

Н.К. Арокина, В.Х. Хавинсон, Н.И. Чалисова, Н.С. Линькова,  
Г.А. Рыжак

## ВЛИЯНИЕ ПОЛИПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСА СОСУДОВ НА ЖИЗНЕУСТОЙЧИВОСТЬ КРЫС ПРИ ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ

DOI 10.25789/YMJ.2022.78.12

УДК 613.98, 612.013

Проведены исследования эффективности применения полипептидного комплекса сосудов (ПКС) для стимуляции функций дыхательной и сердечно-сосудистой систем в модели экспериментальной гипотермии. Результаты показывают, что после применения ПКС у крыс частота сердечных сокращений в процессе охлаждения была статистически значимо выше, частота дыхания начинала снижаться позднее, чем в контроле. Температурный порог прекращения дыхания после применения ПКС снижался, в два раза повышалось время охлаждения крыс до остановки дыхания по сравнению с контролем. Делается вывод, что ПКС замедляет процесс холодового угнетения дыхания и сердечной деятельности.

**Ключевые слова:** жизнеустойчивость, холодовой стресс, дыхание, полипептидный комплекс сосудов, геропротекция.

The influence of polypeptide vessel complex (PVC) for stimulating the respiratory and cardiovascular systems in a model of experimental hypothermia has been studied. The obtained results indicate that after PVC application the heart rate of rats during cooling was significantly higher and the respiratory rate gets lower as compared with the control. The temperature threshold for respiratory failure after PVC was reduced, and the cooling time of rats to respiratory arrest increased twice as compared with the control. It is concluded that PVC slows down the process of cold respiratory depression and cardiac activity.

**Keywords:** resilience, cold stress, breathing, vessel polypeptide complex, geroprotection.

**Введение.** Длительное нахождение на холоде может привести к гипотермии, когда механизмы терморегуляции не обеспечивают поддержание нормальной температуры тела. При температуре тела ниже 35 °С нарушаются важнейшие функции организма. Особенно опасна глубокая гипотермия, когда прекращается дыхание и останавливается сердце, что приводит к риску летального исхода. Однако умеренная гипотермия применяется в медицине при лечении пациентов с поражениями мозга и сердца [4, 11]. Из-

вестно, что у пожилых людей нарушается регуляция температуры тела, что снижает их жизнеустойчивость (resilience). Одним из внешних факторов, приводящих к снижению жизнеустойчивости, является стресс, вызванный переохлаждением организма. В пожилом возрасте риск гипотермии особенно высок, так как часто люди этой группы страдают хроническими заболеваниями, имеют сниженный иммунитет. Для поддержания функциональной активности организма у лиц старше 60 лет при воздействии неблагоприятных факторов внутренней или внешней среды важна мобилизация ресурсов индивидуальной жизнеспособности [2].

Механизмы, приводящие к гибели клеток при различных повреждающих воздействиях, сходны. Это избыточная генерация свободных радикалов кислорода, активация перекисного окисления липидов, выброс глутамата, нарушение мембранного потенциала клеток, повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция [1, 6, 11]. Наряду с этим гибернирующие животные представляют пример природных адаптаций к значительному снижению температуры тела, которое наблюдается во время зимней спячки, при этом у них не происходит повреждение клеточных структур [12]. Разработка методов повышения холодовой устойчивости, поддержания дыхания и работы сердца при низких температурах тела позволит возвращать к жизни человека даже после остано-

ки сердца при глубоком охлаждении.

Полипептидный комплекс сосудов телят (ПКС) обладает ангиопротекторными свойствами, нормализует перекисное окисление липидов, восстанавливает плотность микрососудов в коре головного мозга старых животных, уменьшает зону некроза в модели острого инфаркта миокарда у крыс [5]. Установлено, что ПКС обладает антиаритмическим действием, смягчает влияние катехоламинов на стенки сосудов при экстремальных воздействиях [7]; однако изучение эффективности препарата при охлаждении не изучали.

**Целью работы** было исследование эффективности применения ПКС для стимуляции функций дыхательной и сердечно-сосудистой систем при нарушении жизнеустойчивости в модели экспериментальной гипотермии.

**Материалы и методы исследования.** Эксперименты были выполнены на 13 белых крысах-самцах линии Вистар массой 300-320 г. Животные были получены из биобанка «Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных наркотизировали уретаном (125 мг/100 г массы тела, внутривенно), применяли местную анестезию (новокаин, 2%). Крыс содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. Исследования проводили в соответствии с Европейской конвенцией по защите животных, используемых

**АРОКИНА Надежда Константиновна** – д.б.н., н.с. ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН», ArokinaNK@infran.ru, ORCID 0000-0002-2079-1300; **ХАВИНСОН Владимир Хацкелевич** – чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., директор Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии, руковод. группы Института физиологии им. И.П. Павлова, ORCID:0000-0001-7547-7725; **ЧАЛИСОВА Наталья Иосифовна** – д.б.н., проф., в.н.с. ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН», в.н.с. АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», ORCID 0000-0002-2371-0043; **ЛИНЬКОВА Наталья Сергеевна** – д.б.н., доцент, зав. лаб. Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии, в.н.с. Белгородского государственного национального исследовательского университета, ORCID: 0000-0001-5156-5421; **РЫЖАК Галина Анатольевна** – д.м.н., проф., зам. директора АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», ORCID 0000-0003-2536-1438.

для научных целей; экспериментальная часть выполнена в соответствии с требованиями Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (заключение №08/02 от «8» февраля 2021 г.).

Охлаждение производили в ванне с водой при температуре 9-10 °С. Животных фиксировали на платформе так, чтобы верхняя часть спины и голова находились над поверхностью воды. С помощью медно-константановых термопар регистрировали температуру в прямой кишке на глубине 4,5 см ( $T_p$ ) и в пищеводе ( $T_n$ ). Термопара в пищеводе фактически измеряла температуру сердца. Датчик для регистрации частоты дыхания (ЧД) закрепляли вокруг грудной клетки крысы. Частоту сердечных сокращений (ЧСС) определяли по электрокардиограмме во втором отведении. Степень сатурации гемоглобина артериальной крови кислородом ( $SpO_2$ ) определяли с помощью ветеринарного пульсоксиметра BP-12C (Bioscare), датчик закрепляли на передней лапе. Крысам опытной группы ( $n=5$ ) за 1 ч до погружения в холодную воду внутрибрюшинно вводили ПКС в дозировке 15,6 мг/кг массы тела животного. Контрольной группе крыс ( $n=8$ ) аналогично вводили 1 мл физиологического раствора. Данные регистрировали с помощью внешнего модуля АЦП Е14-140-М (L-Card, Россия) и программы PowerGraph. Статистическую значимость полученных результатов оценивали с помощью критерия Стьюдента, используя пакет программ Statistica 6.0. Экспериментальные данные представлены как среднее  $\pm$  ошибка среднего ( $M \pm m$ ). Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Перед погружением в холодную воду  $T_p$  у крыс составила  $35,8 \pm 0,3$  °С,  $T_n$  –  $36,4 \pm 0,2$  °С, ЧСС –  $441 \pm 8$  ударов/мин, ЧД –  $118 \pm 6$  циклов/мин,  $SpO_2$  –  $98 \pm 1\%$ . Время охлаждения контрольных животных до остановки дыхания составляло  $60 \pm 7$  мин, что соответствовало полученным ранее данным [1]. У животных, которым вводили ПКС, это время увеличилось в 2 раза, до  $125 \pm 9$  мин. Кривые, отражающие зависимость  $T_n$  от  $T_p$  в процессе охлаждения, не различались в контрольной и опытной группах (рис. 1).

Скорость снижения  $T_p$  и  $T_n$  в первые 30 мин охлаждения значимо не отличалась у контрольных ( $T_p$   $0,32 \pm 0,02$  °С/мин,  $T_n$   $0,28 \pm 0,02$  °С/мин) и опытных

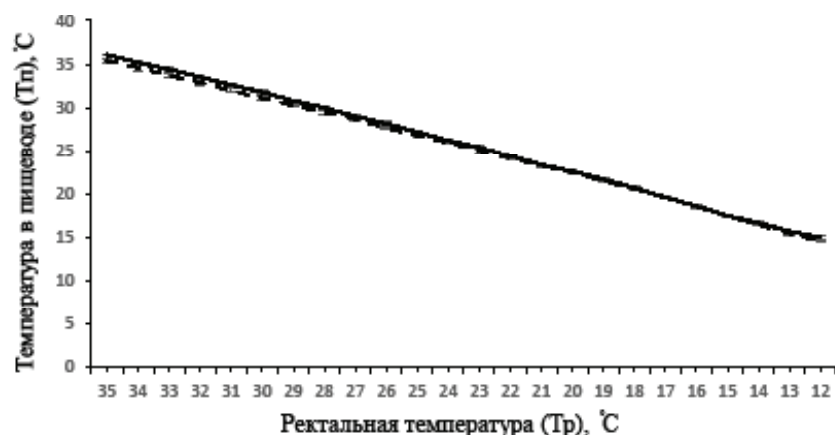


Рис. 1. Изменение температуры в пищеводе в зависимости от ректальной температуры при охлаждении крыс в воде.

На рис. 1-3 пунктирная линия - контроль, сплошная линия - применение ПКС

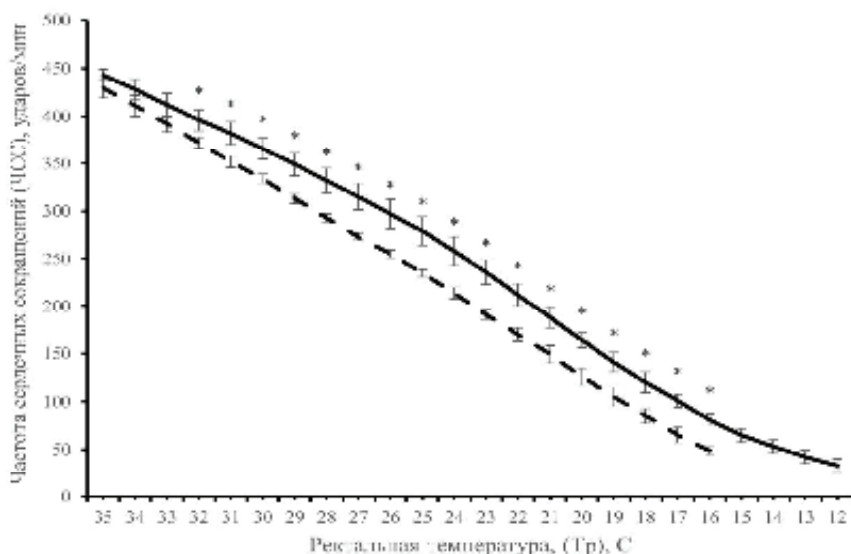


Рис. 2. Влияние ПКС на частоту сердечных сокращений в зависимости от ректальной температуры при охлаждении крыс в воде.

На рис. 2-3 \* -  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующим показателем в контроле

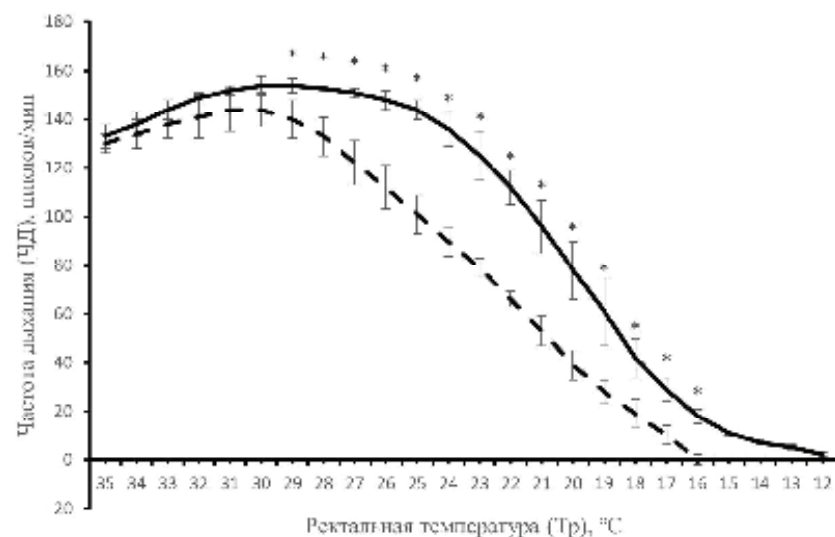


Рис. 3. Влияние ПКС на частоту дыхания в зависимости от изменения ректальной температуры при охлаждении крыс в воде

крыс (Тр  $0,35 \pm 0,01$  °C/мин, Тп  $0,30 \pm 0,02$  °C/мин). В течение следующих 30 мин наблюдалось снижение обоих показателей в контроле до  $0,1 \pm 0,001$  °C/мин, в опытной группе – до  $0,12 \pm 0,01$  °C/мин ( $p \geq 0,05$ ). В опытной группе охлаждение до остановки дыхания еще продолжалось, и в следующие 60 мин скорость снижения Тр и Тп составила  $0,07 \pm 0,01$  °C/мин.

Скорость уменьшения ЧСС в контроле в первые 30 мин охлаждения была  $9,8 \pm 3,4$  удара/мин, последующие 30 мин –  $2,9 \pm 0,4$  удара/мин. У опытных крыс в первые 30 мин скорость снижения ЧСС составила  $9,5 \pm 2,2$  ( $p \geq 0,05$ ), в следующие 30 мин –  $2,7 \pm 0,5$  удара/мин, что также не отличалось от контроля ( $p \geq 0,05$ ), и последние 60 мин –  $0,7 \pm 0,03$  удара/мин. Отмечено, что ЧСС при Тр  $31-16$  °C у животных опытной группы была значимо выше, чем в контроле (рис. 2).

У крыс, которым вводили ПКС, ЧД не снижалась до Тр  $27,7 \pm 0,3$  °C. При этом у контрольных крыс снижение ЧД наблюдалось начиная с Тр  $30,4 \pm 0,4$  °C (рис. 3). Снижение ЧД в контроле и опытной группе происходило с одинаковой скоростью: в первые 30 мин охлаждения  $3,1 \pm 0,5$  цикла/мин, следующие 30 мин –  $2,7 \pm 0,4$  цикла/мин. В опытной группе крыс в течение 60 мин перед остановкой дыхания ЧД уменьшалась очень медленно –  $0,2 \pm 0,02$  цикла/мин.

Остановка дыхания у контрольных животных наблюдалась при Тр  $16,0 \pm 0,3$  °C, Тп  $19,1 \pm 0,3$  °C, ЧСС –  $20 \pm 3$  удара/мин. В опытной группе крыс дыхание прекращалось при более низких температурах: Тр –  $11,6 \pm 0,3$  °C, Тп –  $14,1 \pm 0,3$  °C, ЧСС –  $25 \pm 4$  удара/мин ( $p < 0,05$ ). Таким образом, после применения ПКС температурный порог остановки дыхания снижался примерно на  $4-5$  °C.

В опытной группе крыс в течение последних 60 мин охлаждения до остановки дыхания скорость снижения ЧСС и ЧД уменьшалась соответственно значительно замедлению процесса охлаждения. На этом этапе эксперимента ЧСС снижалась постепенно от 70 до 26 ударов/мин. ЧД была низкой, сначала на уровне 11-8 циклов/мин, а примерно за 30 мин до остановки дыхания ЧД понижалась до 5-3 циклов/мин, затем дыхание прекращалось. В отличие от этого в контроле, как отмечалось выше, остановка дыхания наступала при более высоких значениях Тр и Тп, причем снижение ЧД и ЧСС перед остановкой дыхания происходило быстро. Уровень насыщения крови

кислородом у всех крыс держался на уровне SpO<sub>2</sub> 85-96% до Тр  $18-19$  °C. Затем у контрольных животных этот показатель понижался в соответствии с урежением дыхания. У животных, получавших ПКС, при редком дыхании SpO<sub>2</sub> была на уровне 90-92%.

Полученные данные дополняют выявленное ранее протекторное действие ПКС на показатели функциональной активности сердечно-сосудистой системы в моделях возраст-ассоциированной патологии [7]. Механизм протекторного влияния ПКС на клетки органов сердечно-сосудистой и дыхательной систем при нарушении жизнеустойчивости при экспериментальной гипотермии может быть обусловлен входящим в его состав трипептидом KED [3]. Этот трипептид может проникать в цитоплазму и ядро эндотелиоцитов сосудов и специфически взаимодействовать с последовательностью ДНК CACC, регулируя экспрессию гена, кодирующего пролиферотропный белок Ki67 [9]. По такому же механизму либо при взаимодействии с нуклеосомой (комплекс ДНК и гистоновых белков) [8] пептид KED может регулировать экспрессию генов и синтез белков апоптоза (p53), пролиферации (VEGF), адгезии (Е-селектин) эндотелиоцитов при развитии холодового стресса клеток, патологии сердечно-сосудистой системы и при старении [10]. Вероятно, что, применяя ПКС, замедляющий при гипотермии развитие патологических повреждений в клетках, можно затормозить остановку дыхания и увеличить запас времени для проведения лечебных мероприятий, при спасении людей с глубокой гипотермией, а также при переохлаждении лиц старших возрастных групп.

**Заключение.** Полученные результаты указывают на способность ПКС в течение длительного времени сохранять функции дыхательной и сердечно-сосудистой систем при нарушении жизнеустойчивости в модели экспериментальной гипотермии. Эти данные расширяют возможности по дальнейшему исследованию геропротекторных свойств ПКС и его способности повышать устойчивость организма к гипотермии.

*Работа профинансирована за счет Государственной программы Российской Федерации 47 ГП.*

## Литература

1. Арокина Н.К. Особенности восстановления работы сердца и дыхания у крыс при выходе из глубокой гипотермии в процессе само-

разогревания и при внешнем согревании / Н.К. Арокина // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. – 2021. – 55(4). – С. 78-85.

Arokina N.K. Features of the restoration of the heart and respiration in rats when emerging from deep hypothermia during self-heating and external warming. *Aerospace and environmental medicine*. 2021; 55(4):78-85. DOI: 10.21687/0233-528X-2021-55-4-78-85.

2. Возрастная жизнеспособность в геронтологии и гериатрии (обзор) / А.Н. Ильницкий, К.И. Прошаев, Х. Матеевска-Кубешова [и др.] // *Научные результаты биомедицинских исследований*. – 2019. – 5(4). – С. 102-116.

Il'nikskiy A.N., Proshayev K.I., Mateyovska-Kubshova X. [et al.]. Age-related viability in gerontology and geriatrics (the review). *Scientific outcomes of biomedical investigation*. 2019; 5(4): 102-116. DOI: 10.18413/2658-6533-2019-5-4-0-8.

3. Идентификация коротких пептидов в составе полипептидных комплексов, выделенных из органов животных / И.К. Журкович, Н.Г. Ковров, Г.А. Рыжак [и др.] // *Успехи современной биологии*. – 2020. – 40(2). – С. 140-148.

Zhurkovich I.K., Kovrov N.G., Ryzhak G.A., [et al.]. Identification of short peptides in the composition of polypeptide complexes isolated from animal organs. *Biology Bulletin Reviews*. -2020; 140(2): 140-148. DOI: 10.31857/S004213242002012X.

4. Механизмы нейропротекции при церебральной гипотермии (обзор) / О.А. Шевелев, М.В. Петрова, Ш.Ч. Саидов [и др.] // *Общая реаниматология*. – 2019. – 15(6). – С. 94-114.

Shevelev O.A., Petrova M.V., Saidov Sh.Ch. [et al.]. Mechanisms of neuroprotection in cerebral hypothermia (review). *General resuscitation*. 2019; 15(6): 94-114. DOI: 10.15360/1813-9779-2019-6-94-114.

5. Хавинсон В.Х. Лекарственные пептидные препараты: прошлое, настоящее, будущее / В.Х. Хавинсон // *Клиническая медицина*. – 2020. – 98(3). – С. 165-177.

Khavinson V.Kh. Medicinal peptide preparations: past, present, future. *Clinical medicine*. 2020; 98(3): 165-177. DOI: 10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177.

6. Dietrich WD, Bramlett HM. Therapeutic hypothermia and targeted temperature management in traumatic brain injury: clinical challenges for successful translation. *Brain Res*. 2016; 1640(Pt A): 94-103. DOI: 10.1016/J.BRAINRES.2015.12.034.

7. Kuznik BI, Ryzhak GA, Khavinson VK. Polypeptide vessel complex and its role in physiology function regulation in aging pathology. *Adv Gerontol*. 2019; 32(1-2): 174-179.

8. Neuroprotective Effects of Tripeptides—Epigenetic Regulators in Mouse Model of Alzheimer's Disease/ Khavinson V, Ilina A, Kraskovskaya N, [et al.]. *Pharmaceuticals. Special Issue Epigenetic Drugs*. 2021; 14(6):515. DOI: 10.3390/ph14060515.

9. Penetration of Short Fluorescence-Labeled Peptides into the Nucleus in HeLa Cells and in vitro Specific Interaction of the Peptides with Deoxyribonucleotides and DNA. Fedoreyeva LI, Kireev II, Khavinson VKh, [et al.]. *Biochemistry*. 2011; 76(11): 1210-1219. DOI: 10.1134/S0006297911110022.

10. Role of peptide bond in the realization of biological activity of short peptides. Khavinson VKh, Tarnovskaya SI, Linkova NS, [et al.]. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2015; 158(4): 551-554. DOI: 10.1007/s10517-015-2805-0.

11. Therapeutic hypothermia translates from ancient history into practice. Gunn AJ, Laptook AR, Robertson NJ, [et al.]. *Pediatr. Res*. -2017; 81(1-2): 202 – 209. DOI: 10.1038/pr.20116.198.