

## НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ДИМЕРНОГО ДИПЕПТИДНОГО МИМЕТИКА ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ ГК-2 НА МОДЕЛИ ДВУСТОРОННЕЙ НЕОБРАТИМОЙ ПЕРЕВЯЗКИ СОННЫХ АРТЕРИЙ У КРЫС

П. Ю. Поварнина, Т. А. Гудашева, О. Н. Воронцова, С. В. Николаев,  
Т. А. Антипова, Р. У. Островская, С. Б. Середенин<sup>1</sup>

Изучали поведенческие и биохимические эффекты нового димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 на модели хронической ишемии головного мозга у крыс, вызванной необратимой двусторонней перевязкой сонных артерий. Показано, что ГК-2 при внутривентриальном субхроническом введении (8 инъекций в дозе 0,5 мг/кг, первая инъекция — через 4 ч после операции) предотвращает гибель животных после операции, через две недели значительно снижает дефицит привыкания (англ. — *habituation*) в тесте “открытое поле”, предотвращает снижение исследовательской активности в тесте “исследование новых объектов”, а также полностью восстанавливает жизнеспособность клеток коры большого мозга и снижает сверхэкспрессию HSP70 в коре.

**Ключевые слова:** дипептидный миметик NGF ГК-2; двусторонняя необратимая перевязка сонных артерий; открытое поле; исследование новых объектов; HSP70; NGF

### ВВЕДЕНИЕ

Хронические сосудистые заболевания головного мозга являются по распространенности второй в мире причиной деменции после болезни Альцгеймера. Стратегически значимыми направлениями в терапии цереброваскулярных расстройств являются нормализация гемоперфузии и нейропротекция [9]. Потенциально эффективными в фармакотерапии хронической ишемии мозга являются препараты на основе эндогенного нейропротектора — фактора роста нервов, который участвует в поддержании жизнеспособности и функционирования периферических и центральных нейронов.

Ишемия головного мозга сопровождается увеличением экспрессии мРНК фактора роста нервов, а также содержания самого белка, что, как полагают, свидетельствует о его роли в защите нейронов от гибели [13]. Это увеличение является кратковременным и наблюдается в первые несколько часов после ишемии, затем уровень NGF снижается в поврежденных участках мозга [18]. На различных моделях ишемии головного мозга показано, что NGF при внутримозговом введении значительно повышает выживаемость нейронов, ингибирует экспрессию про-апоптотического белка каспазы-3 и индуцирует экспрессию анти-апоптотического белка Bcl-2 [22]. Однако попытки применения рекомбинантного NGF в клинике были безуспешными в связи с его плохими фармакокинетическими свойствами и развитием побочных эффектов, в частности, болевого синдрома [15]. В настоящее время ряд зарубежных фармацевтических компаний и научных групп ведут разработку низкомолекулярных миметиков NGF [19].

В НИИ фармакологии имени В. В. Закусова РАМН на основе структуры  $\beta$ -изгиба 4-ой петли NGF создан

димерный дипептидный миметик ГК-2 (гексаметилендиамид бис-N-моносукцинил-глутамил-лизина) [6]. Пептид ГК-2 продемонстрировал высокую NGF-подобную нейропротекторную активность в наномолярных концентрациях в экспериментах *in vitro*. При внутривентриальном введении он проявлял нейропротекторные и антиамнестические свойства на модели двусторонней фотоиндуцированной ишемии префронтальной коры большого мозга крыс [7]. На модели окклюзии среднемозговой артерии у крыс ГК-2 значительно снижал неврологический дефицит и уменьшал объем инфаркта [8].

В развитие этих исследований представляло интерес изучение поведенческих и биохимических эффектов дипептида ГК-2 в условиях еще более выраженной ишемии головного мозга, вызванной двусторонней необратимой перевязкой сонных артерий у крыс. Известно, что в короткий период (1–2 недели после операции) необратимая перевязка сонных артерий вызывает нарушение исследовательской активности, в том числе реакции на новизну [21], а в более отдаленные сроки (месяц и более) — дефицит памяти [12]. В данной работе мы изучили возможные эффекты ГК-2 на исследовательскую активность крыс в тестах “открытое поле” и “исследование новых объектов” на 8–9-й день после операции.

Необратимая перевязка сонных артерий вызывает нейродегенерацию, которая затрагивает различные отделы головного мозга, преимущественно кору и гиппокамп [21]. Для выявления возможной нейропатологии и влияния на нее дипептида ГК-2 была оценена выживаемость клеток и содержание индуцибельной формы стресс-белка HSP70 в данных структурах мозга. HSP70 (HSP — *heat shock protein*) — шаперон, который защищает клетки от различных видов стресса за счет предотвращения агрегации и реорганизации поврежденных белков, увеличение его уровня является индикатором наличия патологических процессов

<sup>1</sup> ФГБУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” РАМН, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8.

[18]. Поскольку известно, что содержание NGF динамически меняется в ответ на ишемию, было измерено содержание NGF в коре большого мозга и гиппокампе. Необратимая перевязка сонных артерий может сопровождаться гибелью крыс [3], поэтому было изучено влияние ГК-2 на выживаемость животных после операции.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Материалы и реактивы.* Дипептид ГК-2 (гексаметилендиамид бис-N-моносукцинил-глутамил-лизина) синтезирован в НИИ фармакологии имени В. В. Закусова РАМН [6]. Для наркоза применяли этаминал-натрий (“Sigma”, США). Эмбриональная бычья сыворотка (FBS), культуральная среда DMEM были получены в фирме “Gibco” (США). Диметилсульфоксид (DMSO) был фирмы ICN. Гидробромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (MTT) был приобретен в фирме “Sigma-Aldrich Inc.” (США). Tris-HCl, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), дитиотрейтол (DTT), Triton X-100, поливинилиденфторидные мембраны (PVDF), TBST (25 mM Tris-HCl, 0,2 mM NaCl и 0,1 % Tween-20), обезжиренное молоко, Semi-dry ячейка для переноса и Semi-dry буфер (48 mM Tris-HCl, 39 mM Glycine, 0,0375 % SDS, 20 % MeOH) были получены в фирме Bio-Rad (США). Мышинные моноклональные антитела W27 к HSP70, кроличьи поликлональные антитела M-20 к NGF, козы поликлональные антитела к иммуноглобулинам мыши и козы поликлональные антитела к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена, электрохемилуминисцентный реагент (ELC) были фирмы “Santa Cruz Biotechnology Inc.” (США).

*Животные.* Эксперименты проведены на 55 беспородных белых крысах-самцах массой 350 – 420 г, полученных из питомника “Столбовая” РАМН. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде и естественной смене светового режима. Поведенческие эксперименты выполняли в зимний период в интервале 10.00 – 14.00 по местному времени. При работе с крысами соблюдали требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

*Дизайн исследования.* Экспериментальные животные были разделены на 3 группы: 1-я – пассивный контроль (ложнооперированные крысы, л.о.); ( $n = 18$ ), 2-я — активный контроль (крысы, подвергнутые необратимой двусторонней перевязке сонных артерий, ишемия), ( $n = 20$ ); 3-я — крысы, подвергнутые необратимой двусторонней перевязке сонных артерий и леченные дипептидом ГК-2 (ишемия+ГК-2), ( $n = 17$ ). ГК-2 вводили внутривентриально в водном растворе в дозе 0,5 мг/кг через 4 ч после операции, затем каждые 24 ч, всего было 8 инъекций. Животным из групп пассивного и активного контролей вводили вместо ГК-2 дистиллированную воду. Эксперимент включал следующие этапы: операцию по перевязке сонных артерий, оценку поведенческих параметров в тесте “открытое

поле” на 8-е сутки после операции и в тесте “исследование новых объектов” на 9-е сутки после операции, декапитацию животных через 2 недели после операции, извлечение головного мозга, оценку жизнеспособности клеток коры и гиппокампа (“л.о.”:  $n = 9$ , “ишемия”:  $n = 6$ , “ишемия + ГК-2”:  $n = 9$ ), определение содержания NGF и HSP70 в коре и гиппокампе (“л.о.”:  $n = 8$ , “ишемия”:  $n = 6$ , “ишемия + ГК-2”:  $n = 8$ ). В течение всего эксперимента регистрировали гибель животных в группах.

*Операция.* Хроническую ишемию головного мозга создавали необратимой перевязкой обеих сонных артерий [3] под наркозом этаминал-натрием (50 мг/кг, внутривентриально). Делали небольшой надрез кожи в области шеи животного, раздвигали мышцы шеи и находили сонные артерии. Каждую артерию отделяли от соединительной ткани и нервных тяжей. На каждую освобожденную таким образом артерию накладывали по две лигатуры на расстоянии 2 – 3 мм друг от друга. Все манипуляции проводили с помощью стеклянных инструментов. Разрез на коже зашивали и обрабатывали стрептоцидом. Группа ложнооперированных животных была подвергнута тем же манипуляциям, что и оперированные животные, за исключением наложения лигатур на сонные артерии.

*“Открытое поле”.* Данный тест широко используется для оценки общей двигательной и исследовательской активности [1]. Установка представляла собой круглую арену из белого поливинилхлорида. Диаметр арены 93 см, высота стенок 42 см, диаметр отверстий в полу 2 см. Пол арены расчерчен на квадраты примерно одинаковой площади. Животное помещали на пол в центре арены и на протяжении 4 мин регистрировали следующие параметры: пересечение квадратов, вертикальные стойки, заглядывания в отверстия. В литературе упоминается нарушение угашения исследовательско-ориентировочной реакции (ИОР) в новой обстановке у грызунов как следствие ишемии головного мозга. Угашение ИОР является результатом привыкания (habituation) или негативного обучения. Обычно этот параметр оценивают путем повторных сеансов тестирования в “открытом поле”. Был разработан и другой подход [5], согласно которому острое (в течение одного сеанса) угашение ИОР является адекватным тестом для оценки когнитивных функций. В настоящем исследовании мы использовали последний подход. Для этого период наблюдения разбивали на два блока по две минуты и рассчитывали коэффициент угашения ( $K_y$ ) по формуле:

$$K_y = a/b$$
, где  $a$  — число пересеченных квадратов в группе в первые две минуты наблюдения,  $b$  — число пересеченных квадратов в группе в последние две минуты наблюдения.

Значение  $K_y$  отражает степень угашения ИОР: снижение этого коэффициента по сравнению с пассивным контролем свидетельствует о нарушении негативного обучения.

*Исследование новых объектов.* Для изучения исследовательской активности использовали также тест

“исследование новых объектов” [11]. В данном тесте продолжительность исследования новых объектов в основном зависит от внимания и мотивации [14].

Крысу помещали на 5 мин для адаптации в пустую клетку Т4 (из белого пластика, дно 35 × 55 см, высота 20 см) с опилками, аналогичную ее жилой клетке. Затем в ближайшие углы клетки помещали два идентичных незнакомых крысе объекта (жестяные банки 0,33 л с жидкостью) и в течение 4 мин фиксировали время исследования новых объектов. Исследованием считали обнюхивание, когда нос крысы находился на расстоянии не более 20 мм от объекта. Перед каждым тестом объекты протирали спиртом для уничтожения меток, оставленных предыдущим животным.

Все поведенческие параметры регистрировали с помощью программы RealTimer (НПК “Открытая Наука”, Москва, Россия).

*Оценка жизнеспособности нейронов.* После декапитации извлекали мозг, помещали его на лёд и выделяли кору и гиппокамп, переносили каждый отдел в 4 мл сыворотки, охлажденной до 0 °С, гомогенизировали (стекло/стекло) до образования гомогенной массы (суспензии) и пропускали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 40 мкм (Millipore). Полученную клеточную суспензию центрифугировали при комнатной температуре 5 мин при 830 g. Далее надосадочную жидкость декантировали, клетки ресуспендировали в 10 мл среды DMEM, содержащей 10 % FBS. Жизнеспособность клеток оценивали методом МТТ-анализа [17]. Плотность клеток определяли с помощью камеры Горяева. Для анализа в каждую лунку 96-луночной планшеты вносили 100 мкл суспензии клеток с плотностью  $2 \times 10^6$ /мл и добавляли 10 мкл МТТ. Пробы инкубировали 30 мин при 37 °С, затем для растворения кристаллов формазана в каждую лунку добавляли по 100 мкл DMSO. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре Multiscan (Thermo, США) при длине волны 600 нм против контроля, не содержащего МТТ.

*Определение содержания NGF и HSP70.* Содержание HSP70 и NGF в цитоплазматической фракции коры большого мозга и гиппокампа крыс определяли с помощью Вестерн-блот-анализа как описано [4]. Ткань гомогенизировали (1:6, w/v) в 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, содержащем 5 mM EDTA, 1 mM DTT и 1 % Triton X-100 при 4 °С. Гомогенаты центрифугировали 10 мин при 1800 g и 4 °С. Супернатант, содержащий белки цитозоля, анализировали с использованием иммуноблоттинга. Белки разделяли электрофорезом в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ). На каждую дорожку геля наносили 75 мкг белка пробы. Концентрацию белка в пробах измеряли по методу Фолина-Лорури [20]. Перенос белков с ПААГ на мембрану осуществляли электроэлюцией в Semi-dry ячейке в Semi-dry буфере в течение 45 мин. Преинкубацию блотов проводили в течение ночи в TBST с добавлением 5 % (w/v) обезжиренного молока. Далее мембраны отмывали от молока раствором TBST 5 раз по 5 мл. Мембраны инкубировали в течение 1 ч в TBST с добавле-

нием 0,5 % (w/v) обезжиренного молока в присутствии первых антител к HSP70 или к NGF в разбавлении 1:1000. После отмывки с помощью TBST мембраны инкубировали в течение 1 ч в TBST с добавлением 0,5 % (w/v) обезжиренного молока в присутствии вторых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, в разбавлении 1:1000. Детектирование HSP70 и NGF осуществляли с помощью ECL-реагента на пленку для хемилуминисценции фирмы Kodak или на гель-документирующую систему Uvitec Alliance 4.7. Относительное количество иммунореактивности блотов было оценено по сканированию и анализу пятен с помощью программы Adobe Photoshop.

*Статистическая обработка.* Для оценки достоверности различий между группами по уровню смертности применяли критерий точной вероятности Фишера.

Для сравнения поведенческих показателей для независимых выборок использовали непараметрический аналог дисперсионного анализа по Краскелу-Уоллису с дальнейшим определением значимости различий с помощью критерия множественных сравнений по Данну, а для парных сравнений связанных выборок применяли критерий Вилкоксона. Данные представляли в виде медиан выборок, нижнего и верхнего квартилей.

Результаты МТТ-теста анализировали с помощью U-теста Манна-Уитни, а данные Вестерн-блот-анализа — с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты считали достоверными при  $p < 0,05$ .

Терапевтический эффект ( $T_3$ ) дипептида ГК-2 рассчитывали по формуле:

$T_3 = [(c - d)/(e - d)] \cdot 100 \%$ , где  $c$  — значение параметра в группе “ишемия + ГК-2”,  $d$  — значение параметра в группе “ишемия”,  $e$  — значение параметра в группе “л.о.”.

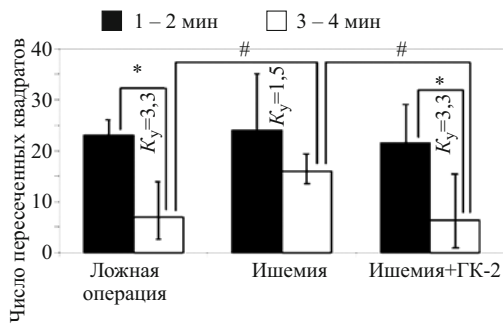
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Дипептид ГК-2 предотвращает гибель животных, вызванную ишемией головного мозга*

В группе активного контроля (ишемия) погибли 8 из 20 крыс (40 %), а в группе пассивного контроля (ложная операция) 1 из 18 крыс (табл. 1). Уровень смертности в группе активного контроля находится в согласии с литературными данными [3]. В группе леченых дипептидом ГК-2 крыс гибели животных не наблюдалось (табл. 1).

*Дипептид ГК-2 предотвращает поведенческие нарушения в тесте “открытое поле”*

У группы активного контроля была увеличена (на 62 %) вертикальная двигательная активность по сравнению с ложнооперированными животными (табл. 2). ГК-2 вызывал снижение вертикальной двигательной активности: группа леченых животных не отличалась по данному параметру от группы пассивного контроля. В группе активного контроля была также увеличена (хотя и статистически недостоверно) по сравнению с группой пассивного контроля горизонтальная двигательная активность и число заглядываний в отвергнутый.



**Рис. 1.** Влияние ГК-2 на динамику горизонтальной двигательной активности в тесте “открытое поле” на 8-е сутки после перевязки сонных артерий.

Данные представлены в виде медиан, нижних и верхних квартилей. \* —  $p < 0,05$  по сравнению с двигательной активностью в той же группе в первые 2 мин теста (критерий Вилкоксона для парных сравнений); # —  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующей группой (критерий Краскела-Уоллиса). Коэффициент угашения ИОР, отражающий способность крыс к “негативному обучению” (habituation), рассчитывали по формуле:  $K_y = a/b$ , где  $a$  — число пересеченных квадратов в группе в первые две минуты наблюдения,  $b$  — число пересеченных квадратов в группе в последние две минуты наблюдения.

ГК-2 нормализовал данные параметры до уровня пассивного контроля (табл. 2).

Оценка степени угашения исследовательско-ориентировочной реакции показала, что в группе ложноперирированных крыс коэффициент угашения равен 3,3, а у ишемизированных крыс этот коэффициент значительно снижен и составляет всего 1,5 единицы. Таким образом, у ишемизированных крыс наблюдалось нарушение негативного обучения (“habituation”). Лечение пептидом ГК-2 полностью восстанавливало коэффициент угашения до уровня ложноперирированных животных (рис. 1).

*Дипептид ГК-2 восстанавливает сниженную исследовательскую активность в тесте “исследование новых объектов”*

Общее время исследования объектов у оперированных крыс было достоверно ниже, чем у ложноперирированных и составляло 35 и 68 с соответственно (рис. 2). Снижение времени исследования новых объектов в данном тесте может отражать дефицит внимания или памяти, а также снижение мотивации (любопытства) у оперированных крыс [14]. Лечение дипептидом ГК-2 приводило к увеличению времени иссле-

**Таблица 1.** Выживаемость животных в течение 2 недель после перевязки сонных артерий

Группа	Количество животных ( $n$ )	Число выживших животных	% выживших животных
Ложная операция	18	17	95
Ишемия	20	12*	60
Ишемия + ГК-2	17	17#	100

\* —  $p < 0,05$  по сравнению с группой “ложная операция”, # —  $p < 0,05$  по сравнению с группой “ишемия” (критерий точной вероятности Фишера).

дования объектов до 55 с. Терапевтический эффект ГК-2 в этом тесте составлял 40 % (рис. 2).

*Дипептид ГК-2 восстанавливает жизнеспособность клеток коры большого мозга*

Через 2 недели после перевязки сонных артерий у группы активного контроля была достоверно снижена по сравнению с группой пассивного контроля жизнеспособность клеток коры большого мозга. Дипептид ГК-2 восстанавливал жизнеспособность клеток коры (рис. 3). На жизнеспособность клеток гиппокампа ишемия в условиях эксперимента не влияла (данные не приводятся).

*Дипептид ГК-2 снижает гиперэкспрессию HSP70 в коре большого мозга и не влияет на содержание NGF в коре и гиппокампе*

Через 2 недели после перевязки сонных артерий в коре большого мозга у ишемизированных крыс содержание индуцибельной формы HSP70 было увеличено, а содержание NGF снижено по сравнению с группой “л.о.”. Лечение дипептидом ГК-2 ограничивало гиперэкспрессию HSP70 с терапевтическим эффектом около 50% и не влияло на содержание NGF в коре (табл. 3).

В гиппокампе у ишемизированных крыс содержание NGF было достоверно повышено по сравнению с ложноперирированными, а уровень индуцибельной формы HSP70 не менялся. Дипептид ГК-2 не влиял на содержание этих белков в гиппокампе (табл. 3).

В настоящем исследовании показано, что через 1–2 недели после необратимой двусторонней перевязки сонных артерий имеет место гибель 40 % животных; нарушение когнитивных функций (по показателю “угашение ИОР” и в тесте “исследование новых объектов”); снижение выживаемости клеток коры большого мозга (по данным МТТ-теста); снижение содержания NGF и увеличение синтеза HSP70 в коре; увеличение уровня NGF и сохранение исходного содержания HSP70 в гиппокампе (по данным Вестерн-блот анализа).

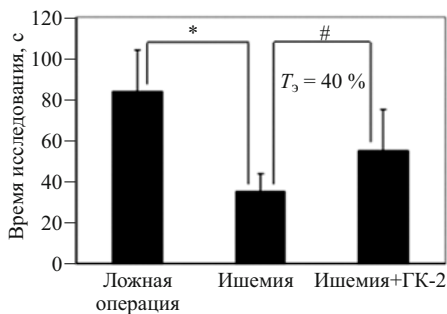
Пептид ГК-2 предотвращал смертность животных после операции, устранял проявления когнитивного дефицита, восстанавливал жизнеспособность клеток коры большого мозга и препятствовал гиперэкспрессии HSP70.

**Таблица 2.** Поведение крыс в “открытом поле” на 8-й день после необратимой перевязки сонных артерий

Группа животных	Горизонтальная активность (число пересеченных квадратов)	Вертикальная активность (число стоек)	Число заглядываний в отверстия
Ложная операция, $n = 17$	33 (15 – 40)	6,5 (4,5 – 9)	5,5 (3,5 – 8,5)
Ишемия, $n = 12$	41 (31 – 51)	10,5 (9 – 15) *	8,5 (4,5 – 11,5)
Ишемия + ГК-2, $n = 17$	34 (26 – 41)	8 (7,5 – 10)	4 (0,5 – 7)

**Примечание.** Данные представлены в виде медиан выборок (нижнего и верхнего квартилей).

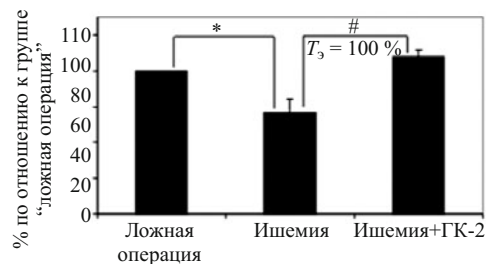
\* —  $p < 0,05$  по сравнению с группой “ложная операция” (критерий Краскела-Уоллиса).



**Рис. 2.** Влияние ГК-2 на время исследования новых объектов на 9-е сутки после операции.

Данные представлены в виде медиан, нижних и верхних квартилей. \* —  $p < 0,05$  по сравнению с группой “ложная операция”; # —  $p < 0,05$  по сравнению с группой “ишемия” (критерий Краскела-Уоллиса).  $T_3$  (здесь и далее) — терапевтический эффект лечения оперированных крыс дипептидом ГК-2, который рассчитывали по формуле:  $T_3 = [(c - d)/(e - d)] \cdot 100 \%$ , где  $c$  — значение параметра в группе “ишемия + ГК-2”,  $d$  — значение параметра в группе “ишемия”,  $e$  — значение параметра в группе “ложная операция”.

Известно, что двусторонняя необратимая перевязка сонных артерий приводит к повреждению нейронов двух типов: диффузные поражения в основном в коре, возникающие, как полагают, вследствие острой ишемической атаки, и медленно прогрессирующая нейродегенерация в гиппокампе [21]. В нашем исследовании через 2 недели после операции было выявлено снижение выживаемости клеток коры при сохранении выживаемости клеток гиппокампа, в котором, по-видимому, нейродегенерация еще не развилась. Содержание NGF было снижено в коре и увеличено в гиппокампе оперированных крыс по сравнению с ложнооперированными. Уровень NGF в коре и гиппокампе коррелирует с выживаемостью клеток в этих отделах. Неоднородность реакции коры и гиппокампа на ишемию, возможно, связана с тем, что более древний в эволюционном отношении гиппокамп надежнее защищен от повреждений, чем кора, и NGF в этой защите играет заметную роль. Важно подчеркнуть, что в наших экспериментах в соответствии с литературными данными [16] уровень NGF в гиппокампе контрольных животных был значительно выше, чем в коре. О повреждении коры большого мозга у ишемизированных крыс свидетельствует также увеличение содержания маркера патологических процессов HSP70. В то же время в гиппокампе уровень HSP70 не изменялся. Наблюдаемый нами эффект снижения концентрации NGF в коре одновременно с увеличением концентрации HSP70 соответствует литературным данным [18]. Лечение низкомолекулярным системно активным миметиком фактора роста нервов ГК-2 приводило к полному восстановлению жизнеспособности клеток коры большого мозга и снижало гиперэкспрессию HSP70.



**Рис. 3.** Влияние ГК-2 на выживаемость клеток коры у крыс через 2 недели после перевязки сонных артерий по данным МТТ-теста.

Результаты представлены в процентах, где за 100 % принимали значение выживаемости клеток в группе “ложная операция”. \* —  $p < 0,05$  по сравнению с группой “ложная операция”; # —  $p < 0,05$  по сравнению с группой “ишемия” (U-критерий Манна-Уитни).

Известно, что ишемия головного мозга сопровождается когнитивным дефицитом, который в нашем исследовании проявлялся в нарушении угашения ИОР в тесте “открытое поле” (нарушение “habituation”) и снижении времени исследования новых объектов. Можно предположить, что данные нарушения связаны с дефицитом внимания, вызванным повреждением коры. О вовлеченности коры в регуляцию внимания хорошо известно. Внимание является одним из факторов, от которых зависит время исследования в тесте “исследование новых объектов” [14]. Возможной причиной нарушения угашения ИОР является затруднение пространственного картирования новой обстанов-

ки. Можно предположить, что данные нарушения связаны с дефицитом внимания, вызванным повреждением коры. О вовлеченности коры в регуляцию внимания хорошо известно. Внимание является одним из факторов, от которых зависит время исследования в тесте “исследование новых объектов” [14]. Возможной причиной нарушения угашения ИОР является затруднение пространственного картирования новой обстанов-

**Таблица 3.** Относительное содержание NGF и индуцибельной формы HSP70 в коре большого мозга и гиппокампе крыс через 2 недели после необратимой перевязки сонных артерий

Содержание белков	Кора		Гиппокамп	
	NGF	HSP70	NGF	HSP70
<b>Ложная операция (n = 8)</b>				
Среднее	6,4	4,1	35,3	126,9
Стандартное отклонение	0,93	0,31	1,73	14,95
<b>Ишемия (n = 6)</b>				
Среднее	3,7*	6,3*	48,6*	129,5
Стандартное отклонение	0,32	0,26	9,10	15,58
<b>Ишемия + ГК-2 (n = 8)</b>				
Среднее	3,0	5,2#	39,5	128,5
Стандартное отклонение	1,26	0,36	6,06	22,13

**Примечание.** Данные получены с помощью Вестерн-блот анализа и представлены в виде относительных денситометрических единиц. Число параллелей равно 3. \* —  $p < 0,05$  по сравнению с группой “ложная операция”; # —  $p < 0,05$  по сравнению с группой “ишемия” (t-критерий Стьюдента).

ки, которое может быть вызвано дефицитом внимания. Терапия дипептидом ГК-2 снимала данные нарушения, что может свидетельствовать о способности ГК-2 восстанавливать нарушенное внимание.

В тесте “открытое поле” у ишемизированных крыс наблюдалась повышенная вертикальная двигательная активность. Горизонтальная двигательная активность и число заглядываний в отверстия у оперированных крыс также были заметно повышены по сравнению с ложнооперированными, хотя статистически не достоверно. Известно, что в короткие сроки после ишемии головного мозга у грызунов наблюдается повышенная поведенческая активность [2]. Полученные в данном исследовании результаты позволяют предположить, что гибель клеток коры приводит к ослаблению ее тормозного влияния на подкорковые структуры, с чем может быть связана повышенная активность ишемизированных крыс. Двигательная активность в группе леченых ГК-2 крыс не отличалась от таковой в группе “ложная операция”, что свидетельствует о нормализующем влиянии ГК-2 на данное нарушение.

Таким образом, дипептид ГК-2 при лечебном субхроническом введении препятствовал повреждению клеток коры большого мозга, развитию когнитивных и других поведенческих нарушений. Кроме того, ГК-2 полностью предотвращал гибель животных. По этому действию он не уступает используемым в клинике ноотропным пептидным препаратам с нейропротекторными свойствами ноопепту [3] и семаксу [10].

## ВЫВОДЫ

1. Димерный дипептидный миметик NGF ГК-2 при лечебном субхроническом введении (0,5 мг/кг; внутривенно) на модели неполной глобальной ишемии у крыс, вызванной двусторонней необратимой перевязкой сонных артерий, предотвращает гибель животных и снижение жизнеспособности клеток коры большого мозга.

2. Дипептид ГК-2 восстанавливает нарушенное у ишемизированных крыс “негативное обучение” (habituation) в тесте “открытое поле” и сниженную исследовательскую активность в тесте “исследование новых объектов”.

3. Дипептид ГК-2 снижает гиперэкспрессию HSP70 в коре и не влияет на содержание NGF в коре и гиппокампе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Я. Буреш, О. Бурешова, Дж. П. Хьюстон, *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*, Высшая школа, Москва (1991).
2. Ю. В. Заржецкий, Е. А. Мутускина, И. Е. Трубина, И. Е., *Бюл. exper. биол.*, **133**(1), 30 – 33 (2002).
3. И. В. Зарубина, *Пептидная нейропротекция*, Спб. (2009), сс. 126 – 185.
4. Л. А. Остерман, *Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование*, Наука, Москва (1981).
5. Р. У. Островская, Т. А. Гудашева, *Бюл. exper. биол.*, № 5, 644 – 647 (1991).
6. С. Б. Середенин, Т. А. Гудашева, Патент РФ № 2410392 (2010).
7. С. Б. Середенин, Г. А. Романова, Т. А. Гудашева и др., *Бюл. exper. биол.*, **150**(10), 406 – 409 (2010).
8. С. Б. Середенин, Д. Н. Силачев, Т. А. Гудашева и др. *Бюл. exper. биол.*, **151**(5), 518 – 521 (2011).
9. З. А. Суслина, Б. А. Кистенев, Т. Н. Шарыпова и др., *Русск. мед. журн.*, № 25, 1170 – 1174 (2002).
10. В. В. Яснецов, Т. А. Воронина, *Exper. и клин. фармакол.*, **72**(1), 68 – 70 (2009).
11. P. Bienkowski, E. Koros, W. Kostowski, *Alcohol&Alcoholism*, **36**(6), 525 – 528 (2001).
12. E. Farkas, P. G. Luiten, F. Bari, *Brain. Res. Rev.*, **54**(1), 162 – 180 (2007).
13. C. Guégan, B. Onténiente, Y. Makiura, et al., *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **55**(1), 133 – 140 (1998).
14. R. Haba, N. Shintani, Y. Onaka, et al., *Brain Research*, **228**(2), 423 – 431 (2012).
15. M. E. Jönghagen, *Alzheimer. Dis. Assoc. Disord.*, **14**(1), 31 – 38 (2000).
16. S. Korsching, G. Auburger, R. Heumann, et al., *EMBO J.*, № 4, 1389 – 1393 (1985).
17. M. Kubera, B. Budziszewska, A. Basta-Kaim, et al., *Polish Journal Of Pharmacology*, **53**(3), 541 – 546 (2001).
18. T. H. Lee, H. Kato, S. T. Chen, et al., *Stroke*, № 29, 1687 – 1696 (1998).
19. F. M. Longo, Y. Xie, S. M. Massa, *Curr. Med. Chem.*, № 5, 29 – 41 (2005).
20. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**(1), 265 – 275 (1951).
21. J. W. Ni, K. Matsumoto, H. B. Li, et al., *Brain Res.*, **673**(2), 290 – 296 (1995).
22. J. P. Yang, H. L. Liu, H. Yang, P. Y. Feng, *Neurol. Sci.*, **32**(3), 433 – 441 (2011).

Поступила 01.06.12

## NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF A DIPEPTIDE MIMETIC ON THE GK-2 NERVE GROWTH FACTOR IN MODEL OF PERMANENT COMMON CAROTID ARTERY OCCLUSION IN RATS

P. Yu. Povarnina, T. A. Gudasheva, O. N. Vorontsova, S. V. Nikolaev, T. A. Antipova, R. U. Ostrovskaya, and S. B. Seredenin

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

The behavioral and biochemical effects of a new dipeptide mimetic of the GK-2 nerve growth factor (NGF) have been studied on a model of chronic cerebral ischemia induced by permanent common carotid artery occlusion in rats. It is established that subchronic intraperitoneal injections of GK-2 (0.5 mg/kg) 4 h after surgery, followed by seven more injections made every 24 h, fully prevent the death of operated animals and reduces the development of habitation deficit (open-field test) and decrease in exploratory activity (novel object examination) two weeks after surgery, as well as fully restores the viability of cerebral cortex cells and decreases the hyperexpression of HSP70 in cerebral cortex.

**Key words:** GK-2 dipeptide mimetic of NGF, permanent common carotid artery occlusion, open-field test, novel object exploration, HSP70, NGF