

УДК [577.112.6:615.225]: 612.821.3.084

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНОЙ МОДИФИКАЦИИ МОЛЕКУЛЫ ДАЛАРГИНА НА ВАЗОАКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ ПЕПТИДА ПРИ ОСТРОМ СТРЕССЕ**Бебякова Н.А., Левицкий С.Н., Шабалина И.А.***Северный государственный медицинский университет, Архангельск, e-mail: nbebyakova@mail.ru*

Введение даларгина (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) и его стабилизированного аналога (Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Leu-Arg) в дозах 10 и 100 мкг/кг сопровождалось снижением стрессобусловленного тонуса сосудов. Вероятным механизмом такого эффекта пептидов в данных дозах является увеличение секреции NO. При этом уровень NO на фоне стимуляции опиатных рецепторов пептидами в дозе 100 мкг/кг не отличался, а в дозе 10 мкг/кг наблюдался выраженный рост NO на фоне введения стабилизированного аналога. Введение пептидов в дозе 1000 мкг/кг сопровождалось увеличением тонуса сосудов в условиях стресса. При этом на фоне введения даларгина зарегистрировано снижение NO и увеличение содержания ЭТ-1 в плазме крови, в то время как введение аналога, наоборот, сопровождалось ростом уровня NO к концу иммобилизации, что могло быть следствием стабилизации молекулы даларгина.

Ключевые слова: иммобилизация, тонус сосудов, опиоидные пептиды, опиатные рецепторы, даларгин, аналоги даларгина

INFLUENCE OF STRUCTURAL MODIFICATION OF DALARGIN MOLECULE ON PEPTIDE VASOACTIVE EFFECT IN ACUTE STRESS**Bebyakova N.A., Levitsky S.N., Shabalina I.A.***Northern State Medical University, Arkhangelsk, e-mail: nbebyakova@mail.ru*

Dalargin injection (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) and its stabilized analog (Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Leu-Arg) in dose 10 and 100 ppm was followed by stress-related vasorelaxation. Possible mechanism of such peptids effect in these doses is NO hypersecretion. However NO level during stimulation with opiate receptors with peptids in dose 100 ppm was the same, and in dose 10 ppm evident growth of NO occurred during stabilized analog injection. Peptids injection in dose 1000 ppm was followed by rise of vascular tone in stress conditions. Thus during dalargin injection NO depletion and rise of ЭТ-1 in blood plasma were registered, while analog injection, on the contrary, was followed by NO growth by the end of immobilization, that can be result of dalargin molecule stabilization.

Keywords: immobilization, vascular tone, opioid peptids, opiate receptors, dalargin, dalargin analogs

Проявление стрессобусловленных изменений в деятельности функциональных систем организма ограничивается рядом стресс-лимитирующих систем, одной из которых является опиоидергическая система. Экспериментальные исследования свидетельствуют, что синтетические аналоги опиоидных пептидов обладают кардиоваскулярной активностью [6] и в том числе способны корректировать стрессобусловленные изменения сосудистого тонуса [1]. Вероятным механизмом такого действия может быть изменение уровня эндотелиальных вазоактивных факторов – оксида азота (NO) и эндотелина-1 (ЭТ-1) на фоне активации опиатных рецепторов [2, 5].

Первым синтетическим аналогом эндогенных опиоидных пептидов, разрешённым к клиническому применению, является даларгин – аналог лей-энкефалина, неселективный агонист μ - и δ -опиатных рецепторов (ОР). Однако, согласно исследованиям, в сыворотке крови человека даларгин подвергается быстрой деградации с образованием более стабильных пента- и тетрапептидов, поэтому был создан ряд структурных аналогов, за счёт модификации молекулы даларгина, с целью придания ей большей устойчивости к деградации [7].

Цель исследования – изучить влияние неселективного агониста μ - и δ -ОР даларгина

и его стабилизированного аналога на механизмы эндотелиальной коррекции стрессобусловленного сосудистого тонуса.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили половозрелые бодрствующие самцы крыс популяции Wistar. Острый стресс моделировали путём иммобилизации животных в камере без жёсткой фиксации в течение часа [8]. Тонус сосудов измеряли методом тетраполярной реовазографии с помощью многофункционального компьютерного диагностического комплекса «Диастом-01». Запись реовазограмм хвостовой артерии крысы проводили на 5-й, 15-й, 30-й, 45-й, 60-й мин эксперимента, что позволило в динамике проследить стрессобусловленные изменения сосудистого тонуса. Функциональное состояние периферических сосудов оценивали с использованием количественных показателей: индекса периферического сопротивления (ИПС), индекса эластичности (ИЭ) [3].

Исследование включало 8 серий экспериментов по 15 особей в каждой серии. Группа интактных животных не подвергалась каким-либо воздействиям. Контрольной группе животных внутривенно вводили физиологический раствор в объёме 0,9 мл. Животным экспериментальных групп вводили даларгин (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) и его стабилизированный аналог (Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Leu-Arg), модификация которого проведена за счёт N-метилирования фенилаланинового остатка. Пептиды вводили внутривенно в объёме 0,9 мл физиологического раствора в дозах, не проникающих через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) (10 и 100 мкг/кг) и проникающих через ГЭБ (1000 мкг/кг) [9]. Даларгин и его

стабилизированный аналог синтезированы в лаборатории синтеза пептидов РКНП МЗ РФ (рук. канд. хим. наук Беспалова Ж.Д.).

Для измерения концентрации NO, ЭТ-1, кортикостерона в плазме крови, стабилизированной ЭДТА, использовали наборы для количественного определения окиси азота (R&D systems), эндотелина (1-21) (Biomedica), кортикостерона (Assay Designs) в биологических жидкостях.

Полученные количественные данные описывали с помощью медианы и процентилей: Me (P₂₅₋₇₅). Оценку статистических различий внутри групп проводили с использованием критерия Фридмана, между группами с помощью критерия Краскела-Уоллиса, с последующими апостериорными сравнениями с использованием критериев Вилкоксона и Манна-Уитни соответственно. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [10].

Результаты исследования и их обсуждение

На модели часовой иммобилизации выявлена активация гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы, которая проявлялась в повышении содержания кортикостерона в плазме крови контрольных животных на 129,9% ($p = 0,002$) по сравнению с интактными животными. В данных условиях наблюдался стрессобусловленный рост периферического тонуса сосудов и снижение их эластичности. Так, ИПС к 60-й мин эксперимента возрастал на 82,8% ($p = 0,001$), а ИЭ снижался на 49,1% ($p = 0,001$) по сравнению с 5-й мин иммобилизации (рис. 1, 2).

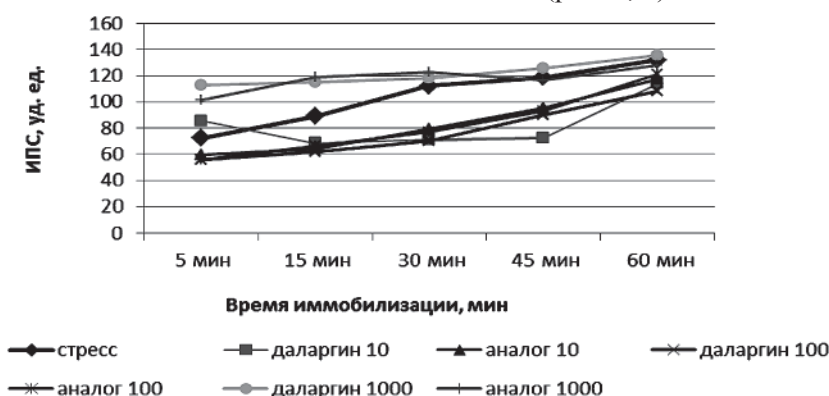


Рис. 1. Стрессобусловленные изменения ИПС на фоне введения опиоидных пептидов в разных дозах

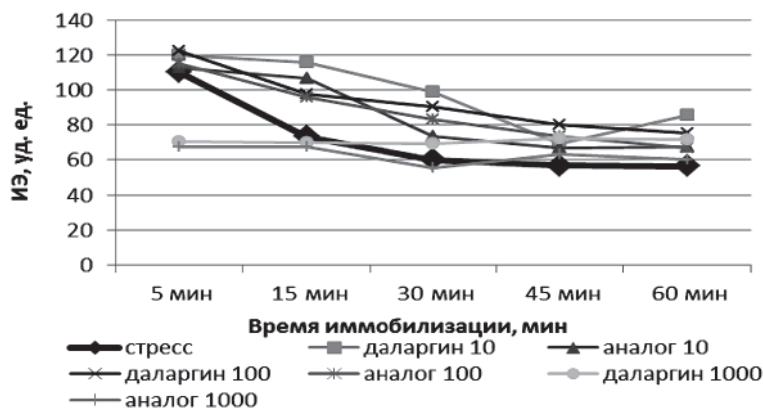


Рис. 2. Стрессобусловленные изменения ИЭ на фоне введения опиоидных пептидов в разных дозах

Изменялся уровень вазоактивных эндотелиальных факторов: происходило некоторое снижение уровня NO на 13,1% и увеличение ЭТ-1 на 8,5% по сравнению с фоновыми показателями (рис. 3, 4).

Активация ОР оказывала протективный эффект на стрессобусловленный сосудистый тонус. При введении даларгина в дозе 10 мкг/кг снижение стрессобусловленного роста сосудистого тонуса наблюдалось с 15 мин эксперимента. ИПС на 15-й мин стрессирования был ниже контрольного значения на 23,1%

($p = 0,001$). Такое значение показателя стабильно сдерживалось до 45-й мин и лишь к концу эксперимента вновь возрастало, хотя и оставалось ниже контрольного значения на 13,5% ($p = 0,001$). ИЭ, снижаясь к концу иммобилизации, остался выше контрольного значения на 51,9% ($p = 0,000$). На фоне введения даларгина в дозе 100 мкг/кг уже с 5-й мин иммобилизации наблюдалось выраженное снижение ИПС по сравнению с контролем на 22,8% ($p = 0,000$). В условиях иммобилизации наблюдался по-

степенный рост ИПС, но к 60-й мин стрессирования он остался ниже контрольного уровня на 18,3% ($p = 0,02$) (рис. 3). ИЭ был

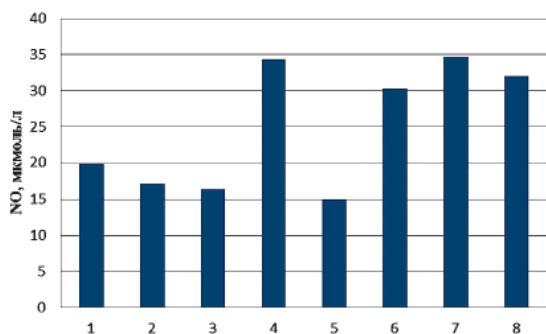


Рис. 3. Изменения уровня NO на фоне введения опиоидных пептидов в разных дозах: 1 – фон; 2 – стресс; 3 – даларгин 10 мкг/кг; 4 – даларгин 100 мкг/кг; 5 – даларгин 1000 мкг/кг; 6 – аналог 10 мкг/кг; 7 – аналог 100 мкг/кг; 8 – аналог 1000 мкг/кг

Анализ уровня эндотелиальных факторов показал, что при введении даларгина в дозе 100 мкг/кг происходило заметное увеличение NO к концу иммобилизации на 73,7% ($p = 0,003$) по сравнению с фоновым уровнем и на 100,0% ($p = 0,002$) по сравнению со стрессовым значением этого показателя (см. рис. 3). Содержание ЭТ-1 при этом заметно не изменилось (см. рис. 4). Кроме того, на фоне введения даларгина в данной дозе наблюдалась тенденция к снижению уровня кортикостерона на 9,0% по отношению к стрессовому показателю. Снижение тонуса сосудов в ответ на введение даларгина выявили и другие исследователи. Такое действие пептида связывают с активацией NO-синтазы в эндотелии сосудов [5]. При введении пептида в дозе 10 мкг/кг заметных изменений в содержании NO и ЭТ-1 к концу стрессирования не выявлено. Однако в данной дозе пептид всё же сдерживал рост тонуса сосудов в условиях стресса. Вероятно, низкая стабильность даларгина и малая доза действующего вещества привели к активации небольшого количества опиоидных рецепторов. Такая непродолжительная активация смогла запустить эндотелиальные механизмы, способствовавшие снижению тонуса сосудов в условиях стресса.

Активация периферических ОР аналогом даларгина сопровождалась снижением стрессобусловленного сосудистого тонуса на протяжении всего эксперимента. При введении аналога в дозах 10 и 100 мкг/кг ИПС уже с 5-й мин был ниже контрольного на 17,8% ($p = 0,005$) и 22,9% ($p = 0,000$), а на 60-й мин – на 11,2% ($p = 0,000$) и 8,2% ($p = 0,001$) соответственно (см. рис. 1). ИЭ в этих условиях к концу иммобилизации остался выше стрессового уровня на 23,6%

выше контрольного значения с 5-й мин на 10,9% ($p = 0,04$), а к 60-й мин – на 33,7% ($p = 0,000$) (см. рис. 1, 2).

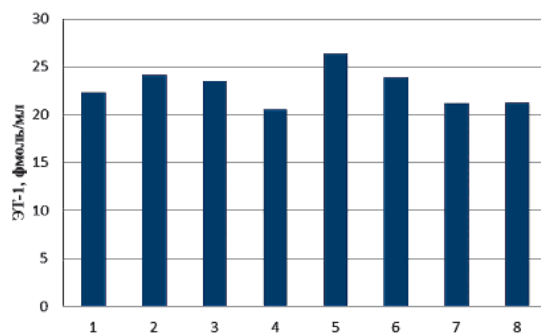


Рис. 4. Изменения уровня ЭТ-1 на фоне введения опиоидных пептидов в разных дозах: 1 – фон; 2 – стресс; 3 – даларгин 10 мкг/кг; 4 – даларгин 100 мкг/кг; 5 – даларгин 1000 мкг/кг; 6 – аналог 10 мкг/кг; 7 – аналог 100 мкг/кг; 8 – аналог 1000 мкг/кг

($p = 0,029$) и 18,6% ($p = 0,019$) соответственно (см. рис. 2). На фоне введения аналога в дозе 100 мкг/кг наблюдали снижение кортикостерона на 18,1% ($p = 0,041$).

Введение аналога даларгина сопровождалось увеличением уровня NO. Так, активация ОР пептидом в дозе 10 мкг/кг приводила к росту уровня NO как по сравнению с фоновым показателем на 53% ($p = 0,000$), так и со стрессовым значением этого показателя на 76,0% ($p = 0,000$). Введение аналога в дозе 100 мкг/кг также сопровождалось увеличением NO на 75,3% ($p = 0,000$) по сравнению с фоновыми значениями и на 101,7% ($p = 0,000$) со стрессовым уровнем (см. рис. 3). Изменения активности эндотелиновой системы в данных условиях не наблюдалось (см. рис. 4). Следовательно, снижение стрессобусловленного тонуса сосудов на фоне введения аналога даларгина в данных дозах могло быть связано с увеличением уровня вазодилатора NO. Таким образом, использование стабилизированного аналога даларгина позволило подтвердить предположение о том, что протективный эффект активации μ - и δ -ОР в дозе 10 мкг/кг также связан с активацией синтеза NO.

Введение даларгина и его стабилизированного аналога в дозе 1000 мкг/кг сопровождалось провокационным эффектом на тонус сосудов в условиях стресса (см. рис. 1, 2). Такой эффект известен для регуляторных пептидов, когда при превышении оптимальной дозы происходит уменьшение терапевтического эффекта пептида, вплоть до его исчезновения [9]. При введении даларгина на фоне острого стресса уровень NO оказался ниже фонового и стрессового значений на 24,0% ($p = 0,003$) и на 12,8% ($p = 0,02$) соответственно, а концентрация ЭТ-1, наоборот,

выше фонового на 18,4% ($p = 0,036$) и несколько выше стрессового уровня (на 7,3%) (см. рис. 3, 4). Следовательно, в данных условиях увеличение вазоконстрикторных и ослабление вазодилаторных факторов могло быть причиной увеличения стрессобусловленного тонуса сосудов. На фоне введения аналога даларгина, наоборот, наблюдали увеличение уровня NO. Известно, что стимуляция рецепторов высокими дозами агонистов может приводить к снижению аффинности или плотности рецепторов, что и могло явиться возможной причиной снижения уровня NO в ответ на введение даларгина. Стабилизированный аналог, скорость деградации которого могла быть ниже, чем у даларгина, смог взаимодействовать с рецепторами после восстановления их плотности или аффинности. Следствием такого взаимодействия вероятно и явился рост уровня NO (на 61,6%, $p = 0,003$; 86%, $p = 0,000$ в сравнении с фоном и стрессом соответственно) к концу иммобилизации.

Учитывая, что даларгин способен преодолевать ГЭБ в дозах от 1000 мкг/кг и выше [9], при периферическом введении его в дозе 1 мг/кг происходит активация не только периферических, но и центральных ОР. Гипертензивный эффект при активации центральных μ - и δ -ОР наблюдали и другие авторы [4].

Выводы

1. Активация ОР даларгинном и его структурным аналогом в дозах, не проникающих через ГЭБ, сопровождалась снижением роста тонуса сосудов в условиях иммобилизационного стресса. Изменения уровня вазоактивных факторов (NO и ЭТ-1) на фоне активации ОР пептидами в данных дозах свидетельствуют о преимущественной роли NO в протективном эффекте опиоидов на стрессобусловленную вазоконстрикцию.

2. Активация ОР даларгинном и его структурным аналогом в дозе, проникающей через ГЭБ, приводила к увеличению стрессобусловленного тонуса сосудов. Такой эффект даларгина сопровождался снижением NO и некоторым ростом ЭТ-1, в то время как провокационный эффект аналога сопровождался ростом уровня NO.

3. Стабилизация молекулы даларгина путём N-метилирования остатка фенилаланина приводила к более выраженному увеличению NO по сравнению с даларгинном в дозах 10 и 1000 мкг/кг.

Список литературы

1. Гемодинамические реакции острого стресса на фоне введения даларгина / Н.А. Бебякова, А.В. Хромова, Т.М. Командресова, С.Н. Курицын // Вестник Поморского университета: Сер. Физиологические и психолого-педагогические науки. – 2006. – №2. – С. 18–24.
2. Роль опиоидергической системы в модуляции периферического сосудистого тонуса в условиях острого

стресса / Н.А. Бебякова, Т.М. Командресова, С.Н. Курицын, А.В. Хромова, Ж.Д. Беспалова // Клиническая физиология кровообращения. – 2006. – №3. – С. 45–49.

3. Бебякова Н.А. Методика оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы мелких лабораторных животных с помощью диагностического компьютерного комплекса «Диастом-01» / Н.А. Бебякова, С.Д. Михайлова, А.В. Хромова // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2002. – №1. – С. 25.

4. Лишманов Ю.Б. Опиоидергическая регуляция состояния центральной гемодинамики / Ю.Б. Лишманов, Л.Н. Маслов // Пат. физиология и эксперим. терапия. – 2003. – №1. – С. 2–11.

5. Ангиангиальный и антиагеногенный эффект D-Ala²-Leu⁵-Arg⁶-энкефалина (даларгина) / Л.Н. Маслов, Н.А. Фёдорова, В.А. Дудко и др. // Клини. фармакология и терапия. – 2003. – №4. – С. 80–83.

6. Кардиоваскулярные эффекты D-Ala², Leu⁵, Arg⁶-энкефалина (даларгин) связаны с активацией периферических опиоидных μ -рецепторов / Л.Н. Маслов, Ю.Б. Лишманов, Е.И. Базарх и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – №2. – С. 21–28.

7. Изучение деградации даларгина и его аналогов в мембранах щётчатой каймы энтероцитов крысы методом Н-ЯМР спектроскопии / Н.Ф. Сепетов, О.Л. Исакова, Б.Л. Пекелис и др. // Бюллетень ВКНЦ АМН СССР. – 1986. – №2. – С. 86–89.

8. Судаков К.В. Олигопептиды в механизмах устойчивости к эмоциональному стрессу // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1989. – №1. – С. 3–11.

9. Титов М.И. Даларгин-пептидный препарат с цитопротективным действием / М.И. Титов, В.А. Виноградов, Ж.Д. Беспалова // Бюллетень ВКНЦ. – 1985. – №2. – С. 72–76.

10. Унгурияну Т.Н. Краткие рекомендации по описанию, статистическому анализу и представлению данных в научных публикациях / Т.Н. Унгурияну, А.М. Гржибовский // Экология человека. – 2011. – №5. – С. 55–60.

References

1. Bebyakova N.A., Khromova A.V., Komandresova T.M., Kuritsyn S.N. *Vestnik Pomorskogo Universiteta: seriya Fiziologicheskie i psikhologo-pedagogicheskie nauki*, 2006, no. 2, pp. 18–24.
2. Bebyakova N.A., Komandresova T.M., Kuritsyn S.N., Khromova A.V., Bespalova Zh. D. *Klinicheskaya fiziologiya krovoobrascheniya*, 2006, no. 3, pp. 45–49.
3. Bebyakova N.A., Mikhaylova S.D., Khromova A.V. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*, 2002, no. 1, pp. 25.
4. Lishmanov Yu. B., Maslov L.N. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*, 2003, no. 1, pp. 2–11.
5. Maslov L.N., Fedorova N.A., Dudko V.A., Karpov R. S. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya*, 2003, no. 4, pp. 80–83.
6. Maslov L.N., Lishmanov Yu. B., Bazarkh E.I. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya*, 2008, no. 2, pp. 21–28.
7. Sepetov N.F., Isakova O.L., Pekelis B.L., Suraeva N.M. *Bulleten VKNTs AMN SSSR*, 1986, no. 2, pp. 86–89.
8. Sudakov K.V. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*, 1989, no. 1, pp. 3–11.
9. Titov M.I., Vinogradov V.A., Bespalova Zh. D. *Bulleten VKNTs AMN SSSR*, 1985, no. 2, pp. 72–76.
10. Unguryanu T.N., Grzhibovskiy A.M. *Ekologiya cheloveka*, 2011, no.5, pp. 55–60.

Рецензенты:

Соколова Л.В., д.б.н., профессор кафедры биологии и экологии человека Института естественных наук и биомедицины САФУ им. М.В. Ломоносова, г. Архангельск;

Щеголева Л.С., д.б.н., доцент, директор Учреждения РАН Института физиологии природных адаптаций УрО РАН, г. Архангельск.

Работа поступила в редакцию 10.11.2011.