

Е.Ю. Животова<sup>1</sup>, Н.В. Масленникова<sup>1</sup>, М.Ю. Флейшман<sup>1</sup>,  
О.А. Лебедько<sup>2</sup>, Е.Н. Сазонова<sup>1</sup>, С.С. Тимошин<sup>1</sup>

## СИСТЕМА NOS-NO — УНИВЕРСАЛЬНОЕ ЗВЕНО В РЕАЛИЗАЦИИ ГАСТРОПРОТЕКТИВНЫХ ЭФФЕКТОВ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ

*Дальневосточный государственный медицинский университет<sup>1</sup>,  
680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел.: 8(4212) 32-63-93, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru;  
Хабаровский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания  
СО РАМН - НИИ охраны материнства и детства<sup>2</sup>,  
680022, ул. Воронежская, 49, кор.1, e-mail: iomid@yandex.ru, г. Хабаровск*

Широкое внедрение в клиническую практику эндоскопических методов исследования выявило значительную распространенность эрозивно-язвенных поражений верхних отделов пищеварительного тракта [4]. Этиологические факторы, патогенетические механизмы развития и коррекции эрозивно-язвенных поражений желудка сложны, многообразны и не всегда ясны. Нами было проведено комплексное экспериментальное исследование гастропротективного влияния ряда биологически активных веществ на модели эрозивно-язвенного поражения слизистой оболочки желудка, индуцируемого введением нестероидного противовоспалительного препарата (НПВП) — индометацина.

*Целью исследования* было выявить общие механизмы реализации эффектов гастропротекторов различной природы.

### Материалы и методы

В работе использовали рандомбредных половозрелых мышей-самцов массой 25-35 г. Повреждение слизистой оболочки желудка (СОЖ) моделировали внутрижелудочным введением индометацина в дозе 250 мг/кг («Балканфарма»). В качестве гастропротективных веществ использовали:

1) даларгин — синтетический аналог лей-энкефалина (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) и его безаргининовый аналог [DA La] 2-лей-энкефалин (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu);

2) седатин — синтетический аналог дерморфина (Arg-Tyr-D-Ala-Phe-Gly) и его безаргининовый аналог (Tyr-D-Ala-Phe-Gly).

Пептиды вводили экспериментальным животным в дозе 100 мкг/кг пятикратно ежесуточно внутрибрюшинно.

3) β-казоморфин-7 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) — экзогенный опиоидный пептид, производное казеина молока, вводили экспериментальным животным в дозе 1 мг/кг пятикратно, ежесуточно внутрибрюшинно.

Исследуемые пептиды были получены в лаборатории синтеза пептидов Российского кардиологического центра РАМН. Через 1 ч после последнего введения пептида животным подопытной группы интрагастрально при помощи зонда вводили индометацин и через 48 ч выводили из эксперимента. Для оценки участия в реализации эффекта системы NO-NOS использовали неселективный ингибитор NOS NG-нитро-L-аргинин метилового эфира (L-NAME; «ICN Biomedicals Inc»), который внутрибрюшинно инъецировали животным в дозе  $9,3 \times 10^{-5}$  М за 30 мин до введения пептидов.

Площадь эрозивно-язвенного поражения СОЖ измеряли с помощью компьютерной морфометрии на анализаторе изображения «Мекос-Ц» после видеозахвата под бинокулярной лупой (×6). Анализ пролиферативной активности эпителия желудка осуществляли методом автордиографии, для чего животным за 1 ч до эвтаназии вводили <sup>3</sup>H-тимидин из расчета 1 мкКюри на 1 г массы (уд. активность 84 Кюри/моль). Радиоавтографы готовили по принятой в лаборатории методике, использовали фотоэмульсию «Kodak Autoradiography» (Emulsion NTB Product code 8895666). Индекс меченых ядер (ИМЯ) определяли на основании подсчета 2500 эпителиоцитов СОЖ на продольных полнослойных срезах собственных желез желудка.

Для интегральной оценки процессов свободнорадикального окисления использовали метод хемилюминесценции (ХМЛ). Регистрацию ХМЛ осуществляли на люминесцентном спектрометре LS 50B «PERKIN ELMER». Сигнал стандартизировали с помощью встроенной программы Finlab. Спонтанную и индуцированную Fe<sup>2+</sup> ХМЛ исследовали по методу [3]. Определяли светосумму за 1 мин спонтанной ХМЛ (S<sub>сп.</sub>), максимум быстрой вспышки (h) индуцированной ХМЛ, светосумму (S1 инд.) за 4 мин после «быстрой» вспышки. Кинетику ХМЛ, инициированную H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в присутствии люминола [1, 10], анализировали по двум параметрам: максимуму быстрой вспышки (H) и светосумме (S<sub>2 инд.</sub>) за 4 мин.

Статистическую обработку данных проводили с использованием ППП Statistica 6,0. Всего в экспериментах было использовано 266 животных.

### Результаты и обсуждение

Интрагастральное введение индометацина в дозе 250 мг/кг вызывало выраженное поражение СОЖ. Площадь эрозивно-язвенного поражения СОЖ у подопытных животных достигала  $10,92 \pm 2,05$  мм<sup>2</sup>. В контрольной группе повреждения отсутствовали. Введение индометацина достоверно снижало ИМЯ эпителия СОЖ (рис. 1). Деструктивное изменение СОЖ сопровождалось формированием выраженного оксидативного стресса. Об этом свидетельствуют данные хемилюминесцентного анализа, регистрирующие значительное повышение интенсивности свободнорадикальных процессов в СОЖ (рис. 2). Предварительное (до воздействия индометацина) 5-кратное введение даларгина существенно изменяло реакцию

СОЖ на НПВП. Площадь эрозивно-язвенного поражения СОЖ снизилась до  $1,79 \pm 0,54 \text{ мм}^2$ , что достоверно отличалось от показателя группы «индометацин». Введение даларгина полностью нивелировало угнетающее влияние индометацина на пролиферативную активность эпителия желудка (рис. 1) и значительно ослабило проявления оксидативного стресса в СОЖ (рис. 2). Ранее в клинических условиях нами было показано позитивное влияние даларгина на течение эрозивно-язвенной гастропатии, индуцированной применением НПВП [2].

Безаргининовый аналог даларгина не оказывал влияния ни на площадь эрозивно-язвенного поражения СОЖ ( $6,92 \pm 1,25 \text{ мм}^2$ ), ни на пролиферативную активность эпителия (рис. 1). Имело место некоторое угнетающее влияние этого пептида на показатели тканевого оксидативного стресса. Однако антиоксидантный эффект безаргининового пептида был существенно меньше, по сравнению с даларгином (рис. 2).

Положительное влияние на состояние СОЖ при НПВП-гастропатиях имело место при введении другого опиоидного пептида — седатина. Предварительное 5-кратное введение седатина достоверно уменьшало площадь эрозивно-язвенного поражения СОЖ до  $4,24 \pm 1,12 \text{ мм}^2$ . НПВП-индуцированное угнетение пролиферативной активности эпителия желудка снизилось с 45 до 17,5% (рис. 1). Хемилюминесцентные корреляты оксидативного стресса также были значительно ниже (рис. 2). Безаргининовый аналог седатина, так же, как и безаргининовый аналог даларгина, не корректировал негативных последствий воздействия индометацина на СОЖ экспериментальных животных.

Таким образом, в представленных выше экспериментах аргининсодержащие опиоидные пептиды проявляли защитное действие в модели НПВП-индуцированной гастропатии, а их безаргининовые аналоги были лишены гастропротективной активности. Это дает основание считать, что в реализации гастропротективного действия аргининсодержащих опиоидных пептидов даларгина и седатина ведущая роль принадлежит присутствию в пептидах остатка молекулы Arg — субстрата для NO-синтазы.

$\beta$ -казоморфин-7 не содержит в своей структуре аминокислоты Arg, однако так же обладает значительным гастропротективным действием. Предварительное введение  $\beta$ -казоморфина-7 нивелировало повреждающее влияние

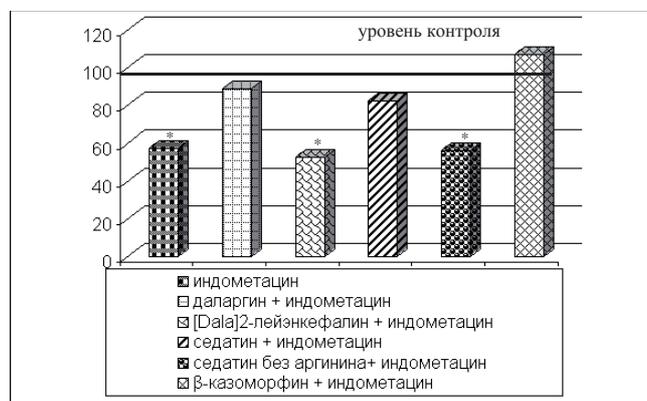


Рис. 1. ДНК-синтетическая активность слизистой оболочки желудка подопытных животных исследуемых групп (% по отношению к контролю — контрольный параметр принят за 100%). \* —  $p < 0,05$  по отношению к группе «индометацин»

Исучали механизмы гастропротекции опиоидными пептидами индометацин-индуцируемых повреждений слизистой оболочки желудка. Опиоидные пептиды: даларгин — синтетический аналог лей-энкефалина (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) и безаргининовый аналог даларгина (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu); седатин — синтетический аналог деморфина (Arg-Tyr-D-Ala-Phe-Gly) и безаргининовый аналог седатина (Tyr-D-Ala-Phe-Gly) вводили экспериментальным животным в дозе 100 мкг/кг пятьюкратно, ежедневно, внутривбрюшинно.  $\beta$ -казоморфин-7 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) — экзогенный опиоидный пептид, вводили экспериментальным животным в дозе 1 мг/кг пятьюкратно, ежедневно, внутривбрюшинно. После воздействия пептидов осуществляли однократное интрагастральное введение индометацина в дозе 250 мг/кг. Метод автордиографии с  $\text{H}^3$ -тимидином применяли для анализа пролиферативной активности эпителия желудка. Уровень процессов свободнорадикального окисления оценивали с помощью метода хемилюминесценции (ХМЛ) по принятой в лаборатории методике. Результаты исследования позволяют рассматривать систему NOS-NO в качестве универсального функционального блока гастропротекции, осуществляемой опиоидными пептидами.

**Ключевые слова:** НПВП-гастропатия, свободнорадикальное окисление, пролиферация, даларгин, седатин,  $\beta$ -казоморфин.

E.Yu. Zhivotova, N.V. Maslennikova, M. Yu. Fleishman, O.A. Lebedko, E.N. Sazonova, S.S. Timoshin

#### NOS-NO SYSTEM AS A UNIVERSAL LINK PROVIDING GASTROPROTECTIVE EFFECTS OF OPIOID PEPTIDES

The Far eastern state medical university;  
Khabarovsk Faculty of State Founding Scientific  
research institute of Mother and Child Care, Khabarovsk

#### Summary

Mechanisms of gastroprotection of NSAID-induced injury of gastric mucosa (GM) by opioid peptides were studied. Opioid peptides: dalargin — a synthetic leu-enkephalin analogue (Tyr-D-Ala-GLY-Phe-Leu-Arg) and non-arginine dalargin analogue (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu); sedatin — a synthetic demorphin analogue (Arg-Tyr-D-Ala-Phe-Gly) and non-arginine sedatin analogue (Tyr-D-Ala-Phe-Gly) were administered to experimental animals, in a dose of 100 mkg/kg five times daily, intraperitoneally.  $\beta$ -kazomorphin-7 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) — exogenous opioid peptide was injected to experimental animals in a dose of 1 mg/kg five times daily, intraperitoneally. Autoradiography method with  $\text{H}^3$ -timidine was used for analyzing proliferative activity of gastric mucosa. The level of free radical oxidation processes was evaluated by chemiluminescence technique used in the laboratory. The role of remainder of arginine molecule present in dalargin, sedatin and Pro-Gly-Pro structure (which is formed in  $\beta$ -kazomorphin metabolism) in activation of NOS-NO system is being discussed. Findings allow us to consider NOS-NO system as universal gastroprotection block created by opioid peptides.

**Key words:** NSAID-gastropathy, oxidative stress, proliferation, dalargin, sedatin,  $\beta$ -kazomorphin.

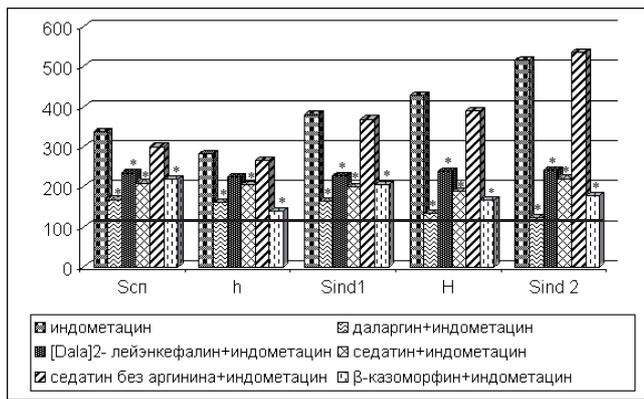


Рис. 2. Хемиллюминесцентные показатели процессов свободнорадикального окисления в гомогенатах желудка животных исследуемых групп (% по отношению к контролю — контрольные параметры приняты за 100%).  
\* —  $p < 0,05$  по отношению к группе «индометацин»

яние индометацина на СОЖ: у животных, получавших индометацин на фоне казоморфина, язвенного поражения СОЖ выявлено не было. В группе животных, получавших индометацин на фоне воздействия  $\beta$ -казоморфина-7, не было выявлено отклонений ДНК-синтетической активности эпителия СОЖ от контрольных показателей (рис. 1). Введение  $\beta$ -казоморфина-7 значительно ослабило проявление оксидативного стресса, индуцированного индометацином (рис. 2). Исследуемые хемиллюминесцентные показатели хотя не достигали уровня контроля, но были достоверно ниже показателей группы «индометацин». Таким образом, предварительное воздействие  $\beta$ -казоморфина-7 практически нивелировало повреждающее влияние индометацина на СОЖ, эффект сопровождался нормализацией пролиферативной активности эпителия СОЖ и значительным ослаблением оксидативного стресса на тканевом уровне. В целом, эффект  $\beta$ -казоморфина-7 на СОЖ был практически аналогичен эффектам аргининсодержащих пептидов даларгина и седатина. Возможным объяснением гастропротективного действия  $\beta$ -казоморфина-7 служат данные литературы о том, что в ходе метаболизма  $\beta$ -казоморфина-7 образуется Pro-Gly-Pro, обладающий способностью стимулировать NOS, увеличивать кровоток в желудке, оказывать гастропротективное влияние [5, 11].

Для доказательства универсальной роли NOS-NO в реализации гастропротективного эффекта исследуемых опиоидных пептидов нами были проведены опыты с блокадой NOS с помощью L-NAME — неселективного ингибитора NO-синтазы. На фоне блокады образования NOS ни один из исследованных пептидов не реализовывал свое корригирующее действие на тканевой гомеостаз СОЖ по показателям ДНК-синтетической активности эпителия.

Таким образом, можно говорить об участии системы NO-NOS в реализации гастропротективных эффектов регуляторных пептидов при НПВП-индуцированных гастропатиях.

Данные [8] свидетельствуют, что гастропротективное действие морфина осуществляется посредством системы NOS-NO. Система NOS-NO не ограничивается протективным действием опиатов. Через него реализует свое действие широкий класс веществ. Гастропротективный

эффект, обусловленный повышением активности eNOS в СОЖ, был описан для пептида грелина [14], орексина-A [7], простагландинов [9], омепразола и других ингибиторов протонной помпы [12, 13].

Согласно представлениям А.М. Уголева [6], различные функции, в том числе специализированные, складываются из элементарных функций, которые реализуются определенным сочетанием ограниченного числа функциональных блоков. Система NOS-NO может служить одной из иллюстраций универсального функционального блока, принимающего участие в регуляции различных физиологических процессов.

#### Л и т е р а т у р а

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: метод. рек. - СПб., 2000. - С. 198.
2. Болоняева Н.А., Животова Е.Ю., Флейшман М.Ю. и др. // Дальневост. мед. журнал. - 2005. - №2. - С. 28-30.
3. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. Свободные радикалы в живых системах // ВИНТИ АН ССР: Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. - М., 1991. - Т. 29. - С. 147.
4. Маев И.В., Орлов Л.Л., Нефедова Ю.В. Эрозивные поражения слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки // Клини. медицина. - 1997. - №6. - С. 57-60.
5. Самонина Г.Е., Копылова Г.Н., Сергеев В.И. и др. Коррекция кровотока желудка как один из возможных механизмов противоязвенных эффектов коротких пролинсодержащих пептидов // Рос. физиол. журнал. - 2001. - Т. 87, №11. - С. 1488-1492.
6. Уголев А.М. Функциональная эволюция и гипотеза функциональных блоков // Журнал эволюц. биохимии и физиологии. - 1983. - № 4. - С. 390-399.
7. Brzozowski T., Konturek P.C., Sliwowski Z. et al. Gastroprotective action of orexin-A against stress-induced gastric damage is mediated by endogenous prostaglandins, sensory afferent neuropeptides and nitric oxide // Digestion. - 2007. - Vol. 75(4). - P. 188-197.
8. Gyires K. The role of endogenous nitric oxide in the gastroprotective action of morphine // Eur. J. Pharmacol. - 1994. - Vol. 255 (1-3). - P. 33-37.
9. Konturek S.J., Brzozowski T., Majka J. et al. Nitric oxide in gastroprotection by sucralfate, mild irritant, and nocolprost. Role of mucosal blood flow // Dig. Dig. Sci. - 1994. - Vol. 39(3). - P. 593-600.
10. Kuzmenko A.I. Characterization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - initiated oxidation of blood serum lipids by kinetic parameters // West. Med. J. - 1999. - Vol. 71, №4. - P. 63-66.
11. Lameu C., Pontieri V., Guerreiro J.R. et al. Brain nitric oxide production by a proline-rich decapeptide from Bothrops jararaca venom improves baroreflex sensitivity of spontaneously hypertensive rats // Hypertens Res. - 2010. - Vol. 33(12). - P. 1283-1288
12. Le Q. L., Zang J., Xu Q.Z., Gao H. Y. Role of nitric oxide in omeprazole protection of the gastric mucosa in rat // Di Yi Jim Yi Da Xue Xue Bao. - 2001. - Vol. 21(12). - P. 926-928.
13. Murakami I., Satoh H., Asano S., Maeda R. Role of capsaicin-sensitive sensory neurons and nitric oxide in the protective effect of lansoprazole, a proton pump inhibitor,

on gastric mucosa in rats // Jpn. J. Pharmacol. - 1996. - Vol. 72(2). - P. 137-147.

14. Sabilia V., Pagani F., Rindi G. et al. Central ghrelin gastroprotection involves nitric oxide/prostaglandin cross-talk // Br J Pharmacol. - 2008. - Vol. 154(3). - P. 688-697.

**Координаты для связи с авторами:** Животова Елена Юрьевна — канд. мед. наук, ст. науч. сотр. ЦНИЛ ДВГМУ, elena-jivotova@yandex.ru; Масленникова Наталья Викторовна — науч. сотрудник ЦНИЛ ДВГМУ, тел.:

8(4212) 32-99-64; Флейшман Марина Юрьевна — канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ЦНИЛ, e-mail: marfl@yandex.ru; Лебедько Ольга Антоновна — доктор мед. наук, вед. науч. сотр. НИИ ОМиД, e-mail: leoaf@mail.ru; Сазонова Елена Николаевна — зав. кафедрой нормальной физиологии ДВГМУ, e-mail: sazen@mail.ru; Тимошин Сергей Сергеевич — зав. ЦНИЛ ДВГМУ, тел.: 8(4212) 32-99-64, e-mail: timoshinss@yandex.ru.



УДК 616 - 053.1 : 612.82 - 599.323.4

Е.Н. Сазонова, А.А. Симанкова, С.Ю. Крыжановская, С.С. Тимошин

## ВЛИЯНИЕ АНТЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ НА НЕКОТОРЫЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГОЛОВНОГО МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС В РАННЕМ ПЕРИОДЕ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

*Дальневосточный государственный медицинский университет<sup>1</sup>,*

*680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел.: 8(4212)32-63-93, e-mail: nauka@mail.ru;*

*НИИ охраны материнства и детства СО РАМН<sup>2</sup>, 680022, ул. Воронежская, 49, кор. 1, e-mail: iomid@yandex.ru;*

*Дорожная клиническая больница ст. Хабаровск-1 ОАО «РЖД»<sup>3</sup>,*

*680022, ул. Воронежская, 49, тел.: 8(4212) 98-03-58, г. Хабаровск*

Аntenатальная гипоксия вызывает существенные изменения функционирования многих систем организма, при этом, в первую очередь, страдает центральная нервная система. До 72% новорожденных, перенесших гипоксию в антенатальном и интранатальном периодах, имеют психоневрологический дефицит различной степени тяжести [4]. Проблему последствий антенатальных гипоксических поражений головного мозга нельзя считать решенной. Особенно актуальным является выявление связей изменений в нервной ткани на клеточном уровне с выраженностью неврологического дефицита и расстройствами высшей нервной деятельности [5, 8]. Этот вопрос и определил цель предлагаемого исследования.

### Материалы и методы

В работе использовали потомство рандомбредных 3-месячных белых крыс-самок, подвергнутых гипоксическому воздействию с 14 по 19 сут гестации. Использование белых крыс в качестве модели антенатальных гипоксических повреждений ЦНС оправдано имеющимися данными о выраженном сходстве между грызунами и высшими млекопитающими по церебральному кровоснабжению и биологии нервных клеток [10]. Беременных крыс-самок помещали в барокамеру СБК-48 натошак и «поднимали» на высоту 9000 м над уровнем моря, что соответствовало давлению 224 мм рт.ст. и парциальному давлению кислорода 42 мм. рт.ст. Ежесуточную 4-часовую экспозицию проводили с 9 до 13 ч в течение 6 дн. По

данным литературы, такая гипоксия может быть расценена как тяжелая [7].

После рождения крысят, в каждом выводке оставляли по 8-10 животных, у которых проводили регистрацию ряда показателей развития. Уравнивание выводков было необходимо для исключения влияния на регистрируемые параметры нутритивного фактора. Осуществляли наблюдение за подопытными животными до достижения ими 17-суточного возраста. В динамике оценивали массу тела животных. В 1- и 7-суточном возрасте определяли массу головного мозга гравиметрическим методом. Исследование пролиферативной активности нейрональных структур осуществляли методом автордиографии с меченым тритием тимидином у 7-суточных животных. Подсчитывали индекс меченых ядер (ИМЯ, %) в неокортексе собственной теменной доли и гиппокампе. Для оценки функционального состояния ЦНС в неонатальном возрасте (с 1 по 7 сут жизни) проводили тест на отрицательный геотропизм и тест на удержание животного на передних лапах в висячем положении на горизонтальной проволоке [3]. Статистическую обработку полученных экспериментальных данных осуществляли по критерию Стьюдента при помощи пакета прикладных программ Statistika 5.0. Всего в эксперименте было использовано 76 животных.

### Результаты и обсуждение

Исследование в динамике массы тела животных, перенесших антенатальную гипоксию, выявило достовер-