

УДК 57.084.1

DOI:10.54503/0514-7484-2023-63.1-100

**Влияние ганглиозидсодержащего препарата на развитие окислительного стресса в головном и спинном мозге крыс при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите****Г.С. Казарян, А.В. Зангинян, Л.М. Овсепян***Институт молекулярной биологии НАН РА  
0014, Ереван, ул. Асратяна, 7**Ключевые слова:* ганглиозиды, кронассиал, окислительный стресс, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит

Заболевания, одним из основных проявлений которых – разрушение миелина, являются наиболее актуальной проблемой клинической медицины. Наиболее распространенное заболевание из всей группы болезней миелина – рассеянный склероз (РС). Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ) у крыс является экспериментальной моделью рассеянного склероза человека [6,13]. По распространенности среди неврологических заболеваний центральной нервной системы (ЦНС) РС занимает четвертое место после острых нарушений мозгового кровообращения, эпилепсии и паркинсонизма. Обычно заболевание начинается в молодом возрасте и практически неизбежно ведет к инвалидизации.

В основе патогенеза лежит воспалительный процесс, прогрессирующая демиелинизация и повреждение аксонов. Заболевание характеризуется развитием многочисленных склеротических очагов преимущественно в белом веществе головного и спинного мозга, а также значительными функциональными нарушениями. Основным диагностическим признаком РС является появление бляшек демиелинизации в головном и спинном мозге на различных стадиях развития заболевания.

Клиническими проявлениями РС являются нарушения в двигательной, координаторной, чувствительной сферах, расстройства зрения, а также изменения интеллекта.

Основным иммунологическим феноменом при этом заболевании является Т-клеточный иммунный ответ на основной белок миелина. Активированные Т-клетки, сенсibilизированные антигенами миелина, проникают в мозг и инициируют местный воспалительный процесс [9,10].

В последние годы появляется все больше данных, свидетельствующих о существенной патогенетической роли окислительного стресса в

повреждении клеток миелина, обусловленных иммунным воспалением [15].

Исходя из этого, особую значимость приобретает применение препаратов, уменьшающих развитие окислительного стресса.

Из литературных данных известно, что ганглиозиды (ГЗ) обладают способностью снижать интенсивность окислительного стресса в клетках [11]. Имеются данные о применении ГЗ при церебральной ишемии, инсульте [12]. ГЗ являются обязательным структурным компонентом всех эукариотических клеток, являясь маркерными липидами мембран нейронов и глиальных клеток, особенно в синаптических участках, одним из основных компонентов нейрональных рецепторов. Они принимают участие во многих физиологических процессах (иммунный ответ, передача нейрональной информации, регуляция сосудистого тонуса, гемостаз, воспаление, апоптоз), происходящих в организме животных и человека. В качестве вторичных посредников они передают внутрь клетки различные внешние сигналы, а также являются межклеточными медиаторами [14].

Целью работы явилось изучение влияния ГЗ на развитие свободнорадикального окисления липидов, окислительной модификации белков в головном и спинном мозге крыс при экспериментально вызванном аллергическом энцефаломиелите. В качестве лечебного средства нами использован препарат кронассиал (cronassial), в структуру которого входит моно-, ди-, триссиал ганглиозиды.

## Материал и методы

Исследование проводили на 30 беспородных белых крысах массой 180–200 г. При проведении эксперимента руководствовались правилами проведения работ, согласно Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей.

ЭАЭ у крыс является экспериментальной моделью рассеянного склероза человека. ЭАЭ индуцировали иммунизацией 50 мкл эмульсии (гомогенат бычьего спинного мозга+ полный адъювант Фрейнда (ПАФ) в соотношении 1:2) в подушечки задних лап крыс [13]. Показателем развития рассеянного склероза были слабость и потеря тонуса хвоста, неуклюжая походка, а также паралич задних конечностей.

Крысы были разделены на группы: I – контрольная группа; II группа – с моделированным аутоиммунным энцефаломиелитом и III группа – с применением препарата кронассиал.

Кронассиал – нейротрофикатор, состоящий из ганглиозидов четырех групп: GM1 (21%), GD1a (40%), GD1b (16%), GT1b (19%)

Для биохимических исследований использовали головной и спинной мозг экспериментальных белых крыс. Животных с ЭАЭ декапитировали

на 21-е сутки в период развития характерных признаков заболевания. Лечение начинали с 22 суток и проводили в течение 20 дней.

Об активности ПОЛ судили по содержанию гидроперекисей (ГП) и малонового диальдегида (МДА) [2]. Содержание диеновых и триеновых конъюгатов, оснований Шиффа регистрировали по методике Дерюгиной А.В. [4]. Уровень окислительной модификации белков в гомогенате головного мозга оценивали по содержанию карбонильных производных аминокислот в белках. Метод основан на том, что конечные продукты свободнорадикального окисления белков могут количественно реагировать с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов. Карбонильные производные динитрофенилгидразонов после растворения белкового осадка в 8 М мочеvine при 37°C регистрировали при различных длинах волн: 356 нм – алифатические кетондинитрофенилгидразоны (КДНФГ) нейтрального характера; 370 нм – алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны (АДНФГ) нейтрального характера; 430 нм – алифатические КДНФГ основного характера; 535 нм – алифатические АДНФГ основного характера [5].

**Статистическая обработка материала.** При оценке полученных результатов проводилась статистическая обработка материала общепринятыми методами вариационной статистики. Для характеристики вариационного ряда были использованы статистические показатели: средняя арифметическая, среднее квадратичное отклонение, ошибка средней арифметической. Математическая обработка данных проводилась с использованием компьютерной программы “SigmaPlot 11.0” и специальных руководств по медицинской и биологической статистике.

## Результаты и обсуждение

Основным параметром оценки свободнорадикального окисления является изучение продуктов распада липидов, в результате чего образуются диеновые, триеновые конъюгаты, гидроперекиси, основания Шиффа, малоновый диальдегид.

В гомогенатах головного и спинного мозга контрольных крыс нами обнаружен определенный уровень содержания свободнорадикальных реакций.

Как показали результаты исследования, моделированный аутоиммунный энцефаломиелит приводит к увеличению содержания как начальных (диеновых, триеновых конъюгатов, гидроперекисей), так и конечных (оснований Шиффа, малонового диальдегида) на 22-й день развития заболевания в головном и спинном мозге (рис.1- 6).

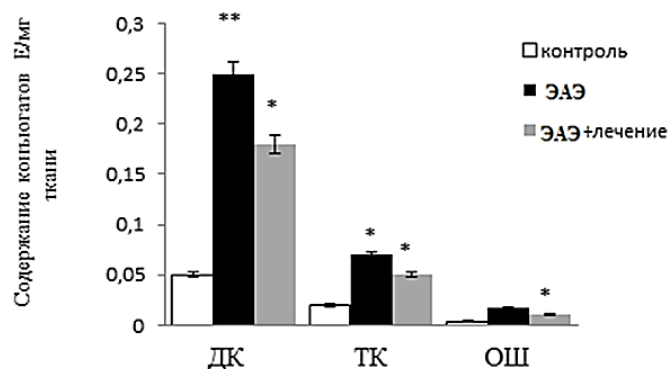


Рис.1. Содержание диеновых , триеновых конъюгатов и оснований Шиффа в нейтральных липидах общего гомогената головного мозга в норме, при аутоиммунном энцефаломиелите и при лечении (n= 30), \* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,5$ , \*\*\* $p \leq 0,01$

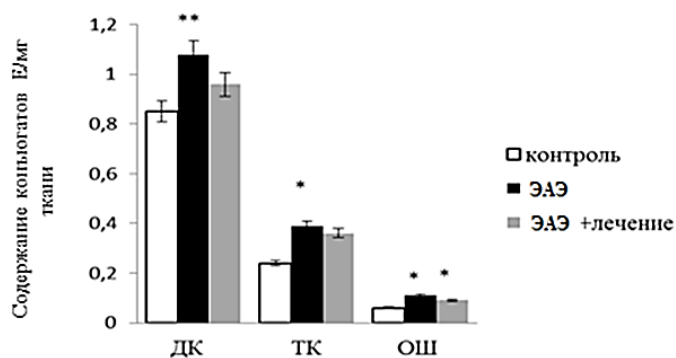


Рис.2. Содержание диеновых, триеновых конъюгатов и оснований Шиффа в фосфолипидах общего гомогената головного мозга в норме, при аутоиммунном энцефаломиелите и при лечении (n= 30), \* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,5$ , \*\*\* $p \leq 0,01$

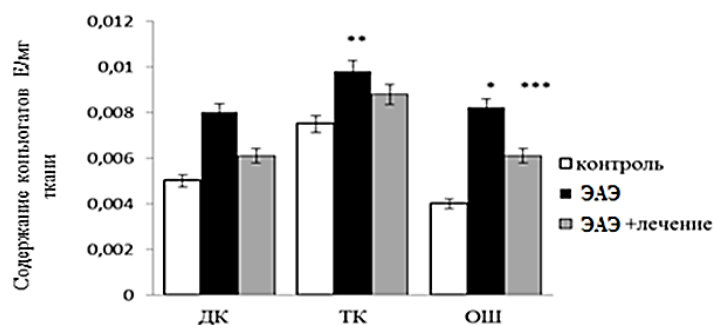


Рис.3. Содержание диеновых , триеновых конъюгатов и оснований Шиффа в нейтральных липидах общего гомогената спинного мозга в норме, при аутоиммунном энцефаломиелите и при лечении (n= 30), \* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,5$ , \*\*\* $p \leq 0,01$

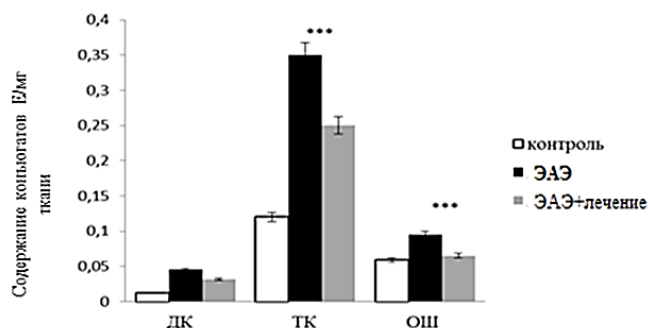


Рис.4. Содержание диеновых, триеновых конъюгатов и оснований Шиффа в фосфолипидах общего гомогената спинного мозга в норме, при аутоиммунном энцефаломиелите и при лечении (n= 30), \* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,5$ , \*\*\* $p \leq 0,01$

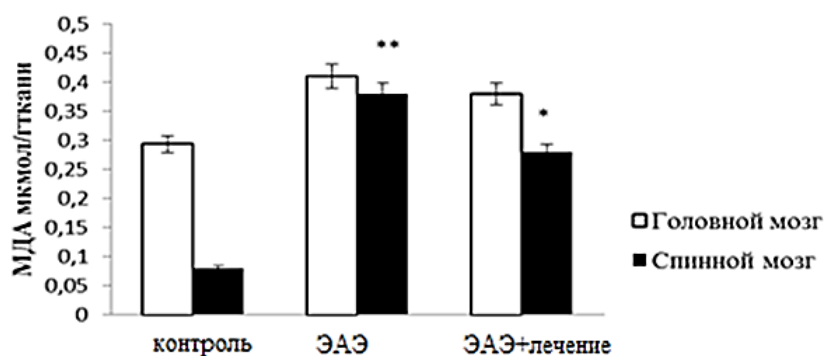


Рис. 5. Содержание малонового диальдегида(МДА) в гомогенате головного и спинного мозга в норме, при аутоиммунном энцефаломиелите и при лечении (n= 30), \* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,01$

Основным отличием миелина от других мембран является большое содержание в нем липидов, в основном гликофинголипидов. На долю липидов приходится приблизительно 70-75 % от сухой массы белого вещества ЦНС млекопитающих; в миелине спинного мозга соотношение липиды / белки выше. Высокое содержание в головном мозге липидов и уникальность их структуры определяют характер развития в них процесса ПОЛ, вызывая нарушение липидного состава в них, что приводит к деструкции мембран, инаktivации мембраносвязанных ферментов, а также к изменению проницаемости.

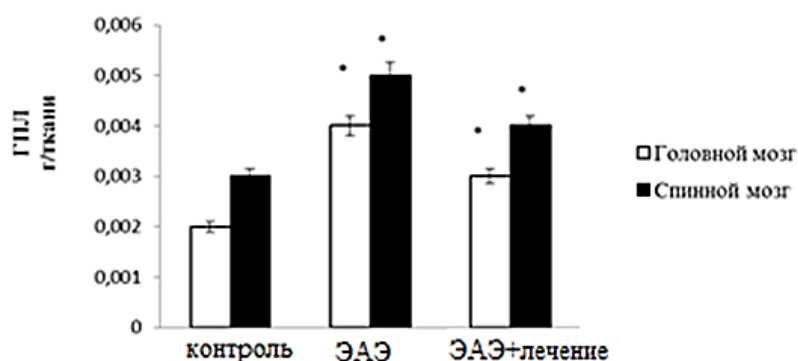


Рис.6. Содержание гидроперекиси липидов (ГПЛ) в гомогенате головного и спинного мозга в норме, при аутоиммунном энцефаломиелите и при лечении (n= 30), \*p≤0,001

Липидный слой клеточных и внутриклеточных мембран выполняет две основные функции – барьерную и матричную (структурную). Повреждение барьера приводит к нарушению регуляции внутриклеточных процессов и тяжелым расстройствам клеточных функций. От свойств липидной фазы мембран, таких как вязкость, поверхностный заряд, полярность, зависит работа мембранных ферментов и рецепторов. Таким образом, обнаруженная нами активация процессов ПОЛ рассматривается как ключевые звенья повреждения мембран нейронов, миелина при РС. Нами выявлено, что применение кронассиала приводит к достоверному снижению в головном и спинном мозге животных с ЭАЭ как начальных, так и конечных продуктов ПОЛ (рис. 1-6).

Из литературных данных известно, что ГЗ *in vivo* обладают уникальными свойствами: при введении в организм они относительно длительное время сохраняются в кровяном русле, лишены токсичности, в небольших количествах проникают через гематоэнцефалический барьер и активно встраиваются в нейрональные мембраны. Они способствуют репарации поврежденных аксонов, обладают выраженными терапевтическими эффектами при травмах головного мозга [7].

Известно, что ГЗ обладают способностью к сильному взаимодействию с  $\text{Ca}^{++}$ , что позволяет им поддерживать постоянную концентрацию свободного  $\text{Ca}^{++}$  у пресинаптической мембраны, обеспечивая функциональную активность нервной клетки, участвуя в процессах ионного транспорта [1,14]. Изменения внутриклеточной концентрации кальция играют ключевую роль в запуске и регуляции общих и специализированных клеточных функций, таких как пролиферация, рост, экспрессия генов, иммунный ответ, синаптическая пластичность, а также контроль метаболизма и гибель клеток. Нами предполагается, что одним из положительных эффектов препарата кронассиал может быть влияние на нормализацию кальциевого обмена. АФК вызывают окислительную моди-

фикацию белков (рис.7,8), в результате чего усугубляются мембранные повреждения.

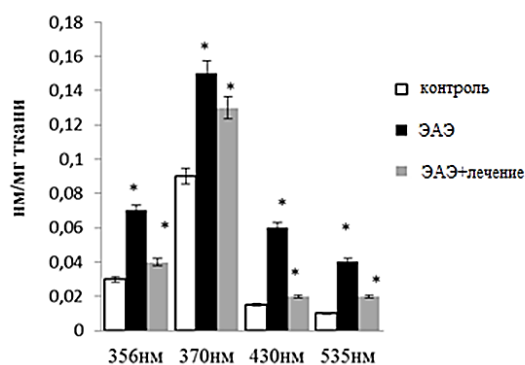


Рис. 7. Содержание карбонильных производных динитрофенилгидразонов в гомогенате головного мозга в норме, при аутоиммунном энцефаломиелите и при лечении, \* $p \leq 0,001$ ,

356 нм – алифатические КДНФГ нейтрального характера;

370 нм – алифатические АДНФГ нейтрального характера;

430 нм – алифатические КДНФГ основного характера;

535 нм – алифатические АДНФГ основного характера

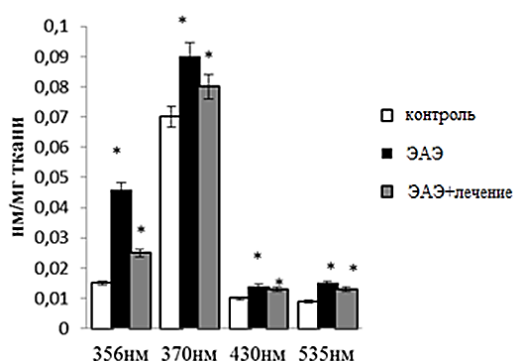


Рис.8. Содержание карбонильных производных динитрофенилгидразонов в гомогенате спинного мозга в норме, при аутоиммунном энцефаломиелите и при лечении, \* $p \leq 0,001$ ,

356 нм – алифатические КДНФГ нейтрального характера;

370 нм – алифатические АДНФГ нейтрального характера;

430 нм – алифатические КДНФГ основного характера;

535 нм – алифатические АДНФГ основного характера

Анализ полученных нами данных показал, что у крыс с моделированным аутоиммунным энцефаломиелитом уровень карбонильных групп белков в головном мозге значительно выше, чем в группе контрольных. Это свидетельствует о возрастании окислительного повреждения белков

при ЭАЭ. При действии АФК происходит нарушение нативной конформации белков с образованием крупных белковых агрегатов или фрагментации белковой молекулы. Гидроксильный радикал чаще всего вызывает агрегацию белков, а в комбинации с супероксиданионом – фрагментацию с образованием низкомолекулярных фрагментов.

Фактически, все аминокислотные остатки белков способны к окислению, что приводит к изменению функций. Окислению подвергаются сульфо- и амингидроксильные группы аминокислот, следствием чего является образование поперечных сшивок между белками или между белком и другой молекулой, содержащей  $\text{NH}_2$ -группу.

Из литературных данных известно, что окислительная модификация рассматривается как один из ранних маркеров окислительного стресса. Характер окислительной модификации белка зависит от типа АФК. Так радикал  $\text{OH}^\cdot$  чаще всего вызывает агрегацию белков, а в комбинации с  $\text{O}_2^-$  – фрагментацию. В первом случае образуются ковалентносвязанные белковые агрегаты в виде высокомолекулярных форм – димеров, тримеров и даже тетрамеров. Окисленные белки могут быть причиной процесса демиелинизации, приводящей к каскаду патологических процессов развивающихся при РС. Повышение свободнорадикальных продуктов липидов и белков в клетке приводит к нарушению функционирования и других субклеточных компонентов клетки, таких как ядра и митохондрии.

Повышение окислительных процессов в белках и липидах, может быть причиной патологических изменений в миелине, приводящих к нарушению нормального проведения нервного импульса, нарушению рецепторных, медиаторных систем, результатом чего являются процессы демиелинизации. Введение кронассиала приводило к частичной нормализации окислительных процессов белков. Механизм протекторного действия кронассиала может быть объяснен его действием на активность  $\text{Na/K}$ -АТФазы в нервных клетках и синапсосах мозга. Из литературных данных известно, что нейропротекторное действие ганглиозидов может быть обусловлено их способностью предотвращать инактивацию  $\text{Na/K}$ -АТФазы и увеличением входа  $\text{Ca}^{2+}$  в нервные клетки [7]. Разрушение миелина считается универсальным механизмом реакции на повреждение. В случае прогрессирования демиелинизации и при поражении 40-60% всех миелиновых оболочек развиваются различные неврологические синдромы, совокупность которых обобщается термином демиелинизирующие заболевания [9]. Мы предполагаем, что одной из наиболее вероятной причиной повреждения миелина может быть повышенное образование продуктов окислительного стресса – перекисей, гидроперекисей, окисленных белков, приводящих к дисфункции митохондрий, дефициту энергии, необходимой для нормального протекания клеточных процессов. Из литературных данных известно об антиоксидантных свойствах ганглиозидов, способных ингибировать образования активных форм кислорода [3].



Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о нейропротекторном и антиоксидантном воздействии препарата кронассиал при введении животным с аутоиммунным энцефаломиелитом.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета по науке МОНК РА в рамках научного проекта № 21Т-1F310*

*Поступила 04.11.22*

**Փորձարարական աուտոիմուն էնցեֆալոմիելիտով առնետների ուղեղում և ողնուղեղում օքսիդային սթրեսի զարգացման ժամանակ զանգվիոզիդ պարունակող դեղամիջոցի ազդեցության ուսումնասիրություն**

**Գ.Ս.Ղազարյան, Հ.Վ. Զանգինյան, Լ.Մ.Հովսեփյան**

Բազմակի սկզբնաղբ միելինային հիվանդությունների ամբողջ խմբում ամենատարածվածն է: Սովորաբար այն սկսվում է երիտասարդ տարիքից և գրեթե անխուսափելիորեն հանգեցնում է հաշմանդամության: Մարդու բազմակի սկզբնաղբի մոդել է առնետների փորձարարական աուտոիմուն էնցեֆալոմիելիտը: Վերջին տարիներին առկա են բազմաթիվ տվյալներ, որոնք ցույց են տալիս օքսիդատիվ սթրեսի զգալի պաթոգենետիկ դերը իմունային բորբոքման հետևանքով առաջացած միելինային բջիջների վնասման մեջ: Դրա հիման վրա առանձնահատուկ նշանակություն ունի դեղամիջոցների օգտագործումը, որոնք նվազեցնում են օքսիդատիվ սթրեսի զարգացումը:

Աշխատանքի նպատակն է ուսումնասիրել զանգվիոզիդ պարունակող պրեպարատի ազդեցությունը լիպիդների ազատռադիկալային օքսիդացման, ուղեղի և ողնուղեղի սպիտակուցների օքսիդատիվ ձևափոխման զարգացման վրա մոդելավորված առնետների մոտ: Որպես թերապևտիկ միջոց՝ մենք օգտագործել ենք քրոնասիալ դեղամիջոցը, որի կառուցվածքը ներառում է մոնո-դի-տրի-սիալզանգվիոզիդներ: Ստացված տվյալները բացահայտում են հետազոտվող քրոնասիալ դեղամիջոցի հակաօքսիդիչ և նյարդապաշտպանիչ ազդեցությունն աուտոիմուն էնցեֆալոմիելիտ ունեցող կենդանիների վրա:

**Study of the Effect of a Ganglioside-Containing Drug on the Development of Oxidative Stress in the Brain and Spinal Cord in Rats with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis**

**G. S. Ghazaryan, H. V. Zanginyan, L. M. Hovsepyan**

The most common disease of the entire group of myelin diseases is multiple sclerosis. Usually the disease begins at a young age and almost inevitably leads to disability. Experimental autoimmune encephalomyelitis in rats is an experimental model of human multiple sclerosis. In recent years, more and more data have appeared

indicating a significant pathogenetic role of oxidative stress in damage to myelin cells caused by immune inflammation. Based on this, the use of drugs that reduce the development of oxidative stress is of particular importance.

The aim of the work was to study the effect of ganglioside-containing drugs on the development of free radical lipid oxidation, protein oxidative modification in the brain and spinal cord in rats with experimentally induced allergic encephalitis. As a therapeutic agent, we used the drug Cronassial, the structure of which includes mono-di-tri-sialgangliosides. The data obtained indicate the neuroprotective and antioxidative effect of Cronassial when administered to animals with autoimmune encephalitis.

## Литература

1. Аврова Н.Ф. Ганглиозиды мозга и их функции как природных адаптогенов. Рос. физиол. журнал, 2020, т.106, 5, с. 563–583. DOI: 10.31857/S086981392005002
2. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. СПб., 2000.
3. Власова Ю.А. Защитный и антиоксидантный эффект ганглиозидов. Сб. научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине». Под ред. А.В. Силина, Л.Б. Гайковой, 2020.
4. Дерюгина А.В., Корягин А.С., Копылова С.В., Таламанова М.Н. Методы изучения стрессовых и адаптационных реакций организма по показателям системы крови. Нижний Новгород, 2010.
5. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белка сыворотки крови человека, метод ее определения. Вopr. мед. химии, 1995, т.41, 1, с. 24–26.
6. Захарова М.Н., Абрамова А.А. и др. Рассеянный склероз: вопросы диагностики и лечения. М., 2018.
7. Захарова И.О., Баюнова Л.В., Зорина И.И., Шпаков А.О., Аврова Н.Ф. Инсулин и ганглиозиды мозга предотвращают нарушения метаболизма, вызванные активацией свободнорадикальных реакций при двухсосудистой ишемии переднего мозга крыс и реперфузии. Рос. физиол. журнал, 2022, т.108, 2, с. 262–278. DOI: 10.31857/S086981392202011X
8. Пирадов М.А. Аутоиммунные заболевания нервной системы: состояние проблемы и перспективы. Вестник Российской академии мед. наук. 2015, т.70, 2, с.183-187. DOI: 10.15690/vramn.v70i2.1311
9. Cotsapas C. Multiple sclerosis / Cotsapas C., Mitrovic M., Hafler D. Handbook of Clinical Neurology, Elsevier, 2018, vol. 148, pp. 723-730. DOI: 10.1016/B978-0-444-64076-5.00046-6.
10. Hermetter C. Systematic review: syndromes, early diagnosis, and treatment in autoimmune encephalitis / Hermetter C., Fazekas F., Hochmeister S. Frontiers in neurology, 2018, vol. 9, pp. 706. doi: 10.3389/fneur.2018.00706.
11. Korotkov S. M., Sokolova T. V., Avrova N. F. Gangliosides GM1 and GD1a normalize respiratory rates of rat brain mitochondria reduced by tert-butyl hydroperoxide. J. Evol. Biochem. Physiol., 2017, 53(3): 200-207.

12. *Li. L., Tian J., Long M. K., Chen Y., Lu J., Zhou C., Wang T.* Protection against experimental stroke by ganglioside GM1 is associated with the inhibition of autophagy. *PLoS One.* 11(1): e0144219. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0144219
13. *Pachner A. R.* Experimental models of multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.*, 24, 291-299 (2011). DOI: 10.1097/WCO.0b013e328346c226
14. *Sipione S., Monyror J., Galleguillos D., Steinberg N., Kadam V.* Gangliosides in the Brain: Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Applications. *Neurosci.*, 06 October 2020, DOI: 10.3389/fnins.2020.572965.
15. *Solleiro-Villavicencio H., Rivas-Arancibia S.* Effect of Chronic Oxidative Stress on Neuroinflammatory Response Mediated by CD4<sup>+</sup>T Cells in Neurodegenerative Diseases *Cell. Neurosci.*, 27 April 2018, Sec.Non-Neuronal Cells DOI: 10.3389/fncel.2018.00114.