

## ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

### ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА АКТГ<sub>4-7</sub>-ПГП НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС И АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТОЧНЫХ ТРАНСАМИНАЗ В УСЛОВИЯХ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА

И. И. Бобынцев, А. А. Крюков, О. М. Шепелева, А. В. Иванов<sup>1</sup>

Исследовано влияние внутрибрюшинного введения крысам-самцам линии Вистар АКТГ<sub>4-7</sub>-ПГП (семакс) в дозах 5, 50, 150 и 450 мкг/кг на процессы свободнорадикального окисления в печени и активность трансаминаз сыворотки крови в условиях острого и хронического иммобилизационного стресса. Установлено, что при хроническом стрессе введение пептида во всем диапазоне доз оказывало антиоксидантное действие в гепатоцитах и достоверно повышало активность сывороточных АЛТ и АСТ в дозе 450 мкг/кг. При остром стрессе, напротив, в дозе 150 мкг/кг семакс оказывал прооксидантные эффекты, а направленность изменения активности АЛТ и АСТ зависела от величины использованной дозы: активность АЛТ снижалась после введения семакса в дозах 5 и 50 мкг/кг, но повышалась при дозе 450 мкг/кг. Активность АСТ была достоверно повышена при дозе 5 мкг/кг.

**Ключевые слова:** иммобилизационный стресс; АКТГ<sub>4-7</sub>-ПГП; семакс; печень; перекисное окисление липидов; сывороточные трансаминазы.

#### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в качестве ноотропного и нейропротекторного средства широко применяется препарат семакс, созданный на основе синтетического аналога фрагмента АКТГ<sub>4-10</sub> [5]. Применение семакса включено в стандарт медицинской помощи больным с инсультом. Состояние таких больных сопровождается значительным ограничением подвижности, что является сильным стрессирующим фактором для организма. Следует отметить, что для пептида известен ряд эффектов в условиях иммобилизационного стресса. Так, семакс оказывал защитное противотромботическое действие за счет повышения антикоагулянтной, суммарной и неферментативной фибринолитической активности, активности активатора плазминогена плазмы крови [3].

Известно, что одним из важных механизмов стрессорного повреждения тканей является увеличение продукции реактивных кислородных радикалов, что сопровождается перекисидацией липидов клеточных мембран [13]. При этом печень обладает высокой чувствительностью к действию различных раздражителей, в том числе и стресса. Важную роль в развитии стресс-индуцированных изменений в печени, наряду с активацией процессов свободнорадикального окисления, играют ишемия, гипоксия и нарушения процессов

микроциркуляции [9, 14]. Известно, что семакс в условиях *in vitro* оказывает выраженное антиоксидантное, антигипоксическое, ангиопротекторное и нейротрофическое действие [4, 8].

На основании вышеизложенного целью данной работы явилось изучение влияния АКТГ<sub>4-7</sub>-ПГП на функциональное состояние печени крыс при остром и хроническом иммобилизационном стрессе.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 120 крысах-самцах линии Вистар массой 250 – 280 г (питомник “Столбовая”, Чехов), разделенных на группы по 10 животных, которые содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище при 12-часовом световом режиме. Все исследования проводились с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным и в соответствии с решением регионального этического комитета.

В работе использовали фрагмент *N*-терминального конца АКТГ Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (АКТГ<sub>4-7</sub>-ПГП), синтезированный в Институте молекулярной генетики РАН. Пептид (лиофилизированный порошок) растворяли в физиологическом растворе и вводили внутрибрюшинно за 15 мин до начала каждого стрессорного воздействия в дозах 5, 50, 150 и 450 мкг/кг. Контрольным животным вводили эквивалентные объемы физиологического раствора из расчета 1 мл на 1 кг массы тела.

<sup>1</sup> Курский государственный медицинский университет, 305041, Курск, ул. К. Маркса 3, e-mail: bobig@mail.ru

Иммобилизационный стресс создавали фиксацией животных в тесных индивидуальных пластиковых боксах. При остром стрессе продолжительность иммобилизации составляла однократно 4 ч, при хроническом — по 2 ч в течение 5 сут. По окончании последнего стрессорного воздействия животных выводили из эксперимента обескровливанием под эфирным наркозом путем забора крови из правого желудочка сердца.

Активность в сыворотке крови аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) определяли на автоматическом биохимическом анализаторе “Vitalit 1000” (Италия) с использованием реактивов “Витал” (Россия).

Для определения концентрации продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активности ферментов антиоксидантной системы в ткани печени навеску части органа гомогенизировали в ледяном физиологическом растворе, центрифугировали в течение 10 мин при скорости 3000 об/мин и образовавшийся супернатант использовали для исследований. Интенсивность процессов ПОЛ оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА), определение которого производили спектрофотометрически с использованием спектрофотометра “Arel 330 PD” (Япония) с помощью наборов “ТБК-Агат” (Россия). Активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и общую антиокислительную активность (ОАА) гомогената печени также определяли спектрофотометрическим методом [1].

Оценку различий между группами в зависимости от характера распределения в выборке проводили при помощи критерия Манна – Уитни и *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из таблицы, острый иммобилизационный стресс оказывал выраженное влияние на процессы ПОЛ в ткани печени и активность сывороточных трансаминаз. При этом активность каталазы в печени увеличивалась на 18 % ( $p < 0,01$ ), СОД — на 17 % ( $p < 0,05$ ), концентрация МДА — на 57 % ( $p < 0,001$ ) на фоне небольшого, но достоверного снижения ОАА (на 6 %,  $p < 0,05$ ). Активность АлТ и АСТ в крови при этом возрастала соответственно на 41 % ( $p < 0,01$ ) и 72 % ( $p < 0,001$ ). Эффекты пептида в отношении процессов ПОЛ в условиях данного вида стресса проявились после его введения в дозе 50 мкг/кг уменьшением активности каталазы (на 11 %,  $p < 0,05$ ) и СОД (на 14 %,  $p < 0,05$ ), а также в дозе 150 мкг/кг в виде снижения ОАА (на 7 %,  $p < 0,01$ ) и повышения содержания МДА (на 15 %,  $p < 0,05$ ). Введение АКТГ-4.7-ПГП в дозах 5 и 50 мкг/кг вызывало коррекцию стресс-индуцированной повышенной активности АлТ соответственно на 23 % ( $p < 0,01$ ) и 26 % ( $p < 0,01$ ). Напротив, в наибольшей использованной дозе 450 мкг/кг пептид повышал активность АлТ на 20 % ( $p < 0,05$ ). Влияние АКТГ-4.7-ПГП на активность АСТ крови было менее выраженным и проявилось только в дозе 5 мкг/кг ее повышением (на 26 %,  $p < 0,05$ ). Актив-

### Эффекты АКТГ-4.7-ПГП при остром и хроническом иммобилизационном стрессе ( $M \pm m$ )

Показатель	Контроль без стресса	Стрессированные животные				
		Контроль стресс	Введение АКТГ-4.7-ПГП в дозе			
			5 мкг/кг	50 мкг/кг	150 мкг/кг	450 мкг/кг
<b>Острый стресс</b>						
Сыворотка крови						
АлТ, Ед/л	42,9 ± 4,3	60,5 ± 3,7 <sup>#</sup>	46,8 ± 2,7*	44,9 ± 3,2*	58,3 ± 4,6	72,3 ± 7,9*
АСТ, Ед/л	115,4 ± 9,2	198 ± 12,6 <sup>#</sup>	249,3 ± 22,6*	203,2 ± 20	199,5 ± 18,2	232,3 ± 22,9
<b>Гомогенат печени</b>						
МДА, мкмоль/мл	2,3 ± 0,1	3,6 ± 0,2 <sup>#</sup>	3,9 ± 0,2	3,9 ± 0,2	4,2 ± 0,1*	3,4 ± 0,3
Каталаза, мкат/мл	3,9 ± 0,1	4,6 ± 0,2 <sup>#</sup>	4,6 ± 0,2	4,1 ± 0,1*	5,0 ± 0,1	4,5 ± 0,3
СОД, усл. ед.	2,8 ± 0,2	3,3 ± 0,2 <sup>#</sup>	3,0 ± 0,1	2,9 ± 0,1*	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,2
ОАА, %	31,2 ± 0,5	29,4 ± 0,5 <sup>#</sup>	28,8 ± 0,5	29,8 ± 0,4	27,5 ± 0,3*	29,6 ± 0,5
<b>Хронический стресс</b>						
Сыворотка крови						
АлТ, Ед/л	42,9 ± 4,3	42,7 ± 3,6	45,6 ± 7,8	49,2 ± 7,6	46,3 ± 2,9	55,0 ± 8,9*
АСТ, Ед/л	115,4 ± 9,2	144,7 ± 6,7 <sup>#</sup>	158,4 ± 11,8	150,2 ± 9,6	140,8 ± 6,8	189,7 ± 16,4*
<b>Гомогенат печени</b>						
МДА, мкмоль/мл	1,5 ± 0,1	2,3 ± 0,1 <sup>#</sup>	1,6 ± 0,1*	1,4 ± 0,1*	2,1 ± 0,1	1,9 ± 0,2*
Каталаза, мкат/мл	4,0 ± 0,2	2,3 ± 0,3 <sup>#</sup>	2,3 ± 0,1	1,9 ± 0,1	3,3 ± 0,2*	3,0 ± 0,2*
СОД, усл. ед.	2,7 ± 0,1	3,1 ± 0,1*	3,3 ± 0,0*	3,1 ± 0,1	3,1 ± 0,1	2,9 ± 0,1
ОАА, %	31,2 ± 0,5	32,4 ± 0,9	35,3 ± 0,8*	36,1 ± 0,5*	32,3 ± 1,0	31,5 ± 0,9

\*  $p < 0,05 - 0,001$  по сравнению с контрольной группой крыс, подвергавшихся стрессу; <sup>#</sup>  $p < 0,05 - 0,001$  по сравнению с контрольной группой крыс, не подвергавшихся стрессу.

ность АСТ имела тенденцию к увеличению и при введении пептида в дозе 450 мкг/кг (на 17 %), однако данные изменения достоверного уровня не достигали.

В условиях хронического стресса в гомогенате печени активность каталазы снижалась (на 43 %,  $p < 0,001$ ), СОД — повышалась (на 14 %,  $p < 0,01$ ) на фоне увеличения содержания МДА (на 50 %,  $p < 0,001$ ) и отсутствия существенных изменений ОАА. При этом активность АСТ в сыворотке увеличивалась на 25 % ( $p < 0,05$ ), тогда как показатели АЛТ оставались на уровне животных группы нестрессированного контроля.

Влияние АКТГ<sub>-4,7</sub>-ПГП на активность сывороточных трансаминаз при хроническом стрессе наблюдалось только при введении его в дозе 450 мкг/кг: активность АЛТ увеличилась на 29 % ( $p < 0,05$ ), АСТ — на 31 % ( $p < 0,05$ ). При этом эффекты пептида на показатели ПОЛ в ткани печени имели антиоксидантную направленность при всех использованных дозах.

Так, активность каталазы в условиях хронического иммобилизационного стресса достоверно повышалась при использовании пептида в дозах 150 и 450 мкг/кг соответственно на 46 % ( $p < 0,01$ ) и 31 % ( $p < 0,05$ ). Напротив, активность СОД повысилась только после введения пептида в наименьшей дозе 5 мкг/кг (на 9 %,  $p < 0,01$ ), тогда как в остальных группах данный показатель фактически не изменялся. Значения ОАА также достоверно увеличивались при более низких дозах 5 и 50 мкг/кг (соответственно на 9 и 12 %,  $p < 0,01$ ). На этом фоне наиболее выраженное снижение уровня МДА происходило после введения АКТГ<sub>-4,7</sub>-ПГП в дозах 5 (на 31 %,  $p < 0,001$ ) и 50 мкг/кг (на 39 %,  $p < 0,001$ ). При дозе 450 мкг/кг эффект пептида имел достоверный характер, однако его выраженность была ниже, чем в меньших дозах, и уменьшение концентрации МДА в сравнении с контрольной группой составило 19 % ( $p < 0,05$ ).

Полученные данные могут объясняться рядом известных эффектов. В частности, пептид в аналогичном диапазоне доз при внутрибрюшинном введении у крыс оказывал анксиолитическое, антидепрессантное и нейропротекторное влияние [6, 7]. Нейропротекторный эффект семакса при ишемическом повреждении мозга у крыс обусловлен его антигипоксическим и нейротрофным действием, в том числе через регуляцию уровня экспрессии нейротрофических факторов за счет связывания с соответствующими рецепторами на клетках нервной системы [2]. Наряду с этим, возможны не только центральные механизмы установленных эффектов пептида, но и периферические. В настоящее время идентифицировано 5 типов меланокортиновых рецепторов (МС1R – МС5R), к которым АКТГ<sub>-4,7</sub> обладает высоким сродством, и установлено их распределение в тканях и клетках [15]. МС5-рецепторы экспрессируются во многих органах, в том числе и в печени [10], поэтому семакс может связываться с

данными рецепторами и оказывать прямое влияние на функциональное состояние гепатоцитов.

Трансмембранная передача сигнала меланокортиновых пептидов с одного и того же рецептора в зависимости от концентрации лиганда осуществляется за счет активации цАМФ или инозитолфосфатной системы [11]. Данный механизм установлен для МС3 рецепторов и может обуславливать различия в направленности эффектов пептидов в зависимости от использованной дозы с учетом степени структурно-функционального сходства различных типов меланокортиновых рецепторов [10].

Полученные нами результаты о влиянии пептида на ПОЛ при хроническом стрессе согласуются с данными литературы об антиоксидантном действии семакса [4, 8]. Однако при остром стрессе введение пептида в дозе 150 мкг/кг вызывало усиление липидной пероксидации в гепатоцитах. Характер изменения активности сывороточных трансаминаз под влиянием пептида также неоднозначен: при остром стрессе активность АЛТ при дозах 5 и 50 мкг/кг снижается, а при наибольшей дозе 450 мкг/кг — повышается. При этом в наименьшей дозе 5 мкг/кг АКТГ<sub>-4,7</sub>-ПГП повышал активность АСТ. В условиях хронического стресса изменение активности АЛТ и АСТ имело однонаправленный характер в виде повышения при дозе 450 мкг/кг — на фоне ослабления ПОЛ в гепатоцитах. Отмеченное усиление характерных стрессогенных эффектов в отношении ПОЛ и активности сывороточных трансаминаз также может быть связано с возможностью взаимодействия пептида с различными типами рецепторов. В частности, активация МС-4-рецепторов в амигдале вызывает стресс-подобные анксиогенные эффекты и активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси [12].

Результаты работы в очередной раз свидетельствуют о полифункциональном характере биологических эффектов регуляторных пептидов и созданных на их основе лекарственных препаратов, в том числе семакса, а также о необходимости их учета при клиническом применении.

## ВЫВОДЫ

1. АКТГ<sub>-4,7</sub>-ПГП в дозах 5, 50, 150 и 450 мкг/кг в условиях хронического иммобилизационного стресса оказывает ингибирующее влияние на процессы ПОЛ в гепатоцитах крыс.
2. При остром иммобилизационном стрессе АКТГ<sub>-4,7</sub>-ПГП в дозе 150 мкг/кг проявляет прооксидантные эффекты.
3. В условиях хронического иммобилизационного стресса АКТГ<sub>-4,7</sub>-ПГП в дозе 450 мкг/кг увеличивает активность АЛТ и АСТ. При остром стрессе направленность влияния пептида на активность сывороточных трансаминаз зависит от использованной дозы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Л. П. Галактионова, А. В. Молчанов, С. А. Ельчанинова, Б. Я. Варшавский, *Клин. лаб. диагностика*, № 6, 10 – 14 (1998).
2. И. А. Гривенников, О. В. Долотов, Ю. И. Гольдина, *Молек. биология*, **33**(1), 120 – 126 (1999).
3. М. Е. Григорьева, Л. А. Ляпина, *Бюл. эксперимент. биол. и мед.*, **149**(1), 49 – 52 (2010).
4. В. И. Гусев, В. И. Скворцова, Н. Ф. Мясоедов, *Журн. неврол. и психиатр.*, № 6, 26 – 34 (1997).
5. С. В. Королева, И. П. Ашмарин, *Биоорганич. химия*, **32**(3), 249 – 257 (2006).
6. Н. Г. Левицкая, Н. Ю. Глазова, Е. А. Себенцова и др., *Нейрохимия*, **25**(1), 111 – 118 (2008).
7. Д. М. Манченко, Н. Ю. Глазова, Н. Г. Левицкая и др., *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, **96**(10), 1014 – 1023 (2010).
8. С. К. Пирутин, И. Б. Туровецкий, А. В. Одгаева, А. А. Каменский, *Вестн. МГУ*, № 3, 51 – 54 (2007).
9. I. M. Arias, J. L. Boyer, F. V. Chisari, N. Fausto, *The Liver: Biology and Pathobiology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001).
10. A. Catania, S. Gatti, G. Colombo, J. M. Lipton, *Pharmacol. Rev.*, **56**(1), 1 – 29 (2004).
11. Y. Konda, I. Gantz, J. DelValle, et al., *J. Biol. Chem.*, № 269, 13162 – 13166, (1994).
12. J. Liu, J. C. Garza, W. Li, X. Y. Lu, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **16**(1), 105 – 120 (2013).
13. E. Sahin, S. Gümüslü, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **34**(5 – 6), 425 – 431 (2007).
14. V. Sánchez-Valle, N. C. Chávez-Tapia, M. Uribe, N. Méndez-Sánchez, *Cur. Med. Chem.*, **19**(28), 4850 – 4860 (2012).
15. J. E. C. Wikberg, R. Muceniece, I. Mandrika, *Pharmacol. Res.*, **42**(5), 393 – 420 (2000).

Поступила 06.03.15

## THE EFFECT OF ACTH-<sub>4,7</sub>-PGP PEPTIDE ON LIPID PEROXIDATION IN LIVER AND ACTIVITY OF SERUM TRANSAMINASES IN RATS UNDER ACUTE AND CHRONIC IMMOBILIZATION STRESS CONDITIONS

I. I. Bobytsev\*, A. A. Kryukov, O. M. Shepeleva, and A. V. Ivanov

Department of Pathophysiology, Kursk State Medical University, Karl Marx ul. 3, Kursk, 305041 Russia;

\* e-mail: bobig@mail.ru

The effect of ACTH-<sub>4,7</sub>-PGP (semax) intraperitoneal injection at doses of 5, 50, 150 and 450 µg/kg b.w. on the free-radical oxidation and the activity of serum transaminases in Wistar male rats subjected to acute and chronic immobilization stress has been studied. It was found that the peptide administration in the entire dose range studied produced antioxidant effect in hepatocytes and significantly increased the activity of serum ALT and AST at a dose of 450 µg/kg under chronic stress conditions. On the contrary, prooxidant effects were observed at a drug dose of 150 mg/kg under acute stress conditions, and the direction of changes in the ALT and AST values activity depended on the semax dose. The ALT activity was decreased at doses of 5 and 50 µg/kg, but increased at a dose of 450 µg/kg. The AST activity was already reliably increased at a dose of 5 µg/kg.

**Keywords:** immobilization stress; ACTH-<sub>4,7</sub>-PGP; semax; liver; lipid peroxidation; serum transaminases.