

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА GLY-HIS-LYS И ЕГО АНАЛОГОВ НА БОЛЕВУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ У МЫШЕЙ

И. И. Бобынцев, О. И. Чернышёва, М. Е. Долгинцев, М. Ю. Смахтин, А. Е. Белых¹

Пептид Gly-His-Lys при внутривнутрибрюшинном введении самцам мышей BALB/c за 12 мин до начала исследования в дозах 0,5, 1,5, 5, 15 и 50 мкг/кг оказывал анальгетическое действие в тесте “горячая пластина”, которое проявлялось увеличением продолжительности латентного периода реакции облизывания лап. Замена в молекуле трипептида L-лизина на D-лизин сопровождалась значительным ослаблением выявленных анальгетических эффектов. Присоединение D-аланина к N- или к C-концу пептида Gly-His-Lys вызывало нивелирование его анальгетического действия. Более того, после введения данных аналогов подопытным животным наблюдалось увеличение продолжительности латентного периода реакции облизывания лап, достигавшее в ряде случаев достоверных различий, что свидетельствует о проявлении алгических эффектов модифицированных пептидов.

Ключевые слова: регуляторные пептиды; боль; температурное болевое воздействие.

ВВЕДЕНИЕ

Со времени описания L. Pickart первого физиологического эффекта трипептида Gly-His-Lys в виде стимуляции роста гепатоцитов прошло более 30 лет. За прошедший период о данном пептиде сложились представления как о факторе регенерации тканей, способном оказывать активное влияние на процессы заживления ран, восстановления тканей и воспаления кожи [8, 10, 11]. Высокая биологическая активность пептида и его комплексов с медью, хорошая переносимость способствуют их широкому использованию в качестве репаративного и антивозрастного препарата в косметологии [7].

В то же время влияние пептида на процессы регуляции регенерации тканей послужили основанием считать его комплекс с медью перспективным нейропротектором для профилактики развития общих возрастных нейродегенеративных расстройств и восстановления поврежденной ткани головного мозга [12]. Однако нейротропные эффекты пептида исследованы не были. В то же время для многих коротких пептидных молекул такие эффекты известны. В связи с этим целью данного исследования явилось изучение влияния трипептида и его аналогов на температурную болевую чувствительность.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 220 мышах-самцах линии BALB/c массой 22 – 25 г, полученных из питомника РАМН “Столбовая”. Животные содержались в клетках по 10 особей в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище при 12-часовом световом режиме и контролируемой температуре

(22 ± 2 °C). Исследования проводили в промежуток времени с 9 до 14 ч.

В работе использовали пептид Gly-His-Lys и его модифицированные аналоги Gly-His-D-Lys, D-Ala-Gly-His-Lys и Gly-His-Lys-D-Ala, синтезированные в НИИ химии Санкт-Петербургского государственного университета. Пептиды растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривнутрибрюшинно за 12 мин до начала опыта в дозах 0,5, 1,5, 5, 15 и 50 мкг/кг. Контрольным животным вводили эквивалентные объемы физиологического раствора из расчета 1 мл на 1 кг массы тела.

Температурную болевую чувствительность изучали с помощью теста “горячая пластина”. Животных помещали на пластину с ограничительным стеклянным цилиндром, нагретую до температуры 55 °C (прибор LE7406 фирмы PanLab, Испания). Проводили 2 испытания по 1 мин с интервалом в 1 мин. Болевую чувствительность оценивали по величине латентных периодов (в секундах) реакции облизывания лап [4].

Эксперименты проводили в соответствии с Международными соглашениями о гуманном обращении с животными (The European Communities Council Directives of 24 November 1986 – 806/609/EEC) и с решением регионального этического комитета.

Статистическую обработку данных проводили по алгоритмам программы Excel-2007. Результаты представлены в виде $M \pm S$. Е. М. Достоверность результатов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Результаты считали достоверным при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из таблицы, во время 1-й экспозиции отмечалось достоверное увеличение латентного периода реакции облизывания лап после введения Gly-His-Lys в дозах 0,5 мкг/кг (на 34 %, $p < 0,05$), 5 мкг/кг (на 47 %, $p < 0,01$) и 50 мкг/кг (на 31 %, $p < 0,05$). Использо-

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

зование пептида в дозе 1,5 мкг/кг также сопровождалось увеличением данного показателя на 27 %, но достоверно значимых различий в сравнении с контрольной группой оно не достигало. В дозе 15 мкг/кг пептид не оказывал влияния на данную болевую реакцию. Данный характер зависимости влияния пептида от величины дозы позволяет предполагать наличие в данном случае U-эффекта, характерного для регуляторных пептидов.

Во время 2-й экспозиции увеличение латентного периода отмечалось после введения всех доз пептида на 39 – 66 % и имело достоверный характер. При этом наибольший анальгетический эффект пептида проявлялся в наименьшей использованной дозе 0,5 мкг/кг, а с увеличением дозы наблюдалось ослабление эффекта, и наименьшая его выраженность отмечена после введения в дозе 50 мкг/кг.

По результатам исследования анальгетических эффектов Gly-His-Lys представлялось целесообразным изучение на данной модели и эффектов его модификаций с использованием D-лизина и D-аланина. После замены L-лизина на D-лизин в 1-й экспозиции достоверное увеличение латентного периода облизывания лап отмечалось только после введения пептида в дозах 0,5 и 1,5 мкг/кг (соответственно на 28 и 41 %, $p < 0,05$). С увеличением вводимой дозы пептида значения данного показателя существенно не отличались от контрольных. Во 2-й экспозиции наибольшее увеличение латентного периода отмечалось после введения Gly-His-D-Lys в дозах 0,5 (на 34 %, $p < 0,01$), 5 (на 35 %, $p < 0,001$) и 50 мкг/кг (на 32 %, $p < 0,05$). Следует отметить, что в данном случае использование пептида в десятикратно различающихся дозах сопровождалось близким по величине влиянием на время проявления болевой реакции. Введение пептида в остальных

дозах не вызывало существенных изменений латентного периода облизывания лап.

Присоединение D-аланина к N-концу молекулы Gly-His-Lys вызвало значительное изменение его влияния на вызванную болью поведенческую реакцию. Во время 1-й экспозиции после введения пептида в дозах 1,5 и 5 мкг наблюдалось уменьшение продолжительности латентного периода реакции облизывания лап соответственно на 21 и 22 % ($p < 0,05$). Использование пептида в остальных дозах также сопровождалось снижением данного показателя, но имело менее выраженный и недостоверный характер. Следовательно, данная модификация молекулы трипептида вызвала изменение направленности его эффектов с анальгетического на алгический. Во 2-й экспозиции длительность латентного периода имела близкие к контрольным значения, что свидетельствует о нивелировании наблюдавшегося в данной экспозиции анальгетического эффекта у животных всех подопытных групп после введения Gly-His-Lys.

После введения Gly-His-Lys-D-Ala в 1-й экспозиции также наблюдалась тенденция к смене направленности эффекта с анальгетического на алгический. Наибольшее уменьшение продолжительности латентного периода (на 23 %, $p < 0,05$) отмечалось при использовании пептида в дозе 1,5 мкг/кг. В остальных подопытных группах снижение данного показателя составляло 9 – 20 % и не достигало достоверных различий с контрольными значениями. Во время 2-й экспозиции после введения пептида в дозе 50 мкг/кг наблюдалось достоверное уменьшение продолжительности латентного периода. Можно заключить, что после присоединения D-аланина к C-концу молекулы Gly-His-Lys, как и в предыдущей модификации, исследуемые эффекты трипептида значительно нивелирова-

Влияние коротких пептидов в разных дозах при внутрибрюшинном введении на латентный период (с) реакции облизывания лап у мышей в тесте “горячая пластина” ($M \pm m$)

Экспозиция	Группа					
	Контроль	0,5 мкг/кг	1,5 мкг/кг	5 мкг/кг	15 мкг/кг	50 мкг/кг
Gly-His-Lys						
1	17,0 ± 1,4	22,8 ± 2,2*	21,5 ± 3,5	24,9 ± 1,8**	16,0 ± 0,8	22,3 ± 1,8*
2	15,4 ± 1,3	25,6 ± 1,9***	25,4 ± 3,7*	23,7 ± 1,2***	22,9 ± 3,0*	21,5 ± 2,2*
Gly-His-D-Lys						
1	21,5 ± 1,6	27,5 ± 2,0*	30,3 ± 3,6*	23,0 ± 1,5	23,3 ± 1,5	22,1 ± 1,3
2	18,1 ± 1,2	24,2 ± 1,6**	20,4 ± 1,6	24,5 ± 1,2***	19,6 ± 1,5	23,9 ± 2,3*
D-Ala-Gly-His-Lys						
1	21,8 ± 1,5	19,2 ± 1,3	17,2 ± 1,1*	17,0 ± 1,7*	19,9 ± 2,7	20,9 ± 3,3
2	18,1 ± 1,6	18,7 ± 2,1	17,3 ± 1,7	20,1 ± 3,7	15,9 ± 1,3	16,7 ± 2,1
Gly-His-Lys-D-Ala						
1	21,5 ± 1,6	18,6 ± 2,4	16,6 ± 1,2*	19,6 ± 1,2	19,2 ± 1,6	17,3 ± 2,8
2	18,1 ± 1,2	21,5 ± 2,1	18,4 ± 1,4	18,2 ± 2,4	16,7 ± 1,2	14,7 ± 0,9*

* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

лись, а их отдельные проявления имели противоположный характер.

При анализе полученных данных следует основываться на современных представлениях о непрерывной функциональной совокупности (континууме) регуляторных пептидов в организме, позволяющей реализовывать многочисленные спектры их физиологических эффектов [1, 5, 9]. В настоящее время известно, что весь континуум регуляторных пептидов представляет собой хаотический “бульон” упорядоченных трехуровневых компартментов и такая динамическая функциональная иерархия эндогенных регуляторов позволяет формировать пусковые и коррекционные задачи для различных физиологических функций [5]. В связи с этим важно отметить, что трипептид Gly-His-Lys имеет эндогенное происхождение и был выделен из плазмы крови [6]. Наличие у данного пептида как влияния на рост и регенерацию тканей, так и нейротропных эффектов, свидетельствует о его полифункциональности, присущей регуляторным пептидам.

Поэтому при разработке на его основе лекарственных препаратов необходимо учитывать возможные изменения спектра их биологической активности и лечебных свойств [2].

Также необходимо отметить, что поведенческая реакция облилизывания лап при использованном в работе температурном болевом воздействии в тесте “горячая пластина” имеет достаточно сложную организацию с участием супраспинальных структур [4]. Поэтому установленные эффекты пептида могут являться только частью возможного спектра нейротропной активности. Отмеченное изменение болевой чувствительности после введения достаточно малых доз пептида также является характерным для регуляторных пептидов [3]. Модификация природной молекулы могла привести к изменению его рецепции или других механизмов реализации исследованных эффектов, что могло отразиться на их выраженности и направленности.

ВЫВОДЫ

1. Трипептид Gly-His-Lys в дозах 0,5; 1,5; 5; 15 и 50 мкг/кг при однократном внутривнутрибрюшинном введении в тесте “горячая пластина” оказывает анальгетическое действие у мышей, реализуемое с участием супраспинальных структур.

2. Замена в природной молекуле пептида L-лизина на D-изомер способствует снижению выраженности анальгетических эффектов.

3. Присоединение D-аланина к N или C-концу трипептида вызывало инверсию анальгетического эффекта на алгический.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. П. Ашмарин, М. Ф. Обухова, *Вестник РАМН*, № 10, 28 – 34 (1994).
2. И. П. Ашмарин, Е. П. Каразеева, *Успехи физиол. наук*, **34**(1), 14 – 19 (2003).
3. И. П. Ашмарин, Е. П. Каразеева, Т. В. Лелекова, *Журн. микробиол.*, № 3, 109 – 116 (2005).
4. Т. А. Воронина, Л. С. Гузевых, *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Р. У. Хабриев (ред.), Москва (2012), Ч. 1, сс. 197 – 263.
5. С. В. Королева, Н. Ф. Мясоедов, *Успехи физиол. наук.*, **43**(3), 38 – 47 (2012).
6. T. Endo, M. Miyagi, A. Ujiie, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **692**(1), 37 – 42 (1997).
7. A. Gruchlik, M. Jurzak, E. Chodurek, Z. Dzierzewicz, *Acta Pol. Pharm.*, **69**(6), 1303 – 1306 (2012).
8. J. J. Hostynek, F. Dreher, H. I. Maibach, *Inflam. Res.*, **59**(11), 983 – 988 (2010), DOI: 10.1007 / s00011-010-0214-4.
9. S. V. Koroleva, I. P. Ashmarin, *J. Theor. Biol.*, **216**(3), 257 – 271 (2012).
10. L. Pickart, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **19**(8), 969 – 988 (2008), DOI: 10.1163 / 156856208784909435.
11. L. Pickart, F. Pickart, *Society for the Advancement of Wound Care and the Wound Healing Society*, Dallas, Tex, USA (2011), A8 – A62.
12. L. Pickart, J. M. Vasquez-Soltero, A. Margolina, *Oxid. Med. Cel. Longev.*, 2012 (2012), DOI:10.1155 / 2012 / 324832.

Поступила 21.10.14

EFFECT OF GLY-HIS-LYS PEPTIDE AND ITS ANALOGS ON PAIN SENSITIVITY IN MICE

I. I. Bobyntsev*, O. I. Chernysheva, M. E. Dolgintsev, M. Yu. Smakhtin, and A. E. Belykh

Department of Pathophysiology, Kursk State Medical University, ul. Karla Marksa 3, Kursk, 305041 Russia;

* e-mail: bobig@mail.ru

The intraperitoneal administration of Gly-His-Lys tripeptide to male BALB/c mice 12 min before the beginning of the study at doses 0.5, 1.5, 5, 15, and 50 mg/kg produced analgesic effect in the hot-plate test, which was manifested by an increase in the duration of the latent period of the paw-licking reaction. The replacement of L-lysine by D-lysine in the tripeptide molecule was accompanied by significant weakening of the analgesic effect after administration in the same doses. The attachment of D-alanine to N- or C-end of Gly-His-Lys peptide led to leveling of the analgesic effect. On the contrary, after the administration of these analogs, the duration of the latent period of the paw-licking reaction was increased in almost all experimental groups of animals and reached in some cases significant differences that were indicative of the manifestation of algic effects of the modified peptides.

Keywords: regulatory peptides; pain; temperature-induced pain effect.