



УДК: 616.89:541.515

ГЕПАТОПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

В опытах на крысах установлено, что введение опиоидных пептидов динорфина А (1-13), DSLET или DAGO снижает стресс-индуцированную активацию перекисного окисления липидов и повышает активность ферментов антиоксидантной системы в ткани печени. Наиболее выраженным стресс-лимитирующим действием обладал агонист опиоидных кашпа-рецепторов динорфин А (1-13), что проявлялось нормализацией содержания ацилгидроперекисей на 4 сутки эксперимента, а также наибольшим стимулирующим действием на активность супероксиддисмутазы. Влияние агониста опиоидных мю-рецепторов DAGO было наименее выражено по сравнению с другими опиоидами. Применение фактора роста гепатоцитов сопровождалось снижением активности перекисного окисления липидов в ткани печени. Также введение исследованных пептидов приводило к уменьшению содержания в плазме аланинаминотрансферазы и аспаргатаминотрансферазы. Установленные эффекты могут быть связаны как с особенностями метаболизма пептидов, так и влиянием на периферические антиоксидантные системы.

А.В. СОЛИН
В.И. КОРОЗИН
Ю.Д. ЛЯШЕВ

*Курский государственный
медицинский университет*

e-mail: medps@yandex.ru

Ключевые слова: опиоидные пептиды, фактор роста гепатоцитов, стресс, перекисное окисление липидов, печень.

Стресс сопровождается нарушением микроциркуляции, развитием гипоксии органов и активацией перекисного окисления липидов (ПОЛ). Усиление процессов ПОЛ вызывает формирование дисбаланса в системе ПОЛ-антиоксидантная защита, что приводит к структурным и функциональным нарушениям различных органов и тканей, получившим название окислительный стресс [4]. Литературные данные подтверждают тот факт, что действие стрессорного фактора вызывает структурные и функциональные нарушения в печени [1]. Это обуславливает необходимость поиска новых средств предупреждения стресс-индуцированных поражений гепатоцитов.

В настоящее время эндогенная опиоидная система рассматривается как ведущий компонент антистрессорной системы организма [12]. Показано наличие, по крайней мере, трех основных типов опиоидных рецепторов (ОР), для которых установлены селективные агонисты [7, 11].

Пептид глицин-гистидин-лизин, получивший название фактор роста гепатоцитов (ГФР), не обладает выраженным антистрессорным эффектом, однако, оказывает положительное влияние на устойчивость гепатоцитов и других клеток к различным патогенным факторам, предупреждая активацию ПОЛ [13].

В этой связи целью исследования являлся сравнительный анализ влияния селективных агонистов различных типов ОР, обладающих стресс-лимитирующим действием на уровне целостного организма, и ГРФ, проявляющего выраженное гепатопротекторное действие в ткани печени, а также содержание маркеров цитолитического синдрома в различные периоды после стрессорного воздействия.

Материал и методы исследования. Работа выполнена на 128 крысах-самцах линии Вистар. Животные были разделены на 16 групп по 8 крыс в каждой. 8 животных оставались интактными. Остальным моделировали 6-часовой иммобилизационный стресс путем фиксации животного на спине на специальном столике. Животных выводили из эксперимента спустя 39 часов, 4 и 7 суток после окончания иммобилизации. Выбор указанных сроков обусловлен данными литературы о том, что максимальные повреждения внутренних органов развиваются в конце стадии тревоги (39 часов после стресса), а в начале стадии резистентности (на 4 сутки) и через 7 суток после окончания иммобилизации наглядно проявляются компенсаторные процессы в поврежденных органах [2]. Исследования проводили с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (г. Страсбург, Франция, 1986).

О состоянии процессов ПОЛ судили по содержанию в ткани печени промежуточных и конечных продуктов этих реакций: ацилгидроперекисей (АГП) и малонового диальдегида (МДА), а также активности ферментов антиоксидантной системы: супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы,



которые оценивали традиционными методами [5, 6, 9]. Степень повреждения гепатоцитов оценивали по содержанию в плазме крови ферментов аланинаминотрансферазы (АлТ) и аспаратаминотрансферазы (АсТ), которое определяли традиционными методами.

В работе использованы селективные агонисты ОР в эквиволярных дозах: DAGO (агонист мю-рецепторов) в дозе 6,3 мкг/кг, DSLET (агонист дельта-рецепторов) в дозе 10 мкг/кг, динорфин А (1-13) (агонист каппа-рецепторов) в дозе 20,1 мкг/кг [7, 11]. ГФР применяли в дозе 2 мкг/кг. Пептиды вводили внутривенно ежедневно 1 раз в сутки в течение 5 дней после проведения иммобилизации в объеме 0,2 мл. Животные, которых выводили из эксперимента через 39 часов после воздействия, получали 2 инъекции исследуемых пептидов, а крысы, которых выводили из эксперимента на 4 сутки, – 4 инъекции. Контрольным животным аналогично вводили физраствор.

Статистическую значимость различий средних величин вычисляли по t-критерию Стьюдента после проверки нормальности распределения изучаемых параметров.

Результаты исследования и их обсуждение. Моделирование стресса у крыс вызывало существенное увеличение содержания в плазме крови АсТ и АлТ через 39 часов и 4 суток после окончания иммобилизации ($p < 0,05-0,001$) (табл. 1)

Установлено, что 6-часовой иммобилизационный стресс сопровождается усилением процессов ПОЛ, что проявляется повышением концентрации в ткани печени промежуточных и конечных продуктов: АГП и МДА, на всех сроках наблюдения. Также показано повышение активности каталазы на 7 сутки, однако активность СОД при этом снижается (табл. 2).

У животных, получавших опиоидные пептиды (ОП), отмечена более низкая по сравнению с контрольными животными концентрация изучаемых аминотрансфераз в плазме крови через 39 часов и 4 суток после окончания иммобилизации ($p < 0,05-0,01$). Наиболее выраженный эффект наблюдался при введении агониста каппа-рецепторов динорфина А (1-13) и агониста дельта-рецепторов DSLET. Применение ГФР приводило к снижению концентрации аминотрансфераз только на 4 сутки эксперимента по сравнению с крысами контрольной группы ($p < 0,05$).

Использование ОП снижало степень активации ПОЛ. При сравнении эффектов отдельных препаратов установлено, что агонист опиоидных каппа-рецепторов динорфин А (1-13) оказывал наиболее выраженный антиоксидантный эффект. У крыс, получавших этот пептид, содержание ацилгидроперекисей не отличалось достоверно от интактных животных уже на 4 сутки эксперимента. Также динорфин А (1-13) вызывал наиболее выраженное увеличение активности СОД по сравнению с контрольной группой.

Таблица 1

Содержание аминотрансфераз в плазме крови крыс через 39 часов после моделирования иммобилизационного стресса ($M \pm m$), ($n=8$)

Группа Показатель	Контрольная группа	Группа, получавшая DAGO	Группа, получавшая DSLET	Группа, получавшая динорфин А	Группа, получавшая ФПГ в дозе 2 мкг/кг	Группа, получавшая ГФР в дозе 10 мкг/кг
39 часов после моделирования стресса						
АсТ	594,8±39,5	395,1±8,8*	203,5±13,1**	208,5±9,8**	601,3±11,7	567,5±5,8
АлТ	142,5±18,6	91,5±3,5*	52,1±3,2**	60,8±2,4**	135,6±26,9	143,6±3,3
4 суток после моделирования стресса						
АсТ	424,6±22,1	295,1±5,2**	278,5±13,3**	299,0±8,4**	293,0±9,6**	284,1±9,3**
АлТ	93,5±6,5	69,9±3,6*	71,6±2,8*	67,1±2,7*	78,0±3,6*	75,0±3,0*
7 суток после моделирования стресса						
АсТ	207,5±19,7	200,8±12,2	202,4±12,5	203,6±12,5	193,5±4,2	187,4±6,4
АлТ	53,3±5,2	48,2±1,6	51,1±1,3	45,2±2,1	57,0±3,1	54,5±5,1

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, ** – $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой. Интактные животные: аспаратаминотрансфераза – 190,4±10,4, аланинаминотрансфераза – 53,8±2,9

Применение агониста опиоидных дельта-рецепторов DSLET вызывало снижение содержания и АГП, и МДА, при этом нормализация показателей отмечена только на 7 сутки после иммобилизации. Также пептид повышал активность исследованных ферментов антиоксидантной системы. Агонист опиоидных мю-рецепторов DAGO оказывал наименее выраженное действие. Этот пептид не влиял практически на активность каталазы и СОД. Хотя его применение и приводило к уменьшению концентрации АГП и МДА на всех сроках эксперимента, однако содержание этих продуктов ПОЛ было выше, чем у интактных крыс.



Введение ГФР вызывало уменьшение содержания АГП и увеличение активности СОД в ткани печени на протяжении всего эксперимента по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05 - 0,001$). Концентрация МДА снижалась, а активность каталазы увеличивалась только на 4 и 7 сутки после моделирования стресса.

Использованные в работе пептиды являются селективными агонистами трех основных классов ОР. В настоящее время установлено, что эффект ОП зависит от их способности проникать через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ). На основании литературных данных [8] можно утверждать, что в использованных нами дозах изучаемые пептиды не проникают через ГЭБ, а, значит, их эффекты объясняются взаимодействием с периферическими рецепторами. В нашей работе продемонстрировано антиоксидантное действие селективных агонистов ОР в ткани печени, при этом выявлены особенности такого влияния. Возможно, эти различия связаны с устойчивостью исследованных пептидов к специфическим и неспецифическим пептидазам [10]. Выраженный протективный эффект динорфина А (1-13) по сравнению с DSLET и DAGO в ткани печени связан, по видимому, с особенностями распределения различных ОР в ткани печени.

Ранее показано, что ГФР и его производные обладают протективным действием при поражениях различных органов, вызванных ишемией-реперфузией [15, 16]. Кроме того, этот пептид предотвращает послеоперационное повреждение печени, сопровождающееся расстройствами микроциркуляции [3]. В литературе имеются сведения об эффективности ГФР при ферритин-зависимой активации ПОЛ [14]. Как установлено, в нашем исследовании защитное действие ГФР при его длительном введении, связанное с предупреждением избыточной активации ПОЛ, наблюдается и при стрессе. Это открывает новые возможности применения регуляторных пептидов для предупреждения стресс-индуцированных повреждений, поскольку ГФР не только уменьшает тканевую деструкцию, но и усиливает регенерацию тканей [13].

Полученные нами результаты позволяют говорить о высокой эффективности использования агонистов ОР и ГФР для подавления постстрессорной активации ПОЛ.

Таблица 2

Влияние опиоидных пептидов и фактора роста гепатоцитов на содержание малонового диальдегида и ацилгидроперекисей, активность ферментов антиоксидантной системы в ткани печени крыс в разные сроки после иммобилизации

Показатель	Срок после иммобилизации	Содержание малонового диальдегида, мкмоль/л, (M±m)	Содержание ацилгидроперекисей, условные единицы, (M±m)	Активность каталазы, мкат/л, (M±m)	Активность супероксиддисмутазы, условные единицы/мл, (M±m)
Исследуемая группа					
Интактная (нестрессированная) группа		17,4±0,4***	6,3±0,3***	21,1±0,9	23,1±1,0
Контрольная группа	39 часов	51,3±1,2	16,2±0,7	23,3±1,2	23,7±0,8
	4 суток	41,8±0,9	9,7±0,5	25,7±1,1	21,9±1,1
	7 суток	32,8±0,7	10,6±0,4	25,4±0,8	17,8±0,7
Группа, получавшая DAGO в дозе 6,3 мкг/кг	39 часов	43,2±0,5***	13,9±0,9	23,5±0,8	20,6±1,0
	4 суток	37,8±0,5**	8,7±0,3	23,7±1,2	23,8±0,9
	7 суток	25,6±0,4***	8,0±1,0*	24,5±0,6	24,3±1,2**
Группа, получавшая DSLET в дозе 10 мкг/кг	39 часов	36,1±0,6***	10,1±0,7***	25,9±0,5	25,6±0,8
	4 суток	27,5±0,5***	9,1±0,6	33,2±0,7***	38,4±1,2***
	7 суток	15,9±0,6***	6,0±0,5***	20,4±1,4	35,8±1,1***
Группа, получавшая динорфин А (1-13) в дозе 20,1 мкг/кг	39 часов	27,6±0,4***	9,3±0,6***	19,7±2,4	35,4±1,2***
	4 суток	25,4±0,4***	6,3±0,3***	33,5±0,8***	39,7±0,8***
	7 суток	17,5±0,3***	6,1±0,3***	21,6±1,9	46,3±0,6***
Группа, получавшая фактор роста гепатоцитов дозе 2 мкг/кг	39 часов	48,7±1,9	10,1±0,7***	24,6±1,1	28,0±1,2*
	4 суток	26,1±0,9***	7,0±0,6**	33,4±0,9***	26,5±1,6*
	7 суток	19,7±1,2***	6,3±0,6***	29,8±1,6*	22,7±1,3**

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; ** – $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; *** $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой.

Литература

1. Буеверов, А.О. Оксидативный стресс и его роль в повреждении печени/А.О. Буеверов// Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колонопроктологии- 2002.- №4.- С. 21-25.



2. Выборова, И.С. Структура печени в динамике иммобилизационного стресса/ И.С. Выборова, У. Ханджав, Л.С. Васильева, Н.Г. Макарова// Сибирский медицинский журнал.- 2005.- №3.- С. 30-33.
3. Гальперин, Э.И. Термостабильный фактор роста гепатоцитов и энергетический обмен после частичной гепатэктомии у крыс/ Э.И. Гальперин, О.Ю. Абакумова, Л.В. Платонова, Н.И. Шоно, Н.Ю. Чевокин, Г.Р. Сакеварашвили, Т.А. Цветкова, Л.И. Кондакова// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 1999.- Т.127, № 1.- С.53-56.
4. Дубинина, Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса./Е.Е. Дубинина// Вопросы медицинской химии.- 2001.- Т. 47, №6.- С. 561-581.
5. Заводская, И.С. Экспериментальное обоснование фармакотерапии сердечно-сосудистой и гастроуденальной патологии, вызванной экстремальными воздействиями на организм/ И.С.Заводская, Н.С.Сапронов, В.В.Бульон, Л.К.Хныченко Л.К // Вестник РАМН.- 1998. – № 1. С. 23-26.
6. Королюк, М.А. Метод определения активности каталазы/М.А.Королюк, Л.И..Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев// Лабораторное дело. – 1988.- № 1.- С. 16-19.
7. Лишманов Ю.Б. Опиоидные нейропептиды, стресс и адаптационная защита сердца./Ю.Б. Лишманов, Л.Н. Маслов // – Томск: Изд-во Томского ун-та, 1994.- 352с.
8. Лишманов, Ю.Б. Проницаемость гематоэнцефалического барьера для лигандов опиоидных рецепторов/ Ю.Б. Лишманов, Л.Н. Маслов, К. Райс// Экспериментальная и клиническая фармакология.- 2002.- Т.65, №4.- С. 71-77.
9. Макаренко, Е.В. Комплексное определение активности супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы в эритроцитах больных с хроническими заболеваниями печени./Е.В. Макаренко// Лабораторное дело.- 1988.- № 11. – С. 48-50.
10. Camardgo A.C.M. Protease-mediated enkephalin destruction/ A.C.M. Camardgo, M.D. Gomes, O. Toffoletto // *Neuropeptides*.- 1994.- Vol. 26, N 2.- P. 281-287.
11. Beaudry H. Activation of spinal mu- and delta-opioid receptors potently inhibits substance P release induced by peripheral noxious stimuli/ H. Beaudry, D. Dubois, L. Gendron// *Journal of Neuroscience* – 2011.- V.37, N14.- P.13068-13077.
12. Drolet G. Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response/ G. Drolet, E.C. Dumont, I. Gosselin// *Progressive Neuropsychopharmacology*.- 2001.- Vol. 25, N 4.- P. 729-741.
13. Kato, K. Effect of hepatocyte growth factor on the proliferation of intrasplenically transplanted hepatocytes in rats / K. Kato, K. Onodera, M. Sawa // *Biochemistry Biophysics Research Communications*. – 1996. – Vol. 222, №1. – P.101-106.
14. Miller D.M. Effects of glycyl-histidyl-lysyl chelated Cu(II) on ferritin dependent lipid peroxidation / D.M. Miller, D. DeSilva, L. Pickart, S.D. Aust// *Advanced Experimental Medical Biology*. – 1990. – Vol. 264, № 1. – P.79-84.
15. Shi E. Intrathecal injection of hepatocyte growth factor gene-modified marrow stromal cells attenuates neurologic injury induced by transient spinal cord ischemia in rabbits/E. Shi, X. Jiang., L. Wang X. Chang // *Anesthesiology*.- 2010.- V 113, № 5.- P.1109-1117.
16. Protective effects of HGF-MSP chimera (metron factor -1) on liver ischemia-reperfusion injury model/ F. Xue., J.J. Zhang, L.M. Xu // *Journal of Digestive Diseases*.- 2010.- V.11, № 5.- P.299-305.

HEPATOPROTECTIVE ACTION OF REGULATORY PEPTIDES IN IMMOBILIZATION STRESS

It has been established in experiments on rats, that injection of opioid peptides dynorphin A (1-13), DSLET or DAGO decreases stress-induced activation of lipid peroxidation and increases the activity of antioxidant enzymes in liver tissue. The most expressed action was characterized for dynorphin A (1-13). It's manifested by the normalization of acylhydroperoxides on the fourth day of experiment, as well as the most expressed stimulation of superoxidismutase. The influence of mu-agonist DAGO was the least expressed in comparison with other opioids. The using of hepatocyte growth factor is accompanied with the decrease of lipid peroxidation in liver tissue. The injections of investigated peptides cause the decrease of alaninaminotranferase and aspartataminotranferase content in plasma. These effects can be explained by peptides metabolism peculiarities as well as by their influence on peripheral antioxidant systems.

A.V. SOLIN
V.I. KOROSIN
YU. D. LYASHEV

Kursk State Medical University

e-mail: medps@yandex.ru

Keywords: opioid peptides, hepatocyte growth factor, stress, lipid peroxidation, liver.