyakov D.S., Klimachev V.V., Avdalyan A.M., et al. Argyrophilic Proteins of Nucleolar Organizer Regions and Proliferative Activity of Cells in Squamous Cell Carcinoma of the Lung // *Bulletin of*

Experimental Biology and Medicine. – 2014. – № 5. – С. 677-682.

16. Liu Y., Bao Z., Xu X., et al. Extracellular Signal-Regulated Kinase/Nuclear Factor-Erythroid2-like2/Heme Oxygenase-1 Pathway-Mediated Mitophagy Alleviates Traumatic Brain Injury-Induced Intestinal Mucosa Damage and Epithelial Barrier Dysfunction // *J. Neurotrauma*. – 2017. – Vol. 34, №13. – P. 2119-2131.

Literature

1. Ashmarin I.P., Baglikova K.E., Edeeva S.E., et al. Comparative analysis of the distribution of glyprolines with different administration // *Bioorganic Chemistry*. – 2008. – Vol. 34, № 4. – P. 464-470.
2. Bakaeva Z.V., Badmaeva K.E., Sergeev I.Yu. Influence of glyprolines on the noradrenaline tone of the isolated annular segment of the rat aorta // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2003. – Vol. 135, № 4. – P. 390-393.
3. Bakuev M.M., Magomedov K.K., Shakhbanov R.K., Magomedov M.A. The state of antioxidant systems in various pathological conditions of the body // *News of Dagestan State Pedagogical University. Natural and Exact Sciences*. – 2012. – № 3. – P. 62-67.
4. Vyunova T.V., Andreeva L.A., Shevchenko K.V., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F. Synthesis and study of simple glyprolines // *Neurochemistry*. – 2016. – Vol. 33, № 3. – P. 230-237.
5. Daev E.V. About stress and chemocommunication in mice and the physiological hypothesis of the mutation process // *Genetics*. – 2007. – Vol. 43, № 10. – P. 1299-1310.
6. Zhuikova S.E., Badmaeva K.E., Bakaeva Z.V., Samonina G.E. Antiulcer effects of PGP tripeptide and its possible metabolites (PG, GP, glycine and proline) in different models of ulcer induction in rats // *Bulletin of the Russian Academy of Sciences. Biology Series*. – 2004. – № 5. – P. 585-588.
7. Zozulya A.A., Neznamov G.G., Syunyakov T.S., et al. Efficacy and mechanisms of action of the new anxiolytic peptide «Selank» in the treatment of a generalized anxiety disorder and neurasthenia // *Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. – 2008. – Vol. 108, № 4. – P. 38-48.
8. Kopylova G.N., Bakaeva Z.V., Badmaeva S.E., Umarova B.A., et al. Therapeutic effects of glyprolines (PGP, GP, PG) in rats with stress-induced behavioral disorders // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2007. – Vol. 143, № 2. – P. 124-128.

9. Korzhevsky D.E. Method for the detection of nucleoli in the nuclei of cells of different tissues // *Archive of Anatomy, Histology and Embryology*. – 1990. – Vol. 98, № 2. – P. 58-60.

10. Myasoedov N.F., Illarioshkin S.N., Zhuravleva E.Yu., Vereyutina I.A. Neuropsychological disorders in the trembling form of Parkinson's disease and essential tremor: the possibility of correction with the new peptide drug Selank // *Clinical Pharmacology and Therapy*. – 2013. – № 22 (5). – P. 81-84.

11. Pavlov T.S. Antiulcer effects of Selank and its fragments. Abstract of a thesis ... of a Candidate of Biol. Science: 03.00.13, 02.00.10 / Pavlov Tengis Sanalovich. – M., 2006. – 24 p.

12. Smirnova E.A. The protective effect of glyprolines and Semax on stressogenic microcirculation disorders in the rat mesentery. Abstract of a thesis ... of a Candidate of Biol. Science: 03.00.13 / Smirnova Elena Aleksandrovna. – M., 2005. – 24 p.

13. Sollertinskaya T.N., Shorokhov M.V., Myasoedov N.F., Andreeva L.A. The peptide bioregulators Semax and Selank in compensating the impaired cognitive function and interhemispheric asymmetry in primates // *Asymmetry*. – 2014. – Vol. 8, № 4. – P. 53-65.

14. Umarova B.A., Kopylova G.N., Lelakova T.V., Smirnova E.A., et al. The mechanism of the protective action of gliprolins during stress and inflammation // *Neurochemistry*. – 2008. – Vol. 25, № 1-2. – P. 119-123.

15. Kobyakov D.S., Klimachev V.V., Avdalyan A.M., et al. Argyrophilic proteins of the cellular squamous cellular cell carcinoma of the lung // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2014. – № 5. – P. 677-682.

16. Liu Y., Bao Z., Xu X., et al. Extracellular Signal-Regulated Kinase / Nuclear Factor-Erythroid2-like2 / Heme Oxygenase-1 Pathway-Mediated Mitophagy Alleviates Traumatic Brain Injury-Induced Intestinal Mucosa Damage and Epithelial Barrier Dysfunction // *J. Neurotrauma*. – 2017. – Vol. 34, № 13. – P. 2119-2131.

Координаты для связи с авторами: Флейшман Марина Юрьевна – д-р мед. наук, доцент, главный научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ДВГМУ, тел. 8-(4212)-32-99-64, e-mail: marfl@yandex.ru; Толстенок Иван Владимирович – канд. биол. наук, доцент кафедры химии ДВГМУ, тел. 8-(4212)-32-64-26, e-mail: toiv@bk.ru; Иннокентьев Алексей Андреевич – аспирант ЦНИЛ, тел. 8-(4212)-32-99-64, e-mail: alexey-92@mail.ru.

