

УДК 546.262.3-31 : 615.9

# ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА КК1 НА СОДЕРЖАНИЕ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ ОСТРОЙ ТЯЖЁЛОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ОКСИДОМ УГЛЕРОДА

П.Г. Толкач<sup>1</sup>, В.А. Башарин<sup>1</sup>, А.А. Колобов<sup>2</sup>,  
Н.Ю. Роговская<sup>3</sup>, В.Н. Бабаков<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБВОУВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, 194044, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>2</sup>ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, 197110, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>3</sup>ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, г.п. Кузьмоловский, Капитолово, Российская Федерация

**И**нтотоксикация оксидом углерода приводит к развитию отдалённых нарушений функций центральной нервной системы. Эти нарушения не могут быть связаны только с развитием гемической гипоксии. В ряде исследовательских работ были описаны неспецифические нейротоксические механизмы действия оксида углерода, одним из которых является активация программируемой клеточной гибели, развивающейся по типу апоптоза. Одним из препаратов, обладающих нейропротективным механизмом действия, является синтетический аналог последовательность адренокортикотропного гормона – пептид КК1. В данном исследовании лабораторные животные подвергались острой тяжёлой интоксикации оксидом углерода в дозе 0,8 LC<sub>50</sub> в течение 30 мин. Пептид КК1 вводили интраназально в дозе 40 мкг/кг/сут в течение 5 дней. В гомогенатах головного мозга крыс исследовали содержание активных форм маркерных белков, ассоциированных с ранними стадиями апоптоза в различные сроки после интоксикации оксидом углерода. В результате проведённого исследования было установлено, что применение пептида КК1 приводит к снижению содержания активных форм белка p53 и протеинкиназы Akt1 на 7 и 14 сут после тяжёлого отравления оксидом углерода. Результаты проведённого эксперимента позволяют сделать предположение, что потенциальный механизм нейропротективного действия синтетического тетрапептида КК1 при данном виде патологии связан с ограничением развития апоптоза в головном мозге.

**Ключевые слова:** оксид углерода, нейротоксичность, апоптоз, протеинкиназа Akt1, белок p53, пептид КК1.

**Введение.** Интоксикация оксидом углерода (СО, угарный газ) является одной из ведущих причин летальных исходов от острых отравлений в России и мире [1,2]. Клинические проявления интоксикации СО могут варьировать от головной боли, тошноты и головокружения до угнетения сознания и летального исхода [3]. У половины пострадавших, подвергшихся тяжёлой интоксикации СО, после асимптоматического периода, могут развиваться отдалённые нарушения функ-

ций центральной нервной системы (ЦНС), варьирующие от лёгкого когнитивного дефицита до тяжёлой деменции, психозов, симптомов паркинсонизма и др. [4,5].

Основной механизм токсического действия СО заключается в развитии гемической гипоксии, вследствие образования карбоксигемоглобина (HbCO) [6]. Однако развитие гемической гипоксии не может в полной мере объяснить отдалённые нарушения, развивающиеся после от-

**Толкач Павел Геннадьевич (Tolkach Pavel Gennad'evich)**, капитан медицинской службы, ФГБВОУВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, 194044, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, pusher6@yandex.ru

**Башарин Вадим Александрович (Basharin Vadim Aleksandrovich)**, доктор медицинских наук, начальник кафедры военной токсикологии и медицинской защиты ФГБВОУВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, 194044, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, basharin@mail.ru

**Колобов Александр Александрович (Kolobov Aleksandr Aleksandrovich)**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией химии пептидов ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, 197110, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, kolobov@hpb-spb.com

**Роговская Надежда Юрьевна (Rogovskaya Nadezhda Yurevna)**, научный сотрудник ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, г.п. Кузьмоловский, Капитолово, Российская Федерация, niigrech@rihophe.ru

**Бабаков Владимир Николаевич (Babakov Vladimir Nikolaevich)**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, г.п. Кузьмоловский, Капитолово, Российская Федерация, niigrech@rihophe.ru

равления этим ядом [7]. В ряде исследовательских работ были описаны неспецифические нейротоксические механизмы действия CO, в число которых входят развитие оксидативного стресса [8], нарушение межклеточной сигнализации [9] и др. Ещё одним механизмом нейротоксического действия CO, ответственным за развитие отдалённых нарушений, может быть активация программируемой клеточной гибели, развивающейся по типу апоптоза [10].

Белки-регуляторы апоптоза, подразделяются на проапоптотические и антиапоптотические [11]. Белок p53 обладает апоптотическими свойствами, является фактором транскрипции, регулирующим активность ряда антионкогенов, кодирующих проапоптотические белки [11]. Протеинкиназа Akt1 (серин-треониновая протеинкиназа) обладает антиапоптотическим действием, являясь ингибитором целой группы проапоптотических белков, опосредующих митохондриальный и FAS-лиганд-зависимый механизмы апоптоза [12]. Исследование содержания этих белков в структурах ЦНС в различные периоды после интоксикации CO может быть использовано для исследования механизмов нейротоксического действия данного токсиканта, а также скрининга препаратов, обладающих антиапоптотической активностью.

Синтетический тетрапептид КК1, являющийся структурным аналогом последовательности фрагмента адренокортикотропного гормона (Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide), обладает нейропротективными механизмами действия, продемонстрированными на различных моделях поражения ЦНС у лабораторных животных [13]. В литературе отсутствуют данные о влиянии этого препарата на процессы апоптоза, развивающиеся после тяжёлой интоксикации CO.

*Целью данного исследования* явилось изучение влияния пептида КК1 на содержание маркеров апоптоза в головном мозге лабораторных животных в отдалённом периоде тяжёлой интоксикации оксидом углерода.

**Материалы и методы исследования.** Моделирование острого тяжёлого отравления лабораторных животных (белых крыс) оксидом углерода осуществляли статическим методом с использованием герметичной затравочной камеры объёмом 0,1 м<sup>3</sup>. Концентрация CO составила 0,8 LC<sub>50</sub>, что при экспозиции 30 мин соответствовало 4500±350 ppm. Содержание CO в ингаляционной камере контролировали при помощи газоанализатора ДАХ-М-03 («Аналит-Прибор», Россия).

Лабораторные животные были подразделены на три группы. Первая группа – интактные животные, которые находились в течение 30 мин в ингаляционной камере содержащей атмосфер-

ный воздух. Вторая группа (CO) – животные, которые подвергались интоксикации оксидом углерода. Третья группа (CO+КК1) – животные, которые подвергались интоксикации оксидом углерода и получали пептид КК1.

Синтетический тетрапептид КК1 вводили интраназально в дозе 40 мкг/кг/сут в течение 5 дней, первое введение осуществлялось непосредственно после окончания интоксикации CO.

Содержание HbCO в крови лабораторных животных определяли спектрофотометрическим методом после окончания интоксикации [14].

Оценку содержания активных форм белка p53 и протеинкиназы Akt1 производили в гомогенатах цельного головного мозга крыс на 7, 7 и 14 сут после острой тяжёлой интоксикации CO. Так как пептид КК1 вводился в течение 5 дней после окончания воздействия CO, то определение маркеров апоптоза в этой группе животных проводили на 7 и 14 сут после интоксикации. Головной мозг крыс выделяли после декапитации, промывали раствором Хенкса («Биолот», Россия) и замораживали в жидком азоте. Ткань гомогенизировали растиранием в ступке с жидким азотом и хранили при –70 °С до проведения анализа. Для получения экстракта головного мозга, навеску ткани перерастворяли в лизирующем буфере (кат. № 43-040 Merk/Millipore) с добавлением набора ингибиторов протеаз (кат. № 11836153001, Complete, Roche) и ингибиторов фосфатаз (кат. № P5726 Sigma, Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, США). Экстракт гомогенизировали с помощью роторного гомогенизатора («SilentCrusher M, Heidolph», США), затем центрифугировали при 20000 g при 4°C в течение 20 мин. В супернатанте определяли концентрацию белка по методу Лоури с использованием микропланшетного спектрофотометра Epoch («Biotek», США). Для дальнейшего анализа, концентрацию белка в экстракте выравнивали до концентрации 0,8 мг/мл. Анализ активированных фосфорилированных белков – маркеров апоптоза проводили с помощью иммунофлуоресцентного метода по технологии Lumiplex xMAP. Для анализа использовали наборы реактивов для определения ранних маркеров апоптоза (7-Plex MILLIPLEX MAP Early Apoptosis Magnetic Bead Kit, Кат. № 48-669MAG Merk/Millipore, США), которые позволяют определять активированные фосфорилированные формы следующих белков: Akt1 (Ser473) и p53 (Ser46), BAD (Ser112), Bcl-2 (Ser70), JNK (Thr183/Tyr185), а также активных форм каспазы 8 (гидролизованной по Asp384) и каспазы 9 (гидролизованной по Asp315). Подготовку образцов для иммунофлуоресцентного анализа и анализ на иммунофлуоресцентном анализаторе Bio-Plex 200 (Bio-Rad) по протоколам фирм-производителей наборов реактивов

и оборудования выполнялись в ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России.

Данные, полученные в ходе экспериментальных исследований, были обработаны в программе «Statistica 6.0». Оценку различий средних значений проводили с использованием критерия Вилксона-Манна-Уитни.

Эксперименты проводились в соответствии с Приказом Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 года № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»

**Результаты и обсуждение.** У животных (СО) группы во время нахождения в камере с оксидом углерода в концентрации  $0,8 LC_{50}$  возникали признаки интоксикации. Так, после короткого периода возбуждения, наблюдалась гипокинезия, атаксия и уже через  $3,82 \pm 0,31$  мин после начала интоксикации положение тела животных в пространстве расценивалось как «на животе». Через  $9,87 \pm 1,07$  мин фиксировалось боковое положение тела животных, развивался гипертонус мышц, локальные миофасцикуляции и тонические судороги. Боковое положение тела и гипертонус мышц сохранялись до момента извлечения животных из камеры. Непосредственно после извлечения животных из камеры у них наблюдалась анальгезия и терманестезия. Восстановление положения тела в пространстве происходило через  $9,74 \pm 2,19$  мин, а восстановление мышечного тонуса отмечено на  $18,03 \pm 1,96$  мин после извлечения из камеры. Гибель животных происходила только во время нахождения их в ингаляционной камере с СО, летальность составила  $22,5 \pm 9,2\%$ . К концу 1 сут после интоксикации поведение, потребление пищи и воды у животных групп (СО) и (СО+КК1) не отличалось от интактной группы.

Содержание НвСО в крови лабораторных животных непосредственно после окончания интоксикации составляло  $69,7 \pm 2,3\%$ . Такой уровень карбоксигемоглобина и описанные клинические проявления свидетельствуют о развитии у крыс тяжёлой степени отравления оксидом углерода [15].

Для оценки содержания маркеров апоптоза в гомогенатах головного мозга крыс после тяжёлой интоксикации СО исследовали содержание основных ключевых активированных внутриклеточных маркеров развития раннего апоптоза. В результате проведённого исследования установлено, что содержание активной формы протеинкиназы Akt1 в группе (СО) значимо ( $p \leq 0,05$ ) увеличивалось на 7 и 14 сут после интоксикации в сравнении с интактной группой. В группах животных, получавших в качестве лечения пептид КК1 содержание активной формы протеинкиназы Akt1 на 7 и 14 сут после воздействия СО, было значимо ( $p \leq 0,05$ ) ниже, чем в (СО) группе и не отличалось от интактной группы (табл. 1).

Аналогичная динамика наблюдалась при исследовании содержания активной формы белка p53. Так, выявлено его увеличение на 7 и 14 сут после интоксикации в (СО) группе по сравнению с интактными животными. Применение пептида КК1 приводило к значимому ( $p \leq 0,05$ ) снижению содержания белка p53 по сравнению с (СО) группой на 7 и 14 сут после интоксикации (табл. 2).

Таким образом, выявлено, что интоксикация СО приводила к увеличению содержания активных форм проапоптотического белка p53 и антиапоптотической протеинкиназы Akt1 в отдалённом периоде интоксикации, а лечебное применение пептида КК1 способствовало снижению содержания этих маркеров апоптоза.

Роль опосредованного нейротоксического действия СО в развитии когнитивных нарушений была доказана в экспериментах, моделирующих гипоксическую гипоксию. Так были продемонстрированы существенные различия по биохимическим и гистологическим признакам повреждения ЦНС в сравнении с экспериментальными моделями интоксикации угарным газом [6].

Одним из опосредованных механизмов развития нарушений когнитивных функций при данном виде патологии является активация программируемой клеточной гибели в нейронах по типу апоптоза [10,16]. Так, в исследованиях различных авторов было показано, что процессы апоптоза в структурах ЦНС лабораторных животных после тяжёлой интоксикации СО начинают развиваться уже на 1 сут после окончания интоксикации, достигают максимума на 7 сут и сохраняются до 21 сут [10,17]. Таким образом, эти процессы могут обуславливать развитие нарушений функций ЦНС как в раннем, так и в отдалённом периоде интоксикации оксидом углерода и могут быть ответственны за развитие токсической энцефалопатии у пострадавших.

Одним из ключевых белков-регуляторов апоптоза является белок p53. Активация p53-сигнального внутриклеточного пути приводит к активации проапоптотических белков Bax, Bad и др. Активированные проапоптотические белки Bax и Bad способствуют формированию пор во внешней митохондриальной мембране, что приводит к выходу цитохрома С и активации внутреннего (митохондриального) пути развития апоптоза [18]. Одним из возможных путей активации p53-сигнального пути может быть увеличение содержания фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1a) [20].

Протеинкиназа Akt1 является антиапоптотическим белком. В активированном состоянии она фосфорилирует белки Bad и Bax, что приводит к ингибированию их проапоптотической функции, блокирует выход цитохрома С из митохондрий, тем самым предотвращает активацию

митохондриального пути развития апоптоза [11]. Активация Akt1/mTOR сигнального пути также может, запускается фактором HIF-1 $\alpha$  [21].

В нашем исследовании лабораторные животные были подвергнуты острой тяжёлой интоксикации CO в дозе 0,8 LC<sub>50</sub> в течение 30 мин. Степень тяжести интоксикации подтверждалась клиническими проявлениями и уровнем HbCO в крови лабораторных животных [15]. При оценке содержания маркеров апоптоза было выявлено, что интоксикация CO не приводила к увеличению содержания активных форм белка p53 и протеинкиназы Akt1 в головном мозге крыс на 1 сут после интоксикации. Достоверное увеличение содержания этих маркеров апоптоза в (CO) группе наблюдалось на 7 и 14 сут после интоксикации в сравнении с интактной группой (табл. 1, 2).

Активация про- и антиапоптотических систем, как правило, происходит одновременно и, в зависимости от интенсивности стимула, может приводить к противоположным результатам – к гибели клетки при интенсивном стрессовом стимуле или к выживанию клетки при восстановлении нормальных условий жизнедеятельности. В исследовании В. Wegiel (2008) продемонстрировано, что одной из мишеней CO-опосредованной регуляции апоптоза является транскрипционный фактор HIF-1 $\alpha$ , экспрессия которого увеличивается под влиянием CO [22]. Таким образом, одновременная активация белка p53 и Akt1 в головном мозге крыс в отдалённом периоде интоксикации может быть объяснена увеличением содержания фактора HIF-1 $\alpha$ , вследствие усиления его экспрессии оксидом углерода.

Для коррекции апоптоза в головном мозге крыс после тяжёлой интоксикации CO использовали синтетический тетрапептид КК1. На модели реперфузионного повреждения головного мозга применение пептида КК1 приводило к выраженному снижению уровня фрагментированной ДНК, что может свидетельствовать о наличии антиапоптотического механизма действия у этого препарата [19].

В нашем исследовании было установлено, что лечебное применение пептида КК1 приводило к снижению содержания активных форм, как протеинкиназы Akt1, так и белка p53 в головном мозге крыс на 7 и 14 сут после воздействия CO. Вероятно, пептид КК1 через влияние на HIF-1 $\alpha$  блокирует активацию белка

Таблица 1

**Влияние КК1 (40 мкг/кг/сут, 5 сут) на содержание активной формы протеинкиназы Akt1 в гомогенатах головного мозга крыс при тяжёлом отравлении CO (0,8 LC<sub>50</sub>, 30 мин), интенсивность флуоресценции, отн. ед. (M $\pm$ m<sub>x</sub>)**

Группы животных	Сроки после воздействия CO, сут		
	1	7	14
Интактные	12,25 $\pm$ 5,31		
CO	11,25 $\pm$ 4,25	28,17 $\pm$ 3,07*	21,83 $\pm$ 1,83
CO+КК1	-	9,32 $\pm$ 4,14#	9,51 $\pm$ 0,29#

Примечание: \* – различия (по U-критерию Манна-Уитни) значимы по сравнению с интактной группой ( $p \leq 0,05$ )  
# – различия (по U-критерию Манна-Уитни) значимы по сравнению с группой CO ( $p \leq 0,05$ ); в каждой группе  $n = 6$

Таблица 2

**Влияние КК1 (40 мкг/кг/сут, 5 сут) на содержание активной формы белка p53 в гомогенатах головного мозга крыс при тяжёлом отравлении CO (0,8 LC<sub>50</sub>, 30 мин), интенсивность флуоресценции отн. ед. (M $\pm$ m<sub>x</sub>)**

Группы животных	Сроки после воздействия CO, сут		
	1	7	14
Контроль	4,63 $\pm$ 1,91	4,63 $\pm$ 1,91	4,63 $\pm$ 1,91
CO	6,25 $\pm$ 3,75	30,83 $\pm$ 7,16*	10,51 $\pm$ 3,42
CO+КК1	-	7,51 $\pm$ 3,75#	2,33 $\pm$ 1,45#

Примечание: \* – различия (по U-критерию Манна-Уитни) значимы по сравнению с интактной группой ( $p \leq 0,05$ )  
# – различия (по U-критерию Манна-Уитни) значимы по сравнению с группой CO ( $p \leq 0,05$ ); в каждой группе  $n = 6$

p53 и протеинкиназы Akt1 на фоне интоксикации CO, что приводит к ограничению апоптоза в головном мозге крыс при данном виде патологии.

**Заключение.** Результаты проведённых экспериментов позволяют сделать предположение, что потенциальный механизм нейропротективного действия синтетического тетрапептида КК1 при острой тяжёлой интоксикации CO может быть связан с ограничением развития апоптоза в головном мозге.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зобнин Ю. В. Отравление монооксидом углерода (угарным газом). СПб.: Тактик-Студио; 2011.
2. Braubach M., Algoet A., Beaton M. et al. Mortality associated with exposure to carbon monoxide in WHO European member states. *Indoor Air*. 2013; 23: 115-25.
3. Weaver L.K. Clinical practice. Carbon monoxide poisoning. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360: 1217-25.
4. Oh S., Choi S. Acute carbon monoxide poisoning and delayed neurological sequelae: a potential neuroprotection bundle therapy. *Neural Regen. Res.* 2015; 10(1): 36-38.
5. Prockop L.D., Chichkova R.I. Carbon monoxide intoxication: an updated review. 2007; 262 (1-2): P. 122-30.
6. Тиунов Л. А. Токсикология окиси углерода. М.: Медицина: 1980.
7. Piantadosi C.A., Carraway M.S., Suliman H.B. Carbon monoxide, oxidative stress and mitochondrial permeability pore transition. *Free Radic. Biol. Med.* 2006; 40(8): 1332-39.
8. Thom R.S., Bhopale V.M., Hun S. et al. Intravascular neutrophil activation due to carbon monoxide poisoning. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 174 (11): 1239-49.
9. Park E.J., Min Y., Kim G. et al. Pathophysiology of brain injuries in acute carbon monoxide poisoning: a novel hypothesis. *Med. Hypotheses*. 2014; 83: 186-89.
10. Piantadosi C.A., Zhang J., Levin E. et al. Apoptosis and delayed neuronal damage after carbon monoxide poisoning in the rat. *Exp. Neurol.* 1997; 147 (1): 103-14.
11. Вересов В. Г. Структурная биология апоптоза. Минск: Белорус. наука; 2008.
12. Claerhout S., Decraene D., Van Laethem A. et al. AKT delays the early-activated apoptotic pathway in UVB-irradiated keratinocytes via BAD translocation. *J. Invest. Dermatol.* 2007; 127 (2): 429-38.
13. Тетрапептид и средство, обладающее церебропротекторной и антиамнестической активностью (варианты) // Патент 2537560 С2 РФ. 2014 г.
14. Методические указания о количественном определении карбоксигемоглобина и карбоксимемоглобина. М.: МЗ СССР, 1974.
15. Шперлинг И. А. Патология эритроцита при экзогенных интоксикациях. Томск: Изд-во Томского ун-та: 2006.
16. Tofiahi R. Hypoxia-independent apoptosis in neural cells exposed to CO in vitro. *Brain Resear.* 2006; 1098: 1-8.
17. Li Q., Cheng Y., Bi M.G. et al. Effects of N-Butylphthalide on the expressions of Nogo/NgR in rat brain tissue after carbon monoxide poisoning. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2015; 39 (2); 953-61.
18. Черешнев В. А. Фармакологическое регулирование программированной гибели клеток. СПб.: Наука; 2011.
19. Deiko D.R., Shtrygol` S.Yu., Kolobov A.A. The mechanism of neuroprotective action of new oligopeptides-homologus of primary ACHT15-18 sequence. Topical issues of new drug development: abstracts of International Scientific and Practical Conference of Young Scientist and Students (April 23 2015). – Kh.: Publishing office NUPH, 2015; 307-8.
20. Halterman M.W., Miller C.C., Federoff H.J. Hypoxia-inducible factor-1 alpha mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53. *J. Neurosci.* 1999; 19: 6818-24.
21. Pore N, Jiang Z, Shu H.K. et al. Akt1 activation can augment hypoxia-inducible factor-1alpha expression by increasing protein translation through a mammalian target of rapamycin-independent pathway. *Mol. Cancer Res.* 2006 Jul; 4(7): 471-9.
22. Wegiel B., Chin B.Y., Otterbein L.E. Inhale to survive, cycle or die? *Cell Cycle.* 2008; 7: 1379-84.

## REFERENCES:

1. Zobnin Yu.V. Carbon monoxide poisoning (Carbon monoxide). SPb.: Taktik-Studio; 2011 (in Russian).
2. Braubach M., Algoet A., Beaton M. et al. Mortality associated with exposure to carbon monoxide in WHO European member states. *Indoor Air*. 2013; 23: 115-25.
3. Weaver L.K. Clinical practice. Carbon monoxide poisoning. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360: 1217-25.
4. Oh S., Choi S. Acute carbon monoxide poisoning and delayed neurological sequelae: a potential neuroprotection bundle therapy. *Neural Regen. Res.* 2015; 10(1): 36-38.
5. Prockop L.D., Chichkova R.I. Carbon monoxide intoxication: an updated review. 2007; 262 (1-2): P. 122-30.
6. Тиунов Л.А. Toxicology of carbon monoxide. Moscow: Medicina: 1980 (in Russian).
7. Piantadosi C.A., Carraway M.S., Suliman H.B. Carbon monoxide, oxidative stress and mitochondrial permeability pore transition. *Free Radic. Biol. Med.* 2006; 40(8): 1332-39.
8. Thom R.S., Bhopale V.M., Hun S. et al. Intravascular neutrophil activation due to carbon monoxide poisoning. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 174 (11): 1239-49.
9. Park E.J., Min Y., Kim G. et al. Pathophysiology of brain injuries in acute carbon monoxide poisoning: a novel hypothesis. *Med. Hypotheses*. 2014; 83: 186-89.
10. Piantadosi C.A., Zhang J., Levin E. et al. Apoptosis and delayed neuronal damage after carbon monoxide poisoning in the rat. *Exp. Neurol.* 1997; 147 (1): 103-14.
11. Veresov V.G. Structural biology of apoptosis. Minsk: Belorus. nauka; 2008 (in Russian).
12. Claerhout S., Decraene D., Van Laethem A. et al. AKT delays the early-activated apoptotic pathway in UVB-irradiated keratinocytes via BAD translocation. *J. Invest. Dermatol.* 2007; 127 (2): 429-38.
13. Patent RU 2537560 C2 .The tetrapeptide and means having cerebroprotective and antiamnesic activity (options). 2014 (in Russia).
14. Guidelines for the quantitative determination of carboxyhemoglobin and carboxyhemoglobin. Moscow.: MH USSR; 1974 (in Russian).
15. Shperling I.A. Pathology of the erythrocyte after exogenous intoxication. Tomsk: Izd-vo Tomskogo un-ta; 2006 (in Russian).
16. Tofiahi R. Hypoxia-independent apoptosis in neural cells exposed to CO in vitro. *Brain Resear.* 2006; 1098: 1-8.
17. Li Q., Cheng Y., Bi M.G. et al. Effects of N-Butylphthalide on the expressions of Nogo/NgR in rat brain tissue after carbon monoxide poisoning. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2015; 39 (2); 953-61.
18. Chereshev V.A. Pharmacological regulation of programmed cell death. Spb.: Nauka; 2011 (in Russia).
19. Deiko D.R., Shtrygol` S.Yu., Kolobov A.A. The mechanism of neuroprotective action of new oligopeptides-homologus of primary ACHT15-18 sequence. Topical issues of new drug development: abstracts of International Scientific and Practical Conference of Young Scientist and Students (April 23 2015). – Kh.: Publishing office NUPH, 2015; 307-8.
20. Halterman M.W., Miller C.C., Federoff H.J. Hypoxia-inducible factor-1 alpha mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53. *J. Neurosci.* 1999; 19: 6818-24.
21. Pore N, Jiang Z, Shu H.K. et al. Akt1 activation can augment hypoxia-inducible factor-1alpha expression by increasing protein translation through a mammalian target of rapamycin-independent pathway. *Mol Cancer Res.* 2006 Jul; 4(7): 471-9.
22. Wegiel B., Chin B.Y., Otterbein L.E. Inhale to survive, cycle or die? *Cell Cycle.* 2008; 7: 1379-84.

P.G Tolkach<sup>1</sup>, V.A Basharin<sup>1</sup>, A.A Kolobov<sup>2</sup>, N. Yu Rogovskaya<sup>3</sup>, V.N Babakov<sup>3</sup>

## EFFECT OF KK1 PEPTIDE ON MAINTENANCE OF APOPTOSIS MARKERS IN RATS BRAIN CAUSED BY SEVERE CARBON OXIDE POISONING

<sup>1</sup> S.M. Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense of the Russian Federation, 194044, Saint-Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup> State Research Institute of High-pure Biopreparations, Federal Medical Biological Agency, 197110, Saint-Petersburg, Russian Federation

<sup>3</sup> Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical Biological Agency, 188663 Kuzmolovsky, Leningrad region, Russian Federation.

Carbon oxide poisoning leads to the development of delayed CNS functions disturbances. These disturbances may be not only linked to the development of hemic hypoxia. In a number of research works, nonspecific neurotoxic carbon oxide mechanisms of action were described, one of which is activation of programmed cell death developing as apoptosis. One of the preparations having neuroprotective action mode is a synthetic analog sequence of adrenokortikotropic hormone – KK1 peptide. In this research, laboratory animals were exposed to acute heavy carbon oxide poisoning in a dose of 0.8 LC<sub>50</sub> within 30 min. KK1 peptide was administrated intranasally in a dose of 40 mg/kg/day within 5 days. In rats brain homogenates, the maintenance of active forms of marker proteins associated with apoptosis early stages was investigated at different time after intoxication with carbon oxide. As a result of the conducted research, it was established that the use of KK1 peptide leads to the decrease of the maintenance of r53 protein active forms and Akt1 protein kinase on 7th and 14th days after a heavy poisoning with carbon oxide. Results of the experiment performed allow to suggest that at that type of pathology the potential mechanism of neuroprotective effect of synthetic KK1 tetrapeptide is connected with restricted development of apoptosis in brain.

**Keywords:** carbon oxide, neurotoxicity, apoptosis, Akt1 protein kinase, r53protein, KK1 peptide.

Материал поступил в редакцию 17.05.2016 г.