

Е.Н. Сазонова^{1,2}, О.А. Лебедько^{2,1}, Н.А. Цимбалист¹, О.Г. Пинаева¹

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В РЕАЛИЗАЦИИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЭФФЕКТА НЕОПИАТНОГО АНАЛОГА ЛЕЙ-ЭНКЕФАЛИНА В СЕРДЦЕ НОВОРОЖДЕННЫХ БЕЛЫХ КРЫС

¹Дальневосточный государственный медицинский университет, 680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8-(4212)-76-13-96, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru;

²Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания – НИИ охраны материнства и детства», 680022, ул. Воронежская, 49, кор. 1, e-mail: iomid@yandex.ru, г. Хабаровск

Резюме

Исследовали влияние неопиатного аналога лей-энкефалина (пептид НАЛЭ: Phe–D–Ala–Gly–Phe–Leu–Arg) на процессы свободнорадикального окисления в сердце белых крыс в раннем постнатальном периоде. Пептид НАЛЭ вводили внутривентриально в дозе 100 мкг/кг ежедневно с 2 по 6 сутки жизни. Свободнорадикальное окисление оценивали методом хемилюминесценции в гомогенатах сердца 7-суточных животных. Было выявлено уменьшение генерации активированных кислородных метаболитов, в среднем, на 30 %; повышение активности антиоксидантной системы на 20-27 %, по сравнению с контрольными параметрами. Антиоксидантный эффект пептида НАЛЭ связан с наличием аминокислоты Arg в структуре пептида. Аналог пептида НАЛЭ, лишенный Arg (пептид Phe–D–Ala–Gly–Phe–Leu–Gly), при введении в аналогичном режиме и дозе, оказывал существенно меньшее антиоксидантное действие. Блокатор NO-синтазы метиловый эфир NG-нитро-L-аргинина (L-NAME) в дозе 50 мг/кг, вводимый с пептидом НАЛЭ, снижал выраженность антиоксидантного действия последнего. Результаты проведенного исследования позволяют предполагать, что выраженный антиоксидантный эффект пептида НАЛЭ в тканях сердца белых крыс, по крайней мере частично, обусловлен взаимодействием с системой оксида азота.

Ключевые слова: сердце, свободнорадикальное окисление, биологически активные пептиды.

E.N. Sazonova^{1,2}, O.A. Lebed'ko^{2,1}, N.A. Cimbalist¹, O.G. Pinaeva¹

THE ROLE OF NITRIC OXIDE IN THE ANTIOXIDANT EFFECT OF THE NON-OPIATE ANALOGUE OF LEU-ENKEPHALIN IN THE HEART OF NEWBORN ALBINO RATS

¹Far Eastern State Medical University;

²Khabarovsk Facility of Federal State Budgetary Scientific Institution – Far Eastern Scientific Centre of Respiratory Physiology and Pathology – Scientific research institute of Mother and Child Care, Khabarovsk

Summary

The effect of the non-opiate analog of leu-enkephalin (peptide NALE: Phe – D – Ala – Gly – Phe – Leu – Arg) on the reactive oxygen species generation in the heart of albino rats in the early postnatal period was studied. Peptide NALE was administered intraperitoneally in the dose of 100 μ/kg daily from 2 to 6 days of life. Reactive oxygen species generation was assessed by chemiluminescence in the heart homogenates of 7-day-old animals. Decreasing of reactive oxygen species generation nearly by 30 % and an increasing in antioxidant system activity by the 20-27 %, compared with the control parameters, were found. The antioxidant effect of peptide NALE is associated with the presence of the amino acid Arg in the structure of the peptide. An analogue of NALE peptide, devoid of Arg (peptide Phe – D – Ala – Gly – Phe – Leu – Gly), had a significant lower antioxidant effect. The NO-synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) in the dose 50 mg/kg, administered with NALE peptide, reduced the severity of the NALE antioxidant effect. The results of the study suggest that the pronounced antioxidant effect of NALE peptide in the heart of albino rats, at least in part, is due to the interaction with the nitric oxide system.

Key words: heart, reactive oxygen species generation, biological active peptides.

Гексапептид Phe–D–Ala–Gly–Phe–Leu–Arg является аналогом эндогенного опиоидного пентапептида лей-энкефалина (Tyr–Gly–Gly–Phe–Leu) и синтетического неселективного агониста δ/μ-опиатных рецепторов пептида даларгин (Tyr–D–Ala–Gly–Phe–Leu–Arg). Замена аминокислоты Gly во втором положении аминокислотной цепи лей-энкефалина на аминокислоту D-Ala увеличивает стабильность пептида в организме, обеспечивая устойчивость к действию эндопептидаз [1]. Замена аминокислоты Tyr в первой позиции аминокислотной цепи на аминокислоту Phe исключает возможность взаимодействия пептида с опиатными

рецепторами [7]. Поэтому пептид Phe–D–Ala–Gly–Phe–Leu–Arg получил название неопиатного аналога лей-энкефалина (НАЛЭ). В ранее проведенных исследованиях, нами было показано прямое цитопротективное и антиоксидантное влияние пептида НАЛЭ in vitro [5]. Механизмы антиоксидантного влияния НАЛЭ остаются неясными, учитывая отсутствие аффинности к опиатным рецепторам, с активацией которых связывают антиоксидантный эффект опиоидов [10].

Целью настоящего исследования было проанализировать возможность участия системы оксида азота в реализации антиоксидантного эффекта НАЛЭ.

Материалы и методы

Эксперименты проводили с использованием белых крыс Вистар раннего постнатального возраста (2-7 суток). При постановке опытов руководствовались «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986), а также приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». На исследование было получено разрешение Этического комитета ФГБОУ ВО ДВГМУ Минздрава России.

Формировали следующие экспериментальные группы.

1-я группа – «Контроль»: животные, получавшие с 2 по 6 сутки жизни ежесуточно внутривнутрибрюшинно 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

2-я группа – «НАЛЭ»: животные, получавшие с 2 по 6 сутки жизни ежесуточное внутривнутрибрюшинное введение 100 мкг/кг неопиатного аналога лей-энкефалина (Phe – D-Ala – Gly – Phe – Leu – Arg) (ООО «Алмабион», РФ) в 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

3-я группа – «пептид G»: животные, получавшие с 2 по 6 сутки жизни ежесуточное внутривнутрибрюшинное введение 100 мкг/кг оригинального пептида Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Gly (ООО «Алмабион», РФ) в 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия. Данный пептид получил условное название «пептид G»; он отличается от пептида НАЛЭ заменой в С-концевом положении аминокислотной цепи аминокислоты Arg на аминокислоту Gly.

4-я группа – «НАЛЭ+L-NAME»: животные, получавшие с 2 по 6 сутки жизни ежесуточное внутривнутрибрюшинное введение 100 мкг/кг неопиатного аналога лей-энкефалина (Phe – D-Ala – Gly – Phe – Leu – Arg) (ООО «Алмабион», РФ) и 50 мг/кг неселективного ингибитора активности NO-синтазы L-NAME (метилловый эфир NG-нитро-L-аргинина) (Sigma Aldrich, USA) в 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

Формирование экспериментальных групп осуществляли методом «расщепления выводков», что позволяло стандартизовать животных в группах по генетическим особенностям. В каждой группе было 12-15 особей. Всего в эксперименте использовано 56 белых крыс.

Результаты и обсуждение

Введение пептида НАЛЭ с 2 по 6 сутки жизни не вызывало изменений массы тела, массы сердца и индекса массы органа подопытных животных (табл. 1).

Таблица 1

Гравиметрические показатели 7-суточных белых крыс исследуемых групп

Показатель	Контроль (n=15)	НАЛЭ (n=15)	Пептид G (n=12)	НАЛЭ+L-NAME (n=14)
Масса тела (г)	12,63 ± 0,68	13,59 ± 0,73	14,79 ± 0,59* p=0,03	11,65 ± 0,63
Масса сердца (мг)	92,00 ± 5,33	88,33 ± 4,58	96,11 ± 4,84	83,50 ± 4,83
Индекс массы сердца (% от массы тела)	0,75 ± 0,06	0,66 ± 0,03	0,65 ± 0,03	0,72 ± 0,02

Примечание. * – отличия достоверны по отношению к группе «Контроль».

В 7-суточном возрасте, через 24 часа после заключительного введения исследуемых веществ, животных взвешивали и осуществляли их выведение из эксперимента путем быстрой декапитации. Оценивали массу тела, абсолютную массу сердца и рассчитывали индекс массы органа (доля массы сердца в % по отношению к массе тела). Затем осуществляли гомогенизацию ткани сердца, центрифугирование гомогената и сбор надосадочной жидкости. В надосадочной жидкости методом хемилюминесценции (ХМЛ) оценивали параметры, характеризующие интенсивность процессов свободнорадикального окисления и активность антиоксидантной системы. Регистрацию ХМЛ осуществляли на люминесцентном спектрометре LS 50B «PERKIN ELMER» по методикам, описанным ранее [3]. Сигнал стандартизировали с помощью встроенной программы «Finlab». ХМЛ-исследование свободнорадикального статуса включало определение параметров интенсивности спонтанного и активированного свечения: S_{сп} – светосумма за 1 минуту спонтанной ХМЛ, величина которой прямо коррелирует с интенсивностью процессинга свободных радикалов; H1 – максимум амплитуды быстрой вспышки Fe²⁺-индуцированного свечения, свидетельствующий о содержании гидроперекисей липидов; S_{инд1} – светосумма за 2 минуты Fe²⁺-индуцированной ХМЛ, отражающую скорость образования перекисных радикалов; H2 – максимум амплитуды H₂O₂-индуцированного люминол-зависимого свечения, величина которого обратно коррелирует с перекисной резистентностью субстрата; S_{инд2} – светосумма за 2 минуты H₂O₂-индуцированной люминол-зависимой ХМЛ, величина которой обратно коррелирует с активностью антиоксидантной системы защиты. Интенсивность ХМЛ, измеренную в милливольтгах, рассчитывали на 1 мг ткани и выражали в относительных единицах.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0. Оценивали нормальность распределения выборок и их отличие с использованием t-критерия Стьюдента. Различия между группами считали достоверными при p<0,05.

При ХМЛ-анализе гомогенатов сердца, мы наблюдали выраженный антиоксидантный эффект пептида НАЛЭ в тканях сердца новорожденных животных (табл. 2). Все исследованные ХМЛ-параметры были существенно ниже контрольных показателей: интенсивность процессинга свободных радикалов (S_{сп}) была на 30 % ниже контроля; скорость образования перекисных радикалов (S_{инд1}) – на 30,1 %; содержание гидроперекисей липидов (H1) – на 31,6 %. Регистрировалось снижение показателей S_{инд2} и H2 – на 20,3 % и 27,3 %, соответственно, что свидетельствует о выраженной активации антиоксидантной системы и повышении перекисной резистентности ткани под действием пептида НАЛЭ.

Пептид НАЛЭ содержит аминокислоту Arg в С-концевом положении аминокислотной цепи. Наличие аминокислоты Arg может существенно влиять на

биологическую активность пептида [4]. Для выявления роли аминокислоты Arg в реализации эффектов пептида НАЛЭ, мы проанализировали эффекты пептида G, отличающегося от пептида НАЛЭ заменой аминокислоты Arg на аминокислоту Gly. При ХМЛ-исследовании гомогенатов сердца 7-суточных животных, получавших пептид G с 2 по 6 сутки жизни, было выявлено, что антиоксидантные эффекты пептида G существенно менее выражены, по сравнению с пептидом НАЛЭ: снижение ХМЛ-параметров в группе «пептид G», по отношению к контрольным показателям, составило от 8,2 % до 19,0 % (табл. 2). При этом, показатель скорости образования свободных радикалов (Scp) и общая активность антиоксидантной системы (Синд 2) не имели достоверных отличий от контроля. Таким образом, антиоксидантная активность пептида НАЛЭ, по крайней мере частично, обусловлена присутствием в молекуле аминокислоты Arg.

Таблица 2

Хемилюминесцентные показатели гомогенатов сердца 7-суточных белых крыс исследуемых групп

Показатель	Контроль (n=15)	НАЛЭ (n=15)	Пептид G (n=12)	НАЛЭ+L-NAME (n=14)
S cp	2,968±0,155	2,079±0,115*, *p=0,0004	2,584±0,143#, #p=0,016	2,501±0,149*#, *p=0,047, #p=0,04
Sind 1	7,036±0,369	4,915±0,283*, *p=0,0004	5,962±0,314*#, *p=0,04, #p=0,027	5,978±0,285*#, *p=0,04, #p=0,019
H1	2,775±0,139	1,897±0,133*, *p=0,0004	2,249±0,144*, *p=0,02	2,353±0,156#, #p=0,043
S ind 2	18,41±0,69	14,68±0,44*, *p=0,0004	16,91±0,56#, #p=0,007	16,18±0,47*#, *p=0,018, #p=0,035
H2	13,29±0,62	9,66±0,44*, *p=0,001	11,35±0,57*#, *p=0,037, #p=0,003	11,41±0,71

Примечание. * – отличия достоверны по отношению к группе «Контроль»; # – отличия достоверны по отношению к группе «НАЛЭ».

Известна способность Arg-содержащих пептидов активировать систему оксида азота [2]. Для выявления вовлечения оксида азота в реализацию антиоксидантного эффекта НАЛЭ мы провели ингибиторный анализ: введение пептида НАЛЭ на фоне блокады синтеза оксида азота неселективным ингибитором NO-синтазы L-NAME. Животные, получавшие воздействие пептида НАЛЭ в сочетании с блокадой образования оксида азота (группа «НАЛЭ+L-NAME»), не имели отличий гравиметрических показателей от контроля (табл. 1).

Хемилюминесцентный анализ гомогенатов сердца выявил существенное снижение выраженности антиоксидантного эффекта, по сравнению с группой «НАЛЭ». В группе «НАЛЭ+L-NAME» отклонения исследуемых ХМЛ-параметров от контроля составили 12,1-15,7 %. Только 3 из 5 исследуемых параметров имели достоверные отличия от контроля; показатели, характеризующие содержание в гомогенатах гидроперекиси липидов (H1) и перекисную резистентность субстрата (H2), не имели достоверных отличий от контроля. Таким образом, L-NAME уменьшал, но не устранял полностью антиоксидантный эффект пептида НАЛЭ, что позволяет предположить наличие дополнительно, не связанного с системой оксида азота, механизма антиоксидантного эффекта пептида.

При анализе аминокислотной последовательности пептида НАЛЭ выявляется структурное сходство с началом аминокислотной цепи пептида ноцицептина – эндогенного лиганда OLR-рецепторов. Аффинность к OLR-рецепторам обусловлена фрагментом Phe-X-Gly-Phe [9]. Соответственно, можно предположить, что пептид НАЛЭ, включающий этот фрагмент, способен активировать OLR-рецепторы. Еще большую аффинность к OLR-рецепторам может иметь пептид G, который характеризуется 67 % гомологии с начальным сегментом ноцицептина. По данным литературы, структурные аналоги ноцицептина проявляют антиоксидантный эффект, сходный с действием опиоидов. Сходство эффектов, вероятно, обусловлено близостью внутриклеточных механизмов действия: OLR-рецепторы, как и опиатные рецепторы, сопряжены с ингибированием аденилатциклазы, стимуляцией K⁺ и ингибированием Ca⁺⁺ проницаемости мембраны, активацией митоген-активируемых протеинкиназ [8]. В нашем исследовании, введение пептида G с 2 по 6 сутки жизни приводило к достоверному увеличению массы тела 7-суточных белых крыс (табл. 1). Это соответствует данным литературы о способности пептидов группы ноцицептина увеличивать массу тела экспериментальных животных [6].

Результаты проведенного исследования позволяют предполагать, что выраженный антиоксидантный эффект пептида НАЛЭ в тканях сердца белых крыс обусловлен как способностью активировать систему оксида азота, так и потенциальной аффинностью к OLR-рецепторам.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-015-00020.

Funding: The reported study was funded by RFBR, project number 19-015-00020.

Литература

1. Александрова В.А., Рычкова С.В. Даларгин – фармакологические и клинические аспекты // Педиатрия. – 1993. – № 3. – С. 101-104.
2. Бебякова Н.А., Левицкий С.Н., Шабалина И.А. Влияние структурной модификации молекулы даларгина на вазоактивный эффект пептида при остром стрессе // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 12. – С. 704-707.
3. Лебедько О.А., Рыжавский Б.Я., Задворная О.В. Свободнорадикальный статус неокортекса белых крыс и его модификация экзогенными производными тестостерона // Дальневост. мед. журнал. – 2011. – № 4. – С. 95-99.

4. Закуцкий А.Н., Чалисова Н.И., Субботина Т.Ф. Функциональные аргининсодержащие последовательности в пептидах и белках // Биоорг. химия. – 2008. – № 34 (2). – С. 149-159.

5. Сазонова Е.Н., Лебедько О.А., Денисюк Г.А., Жмеренецкий В.А., Добрых В.А. Цитопротективный эффект неопиатного аналога лей-энкефалина в первичной культуре пульмональных фибробластов в условиях окислительного стресса // Казанский медицинский журнал. – 2019. – № 1. – С. 153-157.

6. Matsushita H., Ishihara A., Mashiko S., et al. Chronic intracerebroventricular infusion of nociceptin/orphanin FQ produces body weight gain by affecting both feeding and energy metabolism in mice // Endocrinology. – 2009. – 150(6). – P. 2668-2673. doi: 10.1210/en.2008-1515.

7. Sasaki Y., Ambo A. 2',6'-dimethylphenylalanine: a useful aromatic amino acid surrogate for tyr or phe resi-

due in opioid peptides // Int. J. Med. Chem. – 2012. doi: 10.1155/2012/498901.

8. Tzvetanova E., Nenkova G, Georgieva A., et al. Effects of structural analogues of nociceptin(1-13)NH₂ on brain antioxidant status in kainic acid-treated rats // Cell Biochem. Funct. – 2011. – № 29 (2). – P. 135-141. doi: 10.1002/cbf.1733.

9. Witkin J.M., Statnick M.A., Rorick-Kehn L.M., et al. The biology of Nociceptin/Orphanin FQ (N/OFQ) related to obesity, stress, anxiety, mood, and drug dependence // Pharmacol. Ther. – 2014. – № 141 (3). – P. 283-299. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.10.011.

10. Zatorski H., Salaga M., Zielińska M., et al. High activity of endogenous opioid system protects against gastric damage development in mouse models of gastric mucosal injury // Pharmacol Rep. – 2019. – № 71 (2). – P. 218-224. doi: 10.1016/j.pharep.2018.10.011.

Literature

1. Aleksandrova V.A., Rychkova S.V. Dalargin – pharmacologic and clinical aspects // Pediatrics. – 1993. – № 3. – P. 101-104.

2. Bebyakova N.A., Levitsky S.N., Shabalina I.A. The influence of the structural modification of dalargin molecule on peptide vasoactive effect in acute stress // Fundamental Research. – 2011. – № 12. – P. 704-707.

3. Lebedko O.A., Ryzhavsky B.Ya., Zadvornaya O.V. Free-radical status of albino rats' neocortex, and its modification by exogenous testosterone derivatives // Far Eastern Medical Journal. – 2011. – № 4. – P. 95-99.

4. Zakutsky A.N., Chalisova N.I., Subbotina T.F. Functional arginine-containing amino-acid sequences in peptides and proteins // Bioorganic Chemistry. – 2008. – Vol. 34, № 2. – P. 149-159.

5. Sazonova E.N., Lebedko O.A., Denisyuk G.A., Zhmerenetsky K.V., Dobrykh V.A. Cytoprotective effect of non-opioid leu-enkephalin analogue in primary culture of pulmonary fibroblasts in oxidative stress // Kazan Medical Journal. – 2019. – № 1. – P. 153-157.

6. Matsushita H., Ishihara A., Mashiko S., et al. Chronic intracerebroventricular infusion of nociceptin/orphanin FQ

produces body weight gain by affecting both feeding and energy metabolism in mice // Endocrinology. – 2009. – № 150 (6). – P. 2668-2673. doi: 10.1210/en.2008-1515.

7. Sasaki Y., Ambo A. 2',6'-dimethylphenylalanine: a useful aromatic amino acid surrogate for tyr or phe residue in opioid peptides // Int. J. Med. Chem. – 2012. doi: 10.1155/2012/498901.

8. Tzvetanova E., Nenkova G, Georgieva A., et al. Effects of structural analogues of nociceptin(1-13)NH₂ on brain antioxidant status in kainic acid-treated rats // Cell Biochem. Funct. – 2011. – № 29 (2). – P. 135-141. doi: 10.1002/cbf.1733.

9. Witkin J.M., Statnick M.A., Rorick-Kehn L.M., et al. The biology of Nociceptin/Orphanin FQ (N/OFQ) related to obesity, stress, anxiety, mood, and drug dependence // Pharmacol. Ther. – 2014. – № 141 (3). – P. 283-299. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.10.011.

10. Zatorski H., Salaga M., Zielińska M., et al. High activity of endogenous opioid system protects against gastric damage development in mouse models of gastric mucosal injury // Pharmacol Rep. – 2019. – № 71 (2). – P. 218-224. doi: 10.1016/j.pharep.2018.10.011.

Координаты для связи с авторами: Сазонова Елена Николаевна – д.м.н., доцент, зав. кафедрой нормальной и патологической физиологии Дальневосточного государственного медицинского университета, тел. 8-(4212)-76-13-96, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru; Лебедько Ольга Антоновна – д.м.н., директор Хабаровского филиала Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания – НИИ охраны материнства и детства, тел. 8-(4212)-70-05-91, e-mail: iomid@yandex.ru; Пинаева Ольга Геннадьевна – к.м.н., старший преподаватель кафедры нормальной и патологической физиологии Дальневосточного государственного медицинского университета, тел. 8-(4212)-76-13-96, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru; Цимбалист Наталья Анатольевна – к.ф.н., с.н.с. Центральной научно-исследовательской лаборатории ДВГМУ, Дальневосточный государственный медицинский университет, тел. 8-(4212)-32-99-64, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru

