

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-2-11-15

ВЛИЯНИЕ СЕЛАНКА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС ПРИ ОСТРОМ И ХРОНИЧЕСКОМ ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОМ СТРЕССЕ

И. И. Бобынцев¹, Е. В. Фоменко¹, А. А. Крюков¹, А. В. Иванов¹,
Л. А. Андреева², Н. Ф. Мясоедов²

На крысах-самцах линии Вистар исследовано влияние селанка (Институт молекулярной генетики, Россия) в дозах 100, 300, 1000 мкг/кг внутривенно за 15 мин до моделирования эмоционально-болевого стресса на содержание аминотрансфераз, концентрацию мочевины в сыворотке крови и процессы свободнорадикального окисления в печени. Установлено, что при остром стрессе селанк во всех исследованных дозах снижал концентрацию мочевины плазмы крови до уровня нестрессированных животных в среднем на 27 % ($p \leq 0,01$). При хроническом стрессорном воздействии селанк только в дозе 300 мкг/кг уменьшал активность каталазы и супероксиддисмутазы в среднем на 17 % ($p \leq 0,05$) на фоне снижения концентрации малонового диальдегида на 18 % ($p \leq 0,05$) в гомогенате печени, а также повышал уровень мочевины плазмы крови до уровня нестрессированных животных. При применении селанка в других дозах наблюдались сходные по направленности, но менее выраженные изменения данных показателей, а также снижение содержания аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови при увеличении дозы селанка до 1000 мкг/кг на 16 % ($p \leq 0,05$). Белоксинтетическая функция гепатоцитов при использовании селанка не изменялась. В целом фармакологические эффекты селанка в условиях острого и хронического эмоционально-болевого стресса имеют гепатопротекторный стресс-лимитирующий характер.

Ключевые слова: селанк; эмоционально-болевого стресс; печень; свободнорадикальное окисление; сывороточные аминотрансферазы; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что стресс оказывает значительное повреждающее действие на печень. В частности, эмоционально-болевого стресс вносит вклад в развитие стеатогепатоза и неалкогольной жировой болезни печени [13]. Стрессовые реакции ведут к повышению уровня глюкокортикоидов (ГК) и катехоламинов в крови, что способствует активации купферовских клеток и увеличению продукции фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) в ткани печени [10]. Данный цитокин стимулирует продукцию активных форм кислорода в тканях печени, что сопровождается перекисными окислением липидов клеточных мембран и последующим дисбалансом компонентов антиокислительной системы печени [12].

Необходимо отметить, что стрессовая реакция при болевом воздействии развивается вследствие эмоцио-

нально-негативной реакции на боль, особенно в случае ее неизбежного характера [8]. В связи с этим отдельный интерес приобретают исследования, направленные на изучение возможности коррекции подобных стресс-индуцированных сдвигов в организме с использованием фармакологических препаратов, оказывающих противострессорное действие и не обладающих токсическим эффектом на печень. К числу таких средств относятся препараты на основе регуляторных пептидов, в частности, селанк. Известно, что селанк обладает анксиолитическими и ноотропными свойствами [1, 3], а также оказывает стресс-протекторный эффект на процесс ulcerogenesis в слизистой оболочке желудка у крыс [5].

На основании вышеизложенного целью данной работы явилось изучение влияния селанка на функциональное состояние гепатоцитов крыс при остром и хроническом эмоционально-болевым стрессе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 100 крысах-самцах линии Вистар массой 280 – 300 г (НПП «Питомник ла-

¹ НИИ общей патологии, Курский государственный медицинский университет, Россия, 305041, Курск, ул. К. Маркса, 3; e-mail: bobig@mail.ru

² ФГБУН «Институт молекулярной генетики Российской академии наук», Россия, 123182, Москва, пл. акад. Курчатова, 2.

бораторных животных” Филиала ИБХ РАН, Пущино), разделенных на группы по 10 животных, которых содержали в стандартных условиях вивария на стандартном гранулированном корме и воде в свободном доступе при 12-часовом световом режиме. Все исследования проводили с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным и в соответствии с решением регионального этического комитета.

В работе использовали гептапептид селанк (Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro), синтезированный в ФГБУН Институте молекулярной генетики Российской академии наук (отдел химии физиологически активных веществ, заведующий — академик РАН Н. Ф. Мясоедов). Чистота селанка по данным ВЭЖХ составляла 95,6 %. Селанк растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривенно за 15 мин до начала каждого стрессорного воздействия в дозах 100, 300 и 1000 мкг/кг. Использованные дозы пептида были выбраны на основе данных литературы об анксиолитическом действии у крыс и рекомендаций для клинического применения. Контрольным животным вводили эквивалентные объемы физиологического раствора из расчета 1 мл/кг. Острый эмоционально-болевым стресс создавали электрокожным раздражением лап попарно сгруппированных животных в камере с электрифицированным решетчатым полом. С помощью программируемого электростимулятора на пол камеры в течение 30 мин подавались импульсы тока силой 0,2 – 0,3 мА продолжительностью 5 с с межимпульсным интервалом 15 с. При моделировании хронического стресса аналогичное воздействие осуществляли в течение 5 дней подряд [14]. По окончании стрессорного воздействия животных выводили из эксперимента обескровливанием под эфирным наркозом путем забора крови из правого желудочка сердца.

В качестве маркеров функционального состояния гепатоцитов использовали следующие показатели: содержание аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ), общего белка и мочевины в сыворотке крови определяли на автоматическом биохимическом анализаторе “Vitalit 1000” (Италия) с использованием реактивов “Витал” (Россия). Для определения продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и ферментов антиоксидантной системы печень гомогенизировали в ледяном физиологическом растворе; супернатант, полученный после центрифугирования, использовали для исследований. Интенсивность процессов ПОЛ оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА), определение которого производили с использованием спектрофотометра “Arel 330 PD” (Япония) и наборов реактивов “ТБК-Агат”. Активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы также определяли спектрофотометрическим методом. Общую антиокислительную активность ткани печени (ОАА) определяли методом, осно-

ванным на степени ингибирования аскорбат- и ферроиндуцированного окисления твина-80 до МДА на биохимическом анализаторе “БТС-330” (Испания).

Достоверность полученных результатов определяли с помощью непарного *t*-критерия Стьюдента и критерия Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из таблицы, однократное эмоционально-болевое воздействие не оказывало существенного влияния на исследованные показатели. Так, у стрессированных крыс, в сравнении с интактными нестрессированными животными, в сыворотке крови отмечалось только повышение содержания мочевины (на 20 %, $p < 0,01$). При этом показатели активности процессов ПОЛ и антиоксидантных механизмов, а также значения уровней сывороточных аминотрансфераз и общего белка достоверно не изменялись.

Селанк в дозах 100, 300 и 1000 мкг/кг вызывал достоверное снижение уровня мочевины к сыворотке крови у крыс, соответственно, на 20, 31 и 30,8 % ($p < 0,01$). Также при введении пептида в дозе 300 мкг/кг повышалась активность каталазы (на 18 %, $p < 0,01$), что может указывать на активацию антиоксидантных механизмов. При этом содержание МДА, активность СОД и ОАА, содержание общего белка и трансаминаз в сыворотке не изменялись как после стрессорного воздействия, так и после введения пептида.

Хронический стресс, в сравнении с острым, оказывал на исследуемые показатели более выраженное и, зачастую, противоположное влияние. Так, у стрессированных контрольных животных, по сравнению с интактными, в сыворотке крови отмечалось не повышение, а снижение содержания мочевины на 32 % ($p < 0,01$). Данный факт может являться следствием особенностей развития стрессорной реакции у животных на данной модели стресса. Уровень сывороточных аминотрансфераз и концентрация общего белка при этом существенно не изменялись.

В гомогенате печени наблюдалось увеличение содержания МДА (на 19 %, $p < 0,05$) и активности СОД и каталазы (на 14 % и 12 %, соответственно, $p < 0,05$) на фоне неизменных показателей ОАА. Селанк оказывал наиболее выраженное корригирующее действие на исследуемые показатели в дозе 300 мкг/кг, отмечалось повышение содержания мочевины в сыворотке на 29 % ($p < 0,05$), снижение уровня МДА на 18 % и активности СОД и каталазы (в отличие от острого стресса) на 17 % ($p < 0,05$) в гомогенате печени. При введении селанка в дозе 100 мкг/кг достоверных различий достигало только снижение уровня МДА (на 21 %, $p < 0,05$). Введение селанка в дозе 1000 мкг/кг вызывало уменьшение активности АсАТ в сыворотке крови на 16 % ($p < 0,05$) на фоне снижения активности СОД

и каталазы, соответственно, на 14 и 13 % ($p < 0,01$). При этом снижение уровня МДА в гомогенате печени на 10 % по сравнению со стрессированными животными, не достигло достоверных значений. Содержание мочевины в плазме крови после введения пептида в дозах 100 и 300 мкг/кг повышалось, соответственно, на 13 и 20 %, однако различия не достигли уровня достоверности. Остальные исследованные показатели существенно не изменялись.

При анализе полученных данных прежде всего необходимо отметить особенности использованной модели эмоционально-болевого стресса у крыс. В данном случае стрессорное действие возникало за счет сочетания болевого электрокожного раздражения лап и эмоционально-негативной оборонительной реакции животных, а также состояния тревоги и страха вследствие ожидания неизбежного болевого воздействия. В связи этим можно полагать, что корректирующее действие селанка обуславливалось его влиянием на болевое восприятие и эмоционально-негативные тревожные реакции. Селанк обладает ингибирующим дейст-

вием в отношении энкефалин-деградирующих ферментов плазмы крови [2] и нервной ткани, что может обуславливать анальгетическое действие селанка и его корригирующий эффект на стресс-индуцированные сдвиги исследованных показателей. Также селанк ингибирует карбоскипептидазы и дипептидилкарбоскипептидазы [6], которые способны осуществлять гидролиз не только энкефалинов, но и других регуляторных пептидов, например, субстанции Р и вазоактивного интестинального пептида.

Следует отметить, что изменения исследуемых параметров зависели от продолжительности стрессового воздействия. Острый эмоционально-болевой стресс не оказывал значительного влияния на процессы ПОЛ и состояние антиоксидантной системы печени и процессы цитолиза, что согласуется с данными литературы [9] и может быть объяснено небольшой продолжительностью (30 мин) эмоционально-болевого раздражения. Однако данный уровень воздействия оказался достаточным для повышения уровня мочевины плазмы крови. Как известно, синтез мочевины происходит

Эффекты селанка при остром и хроническом эмоционально-болевым стрессе у крыс ($M \pm m$)

Показатель	Интактные животные	Действие стресса			
		контроль	селанк		
			100 мкг/кг	300 мкг/кг	1000 мкг/кг
Острый стресс					
Сыворотка крови					
АлАТ, Ед/л	41,3 ± 2,8	45,4 ± 3,8	47,2 ± 4,7	43,6 ± 3,5	43,8 ± 5,8
АсАТ, Ед/л	109,5 ± 5,3	113,7 ± 5,3	105,9 ± 4,7	107,3 ± 5,0	105,6 ± 5,0
Общий белок, г/л	72,3 ± 1,9	70,9 ± 1,3	71,9 ± 1,5	70,2 ± 1,2	68,8 ± 1,2
Мочевина, моль/л	5,4 ± 0,3	6,8 ± 0,2**	5,4 ± 0,5*	4,7 ± 0,4*	4,7 ± 0,5*
Гомогенат печени					
МДА, мкмоль/мл	3,4 ± 0,1	3,3 ± 0,2	3,5 ± 0,2	3,5 ± 0,3	3,7 ± 0,2
Каталаза, мккат/л	4,9 ± 0,4	5,9 ± 0,3	6,6 ± 0,5	7,0 ± 0,2*	5,8 ± 0,1
СОД, усл. ед.	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,7 ± 0,1
ОАА, %	26,6 ± 0,6	27,4 ± 0,2	28,1 ± 0,7	28,1 ± 0,7	28,3 ± 0,7
Хронический стресс					
Сыворотка крови					
АлАТ, Ед/л	55,1 ± 6,5	44,2 ± 1,9	39,3 ± 3,9	47,8 ± 4,2	49,9 ± 3,3
АсАТ, Ед/л	120,7 ± 5,2	129,1 ± 5,8	114,1 ± 9,2	117,6 ± 5,9	107,7 ± 6,2*
Общий белок, г/л	65,1 ± 1,9	67,4 ± 1,3	65,8 ± 1,1	65,5 ± 1,7	64,5 ± 1,9
Мочевина, моль/л	5,4 ± 0,2	4,1 ± 0,4**	4,9 ± 0,3	5,3 ± 0,4	4,9 ± 0,3
Гомогенат печени					
МДА, мкмоль/мл	3,8 ± 0,3	4,7 ± 0,3**	3,6 ± 0,3*	3,8 ± 0,2*	4,2 ± 0,2
Каталаза, мккат/л	6,1 ± 0,2	6,9 ± 0,4**	6,2 ± 0,3	5,7 ± 0,4*	5,9 ± 0,3*
СОД, усл. ед.	3,2 ± 0,2	3,7 ± 0,2**	3,4 ± 0,2	3,1 ± 0,2*	3,2 ± 0,1*
ОАА, %	29,1 ± 0,8	28,4 ± 1,0	29,0 ± 1,0	28,7 ± 0,9	29,1 ± 0,8

Примечание.

* $p < 0,05 - 0,001$, по сравнению с контрольной группой крыс, подвергавшихся стрессу;

** $p < 0,05 - 0,001$, по сравнению с интактными животными.

исключительно в перипортальных гепатоцитах в процессе орнитининового цикла из аммиака, образующегося в результате катаболизма белков с целью утилизации продуктов азотистого обмена [7]. Стрессорное болевое воздействие активирует фрагменты гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, что проявляется повышением уровня катехоламинов и ГК в крови, стимуляцией катаболических процессов в тканях организма и усилением притока продуктов азотистого обмена в печень и, следовательно, индукцией синтеза мочевины [15]. Корректирующее действие селанка на уровень мочевины при остром стрессорном воздействии может объясняться его влиянием на содержание тормозных и возбуждающих аминокислот в гипоталамусе [3, 4], усилением связывания медиаторов с ГАМК_A-рецепторами во фронтальной коре головного мозга [1], приводящим к анксиолитическому эффекту. Данный эффект потенциально снижает уровень активации гипоталамо-гипофизарной оси и способствует компенсации стрессовых изменений до значений нестрессированных животных.

Хронический эмоционально-болевой стресс вызывал выраженные изменения показателей антиоксидительной системы печени. В частности, отмечалось повышение активности ферментов антиоксидительной системы (СОД и каталазы) на фоне повышения продуктов ПОЛ (МДА). Сходные изменения наблюдались в целом ряде исследований других авторов и могут быть объяснены влиянием сигнального пути NFκB. В частности, при остром стрессорном воздействии нейроэндокринная стимуляция ведет к активации клеток Купфера в тканях печени, секреции ФНО-α, который способствует активации свободнорадикального окисления, а повышение уровня активных форм кислорода ведет к ядерной транслокации NFκB, что усиливает транскрипцию антиоксидительных ферментов [12] и, следовательно, их активность. Корректирующее действие селанка на данные параметры может объясняться его ингибирующим эффектом на энкефалиндеградирующие ферменты, потенциально снижающим уровень болевого раздражения [2], а также влиянием на содержание тормозных и возбуждающих аминокислот в гипоталамусе [3, 4], приводящим к анксиолитическому и стресспротекторному эффектам. Частичное нивелирование данных эффектов селанка в дозах 100 и 1000 мкг/кг в отношении отдельных исследованных показателей могло быть вызвано его недостаточным анксиолитическим (100 мкг/кг) и избыточным стимулирующим (1000 мкг/кг) действием на нервную систему в данных дозах [4].

Повышенный уровень продукции активных форм кислорода при хроническом окислительном стрессе ведет к снижению отношения НАД/НАДФ, что уменьшает процессы окислительного превращения глутами-

новой кислоты глутаматдегидрогеназой и, следовательно, продукции аммиака и синтеза мочевины [11]. Описанное выше корректирующее влияние селанка на процессы свободнорадикального окисления, наиболее выраженное при применении пептида в дозе 300 мкг/кг, может объяснять увеличение уровня мочевины плазмы при использовании селанка в данной дозе, что свидетельствует об улучшении функционального состояния печени. В целом, влияние селанка на функциональное состояние гепатоцитов в условиях острого и хронического эмоционально-болевого стресса имеет гепатопротекторный стресс-лимитирующий характер.

ВЫВОДЫ

1. Селанк в дозах 100, 300, 1000 мкг/кг при внутрибрюшинном введении крысам за 15 мин перед стрессорным воздействием в условиях хронического эмоционально-болевого стресса (5 дней) снижает интенсивность процессов ПОЛ в тканях печени.

2. В условиях острого эмоционально-болевого стресса селанк в дозах 100, 300, 1000 мкг/кг при однократном внутрибрюшинном введении за 15 мин перед стрессорным воздействием корректирует стресс-индуцированное повышение уровня мочевины в крови у крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. В. Васильева, Е. А. Кондрахин, Р. М. Салимов, Г. И. Ковалёв, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **79**(9), 3 – 11 (2016).
2. Ю. А. Золотарев, О. Ю. Соколов, Н. В. Кост и др., *Биоорг. химия*, **30**(3), 234 – 240 (2004).
3. А. В. Надорова, Л. Г. Колик, П. М. Клодт и др., *Нейрохимия*, № 2, 147 – 153 (2014).
4. В. Б. Наркевич, П. М. Клодт, В. С. Кудрин и др., *Психофармакол. биол. нарк.*, **7**(2), 1563 – 1567 (2007).
5. Т. С. Павлов, Т. Е. Самонина, З. В. Бакаева и др., *Бюл. эксперим. биол. мед.*, **143**(1), 57 – 59 (2007).
6. В. Б. Соловьев, М. Т. Генгин, Т. Н. Соллертинская и др., *Ж. эвол. биохим. и физиол.*, **48**(3), 254 – 257 (2012).
7. Е. Ю. Сорокина, *Медицина неотложных состояний*, № 8, 35 – 45 (2015).
8. Л. К. Хныченко, Н. С. Сапронов, *Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии*, **2**(3), 2 – 15 (2003).
9. Y. Chida, N. Sudo, J. Sonoda, et al., *Hepatology*, **39**(4), 1131 – 1140 (2004).
10. Y. Chida, N. Sudo, C. Kubo, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **21**(1), 202 – 208 (2006).
11. S. Dasarathy, T. Kasumov, J. M. Edmison, et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **279**(3) 567 – 575 (2009).
12. J. Djordjevic, A. Djordjevic, M. Adzic, et al., *Physiol Res.*, **59**(5), 729 – 736 (2010).
13. Y. Z. Liu, J. K. Chen, Y. Zhang, et al., *BMC Gastroenterol*, № 14, 106 (2014).
14. D. B. Matthews, A. L. Morrow, T. O'Buckley, et al., *Alcohol*, **42**(6), 469 – 476 (2008).
15. M. A. Orman, F. Berthiaume, I. P. Androulakis, M. G. Ierapetritou, *J. Theor. Bio.*, **272**(1), 131 – 140 (2011).

INFLUENCE OF SELANK ON THE FUNCTIONAL STATE OF RAT HEPATOCYTES UNDER ACUTE AND CHRONIC EMOTIONAL-PAIN STRESS CONDITIONS

I. I. Bobyntsev¹, E. V. Fomenko¹, A. A. Kryukov¹, A. V. Ivanov¹,
L. A. Andreeva², and N. F. Myasoedov²

¹ Institute of General Pathology, Kursk State Medical University, ul. K. Marksa 3, Kursk, 305041 Russia

² Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, ploshch. Akad. Kurchastova 2, Moscow 123182 Russia

* e-mail: bobig@mail.ru

It was the effects of Selank on liver lipid peroxidation, serum aminotransferase levels, and urea concentration in Wistar male rats subjected to emotional-pain stress. Selank was administrated by intraperitoneal injection in doses 100, 300 and 1000 mg/kg 15 min before stress application. It was discovered that, in acute restraint stress experiment, selank at all doses decreased elevated levels of plasma urea on the average by 27% ($p < 0.01$). In chronic foot-shock experiment, selank administration only at dose 300 mg/kg led to the reduction of catalase and SODs activities on average by 17% ($p < 0.0$), and the MDA level on the average by 18% ($p < 0.05$) in liver tissues along with elevation of depressed plasma urea level to that in of control (unstressed) animals. Selank administration at other doses resulted in similar but less pronounced changes in the parameters studied. At a dose of 1000 mg/kg, the drug decreased the level of serum aspartate aminotransferase by 16% ($p < 0.05$). Selank did not affect protein synthesis level of hepatocytes. In general, Selank showed hepatoprotective stress-limiting pharmacological effects in acute and chronic foot-shock stress.

Keywords: selank; emotional-pain stress; liver; lipid peroxidation; serum aminotransferases; rats.