

Е.Ю. Животова¹, О.А. Лебедько², С.С. Тимошин¹

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ ЛЕЙ-ЭНКЕФАЛИНА НА ПРОЦЕССЫ СИНТЕЗА ДНК И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА БЕЛЫХ КРЫС

*Дальневосточный государственный медицинский университет¹,**680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел.: 8(4212) 32-63-93, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru;**Хабаровский филиал ДНЦ ФПД СО РАМН - НИИ охраны материнства и детства²,**680022, ул. Воронежская, 49, кор.1, тел.: 8(4212) 98-05-91, e-mail: iomid@yandex.ru, г. Хабаровск*

Конструирование пептидов с определенными физиологическими свойствами на основе эндогенных регуляторных пептидов является одним из основных перспективных направлений современной молекулярной биологии и фармакологии. Иллюстрацией продуктивности такого подхода может служить создание даларгина в лаборатории синтеза пептидов Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ. Пептид является аналогом лей-энкеφαлина (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu). Для повышения устойчивости к действию эндопептидаз осуществлена замена Gly на D-Ala², а присоединение в С-положении отрицательно заряженного остатка Arg должно было предотвратить прохождение пептидом гематоэнцефалического барьера. На момент создания даларгина высокая биологическая активность аргинина, его способность активировать систему NOS-NO не были известны. Первоначально даларгин был зарегистрирован как противоязвенный препарат, однако в клинической практике спектр его применения значительно шире. Об этом свидетельствует более 40 патентов применения даларгина при различных заболеваниях. При этом ряд механизмов действия даларгина недостаточно изучен [2]. Даларгин активно влияет на процессы пролиферации и обладает антиоксидантной активностью. В связи с этим целью настоящего исследования было выяснение зависимости между структурными изменениями аналогов лей-энкеφαлина и их влияния на синтез ДНК и свободнорадикальное окисление в слизистой оболочке желудка.

Методика исследования

Опыты проводили на беспородных белых крысах-самцах (n=94) массой 180-250 г.

В качестве исследуемых веществ использовали

1) лей-энкеφαлин (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) — эндогенный лиганд опиоидных рецепторов;

2) [Dala²] лей-энкеφαлин (Tyr - D-Ala-Gly - Phe - Leu) — стабильный аналог лей-энкеφαлина (за счет присутствия D-Ala²);

3) даларгин (Tyr - D-Ala - Gly - Phe - Leu - Arg) — структурный аналог лей-энкеφαлина.

4) НАЛЭ (Phe — D-Ala - Gly - Phe - Leu - Arg) — структурный аналог лей-энкеφαлина, лишенный сродства к опиоидным рецепторам;

- остаток аминокислоты, подлежащий замене.

Вещества были синтезированы в лаборатории синтеза пептидов (зав. — проф. Ж.Д. Беспалова) Российского кардиологического научно-производственного комп-

лекса МЗ РФ. Все пептиды вводили животным внутривенно в дозе 100 мкг/кг ежедневно в течение 5 сут. Контрольной группе животных пятикратно инъецировали эквивалентное количество изотонического раствора NaCl.

Анализ пролиферативной активности эпителия желудка осуществляли методом авторадииграфии, для чего животным за 1 ч до эвтаназии вводили H³-тимидин из расчета 1 мКи 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 слизистой оболочки желудка (СОЖ) на продольных полнослойных срезах собственных желез желудка. Интенсивность метки (ИМ) рассчитывали как среднее количество треков на 50 ядер эпителиоцитов.

Процессы свободнорадикального окисления (СРО) в гомогенатах желудка исследовали методом хемилюминесценции (ХМЛ), которую регистрировали на люминесцентном спектрометре LS 50B («Perkin Elmer»). Сигнал стандартизировали с помощью встроенной программы Finlab. Спонтанную и Fe²⁺-индуцированную хемилюминесценцию исследовали по методу [3]. Определяли светосумму за 1 мин спонтанной хемилюминесценции (S_{sp}), максимум быстрой вспышки индуцированной хемилюминесценции (h), светосумму за 2 мин после быстрой вспышки (S_{ind-1}). Кинетику хемилюминесценции, инициированную H₂O₂ в присутствии люминола [1], анализировали по параметрам: максимуму свечения (H) и светосумме за 2 мин ХМЛ (S_{ind-2}).

Статистическую обработку данных проводили с помощью ППП Statistica-6,0 с использованием t-критерия Стьюдента (p<0,05).

Результаты и обсуждение

Результаты опытов свидетельствуют, что введение лей-энкеφαлина не вызвало достоверного изменения количества ДНК-синтезирующих ядер и интенсивности метки (табл. 1). Это совпадает с результатами наших предыдущих исследований, в которых лей-энкеφαлин, в отличие от β-эндорфина и даларгина, не оказывал влияния на величину пролиферативного пула и интенсивности метки в эпителии СОЖ [11]. Ранее высказывалось предположение, что неспособность оказывать влияние на процессы пролиферации у лей-энкеφαлина, в отличие от других лигандов опиоидных пептидов, объясняется

его быстрой ферментативной деградацией под влиянием эндопептидаз. Действительно, замена Ala² на D-Ala², повысившая устойчивость пептида к действию эндопептидаз, привела к появлению у этого аналога способности стимулировать синтез ДНК (табл. 1). Индекс меченых ядер СОЖ увеличился в 1,3 раза. Замена в N-концевом положении лей-энкефалина Туг на Phe приводит к утрате способности взаимодействовать с опиоидными рецепторами, а присутствие в С-концевом положении остатка Arg препятствует прохождению пептида через гемато-энцефалический барьер. Пятикратное введение НАЛЭ (Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) не оказывало влияния на процессы синтеза ДНК в эпителии СОЖ белых крыс (табл. 1). Это совпадает с полученными ранее данными о том, что хроническое внутривенное и интраназальное введение этого пептида не влияло на синтез ДНК в эпителии роговицы и языка. Введение этого аналога в физиологических условиях не оказывало влияния на процессы синтеза ДНК в эпителии трахеи новорожденных крыс, а в условиях гипоксии введение пептида приводило к достоверному увеличению показателей синтеза ДНК [6]. Пятикратное введение даларгина (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) вызвало увеличение ИМЯ в 1,3 раза (табл. 1). Это совпадает с данными литературы о способности даларгина стимулировать пролиферативные процессы в различных клеточных популяциях [8].

При проведении ХМЛ-анализа гомогенатов желудка после введения исследуемых аналогов было установлено следующее. Эффект лей-энкефалина (табл. 2) проявлялся снижением содержания гидроперекисей липидов (h) и скорости генерации перекисных радикалов (S_{ind-1}) в 1,3 раза. [Dala²]лей-энкефалин в отношении исследуемых

Таблица 1

Влияние лей-энкефалина и его аналогов на процессы синтеза ДНК в слизистой оболочке желудка белых мышей (M±m)

Группа	ИМЯ, %	ИМ
Контроль	11,01±0,93	31,18±1,08
Лей-энкефалин	9,6±0,57	32,19±0,66
[Dala ²]лей-энкефалин	14,59±0,76*	32,64±0,78
НАЛЭ	12,03±1,07	31,97±1,51
Даларгин	14,23±1,01*	31,68±0,53

Примечание. * — $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Таблица 2

Влияние лей-энкефалина и его аналогов на показатели хемилюминесценции гомогенатов желудка белых крыс (M±m)

Показатель (отн. ед)	Контроль	Лей-энкефалин	[Dala ²]лей-энкефалин	НАЛЭ	Даларгин
Ssp.	1,330 ±0,093	1,215 ±0,098	1,405 ±0,078	0,91 ±0,07*	0,531 ±0,050*
h	2,28 ±0,077	1,80 ±0,093*	2,15 ±0,079	1,62 ±0,07*	1,21 ±0,075*
S_{ind-1}	2,882 ±0,141	2,265 ±0,142*	3,03 ±0,183	2,32 ±0,14*	1,638 ±0,076*
H	2,15 ±0,106	1,99 ±0,138	2,26 ±0,154	1,43 ±0,07*	1,39 ±0,130*
S_{ind-2}	1,09 ±0,099	0,93 ±0,064	1,29 ±0,084	0,82 ±0,03*	0,44 ±0,030*

Примечание. * — $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Резюме

Изучали влияние лей-энкефалина и трех его структурных аналогов на процессы синтеза ДНК (авторадиография с 3H-тимидином) и свободнорадикальный статус (метод хемилюминесценции) в желудке белых крыс. Введение лей-энкефалина (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) не оказывало влияния на процессы синтеза ДНК и вызывало минимальные изменения свободнорадикального статуса, снижая содержание гидроперекисей липидов и скорость генерации перекисных радикалов. Стабильный аналог лей-энкефалина (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu) стимулировал синтез ДНК, но не вызывал статистически значимых изменений показателей хемилюминесценции. (Phe - D-Ala - Gly - Phe - Leu - Arg) — неопиатный аналог лей-энкефалина - не оказывал влияния на синтез ДНК, но существенно усиливал активность антиоксидантной антирадикальной защиты, снижая все исследуемые показатели ХМЛ в 1,3-1,4 раза. Обсуждается зависимость биологической активности исследуемых пептидов от их структуры.

Ключевые слова: пролиферация, свободнорадикальное окисление, лей-энкефалин, даларгин.

E.Yu. Zhivotova, O.A. Lebedko, S.S. Timoshin

EFFECT OF LEU-ENKEPHALIN ANALOGUES ON THE PROCESS OF DNA SYNTHESIS AND FREE RADICAL OXIDATION IN GASTRIC MUCOUS LINING OF ALBINO RATS

Far Eastern state medical university;
Far-Eastern Scientific center of respiration pathology
and physiology SB RAMS - Scientific research institute
of Mother and Child Care, Khabarovsk

Summary

We have studied the effect of leu-enkephalin and its three structural analogues on the process of DNA synthesis (autoradiography with 3H-thimidinom) and free radical status (with chemiluminescence method) in albino rat's stomach. Administration of leu-enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) did not have any impact on the process of DNA synthesis and caused minimal changes of free radical status, diminishing lipids hydroperoxide content and velocity of peroxide radical's generation. Stable analogue of leu-enkephalin (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu) stimulated DNA synthesis but did not cause statistically significant changes of chemiluminescence's indexes. (Phe - D-Ala - Gly - Phe - Leu - Arg) - non-opiate analog of leu-enkephalin did not effect DNA synthesis but significantly increased activity of antioxidant antiradical defense having decreased all the chemiluminescence's indexes under study 1,3-1,4 times. The article also discusses dependence of biological activity of peptides under study on their structure.

Key words: proliferation, free radicals oxidation, leu-enkephalins, dalargin.

показателей ХМЛ эффекта не проявил, однако (как показано в наших предыдущих исследованиях) в условиях оксидативного стресса этот олигопептид также обладал определенной антиоксидантной активностью [5]. Наличие Arg в С-положении у Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg, лишенного сродства к опиоидным рецепторам, сущес-

твенно усилило активность АОРЗ, снизив в 1,3-1,4 раза все исследуемые ХМЛ-показатели (табл. 2). В наших предыдущих исследованиях показано, что в реализации антиоксидантного антирадикального эффекта этого пептида важную роль играет повышение активности ферментативного звена АОРЗ-каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы [6]. Среди исследуемых аналогов лей-энкефалина максимальную активность в отношении биогенеза свободных радикалов проявил даларгин. На фоне активации АОРЗ (S_{ind-2} уменьшился в 2,5 раза), повышения перекисной резистентности (амплитуда H снизилась в 1,5 раза) имело место угнетение генерации активных кислородных метаболитов (АКМ) в целом (S_{sp} снизилась в 2,5 раза), в том числе за счет снижения концентрации гидроперекисей (h) в 1,9 раза и угнетения образования и накопления перекисных радикалов (S_{ind-1}) в 1,8 раза (табл. 2, 3). По данным литературы, антиоксидантная и антирадикальная активность даларгина обусловлена его способностью активировать ферментативное звено антиоксидантной защиты, а также способностью снижать генерацию АКМ и поддерживать уровень низкомолекулярных антиоксидантов [10]. При этом следует иметь в виду, что *in vitro* даларгин активирует пероксидазную систему нейтрофилов [7].

Под влиянием даларгина, благодаря наличию Arg в структуре молекулы, не просто имеет место усиление антиоксидантной и антирадикальной защиты, но и расширение спектра этой активности. Образующийся за счет активации цикла Arg-NOS-NO оксид азота наряду с окислительным механизмом, присущим активным кислородным метаболитам, запускает механизмы нитрирования и нитрозилирования внутриклеточных мишеней [14]. Блокада системы NOS-NO с помощью L-NAME сводит на нет цитопротективный и антиоксидантный эффект даларгина в условиях НПВП-гастропатии [5].

Система Arg-NOS-NO принимает участие в широком круге физиологических процессов, в том числе в регуляции клеточного деления. Характер влияния NO на пролиферацию зависит от его концентрации, а также от редокс-статуса клетки. В схематическом виде это выглядит так: низшие (наномолярные) концентрации NO стимулируют пролиферацию различных типов клеток, а средние (100 нМ) блокируют пролиферацию на фоне оксидативного стресса [13, 15].

Другим важным компонентом защитного действия даларгина является его способность за счет системы Arg-NOS-NO оптимизировать процессы микроциркуляции в очаге повреждения [9].

Важно отметить, что опиоидергический и нитрокси-дергический компоненты взаимно усиливают друг друга. В условиях патологии за счет увеличения в очаге повреждения синтеза рецепторов опиоидных пептидов здесь создается повышенная концентрация опиоидов, а в случае с даларгином, и аргинина, который в ходе метаболизма переходит в свободное состояние, активирует систему NOS-NO, этим самым оптимизирует микроциркуляцию и еще раз увеличивает биодоступность даларгина. Следует особо подчеркнуть, что активация нитрокси-дергического механизма под влиянием даларгина проходит на фоне усиления антиоксидантной защиты. Метаболизм NO в условиях оксидативного стресса приводит к образованию токсичного пероксинитрита [16].

Заключение

При сопоставлении структурных изменений аналогов лей-энкефалина и их физиологической активности были установлены следующие закономерности. Для реализации пролиферативного эффекта аналогов лей-энкефалина необходимо сродство к опиоидным рецепторам. Кроме того, способность активировать клеточное деление имеет место лишь при сочетании сродства к опиоидным рецепторам (наличие Tug в структурной формуле) с повышением устойчивости к эндопептидазам, способствующей увеличению биодоступности олигопептида. Это свойство позволяет олигопептидным лигандам опиоидных рецепторов реализовать митогенный ответ, присущий опиоидам с большим молекулярным весом (β -эндорфин, динарфин и др.). Повышение устойчивости за счет замены Ala^2 на D- Ala^2 , обеспечивающей возможность действия на процессы пролиферации, имеет место у дерморфина и его аналогов [12]. В настоящих исследованиях стимуляция синтеза ДНК имела место у $[Dala^2]$ лей-энкефалина и у $[Dala^2]$ лей-энкефалина-Arg.

Особо следует подчеркнуть, что для нормального течения процессов синтеза ДНК и регенерации необходим оптимальный оксидативный статус. В условиях стресса «принятие решения» — апоптоз или синтез ДНК — во многом зависит от редокс-состояния. Резерв антиоксидантной защиты способствует восстановлению ткани и преобладанию регенераторных процессов. Истощение антиоксидантной защиты приводит к изменению редокс-статуса и апоптозу [4]. Сочетание у даларгина способности стимулировать синтез ДНК с антиоксидантной и антирадикальной активностью, а также наличие нитрокси-дергического компонента обеспечивают ему уникальные способности нормализовать тканевую гомеостаз.

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.: Наука, 2000. - 198 с.
2. Белоусова Е.А., Булгаков С.А. Лекарственные средства — лиганды опиатных рецепторов и их применение в гастроэнтерологии // Фарматека. - 2011. - №2. - С. 26-31.
3. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. Свободные радикалы в живых системах / ВИНТИ АН СССР: Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. - М., 1991. - Т. 29. - 147 с.
4. Дас Д.К., Молик Н. Превращение сигнала гибели в сигнал выживания при редокс-сигналикации // Биохимия. - 2004. - Т. 69, №1. - С. 16-24.
5. Животова Е.Ю., Флейшман М.Ю., Сазонова Е.Н. и др. Гастропротективный эффект даларгина при гастропатии, вызванной приемом нестероидных противовоспалительных средств // Бюл. экпер. биол. и мед. - 2009. - №4. - С. 420-423.
6. Лебедько О.А., Тимошин С.С. Применение неопиатного аналога лей-энкефалина и пептидного морфогена гидры для коррекции нарушений пролиферации в эпителии трахеи и процессов ПОЛ в легких новорожденных крыс, подвергнутых пренатальной гипоксии // Бюл. экпер. биол. и мед. - 1994. - №5. - С. 535-537.

7. Муштакова В.М., Роговин В.В. Клофибрат и даларгин увеличивают люминолзависимую хемилюминесценцию крови мышей // Бюл. exper. биол. и мед. - 2007. - №9. - С. 291-292.

8. Панькова Т.Д., Тимошин С.С. Доказательства реализации стимулирующего эффекта даларгина на процесс клеточного деления через опиатные рецепторы // Бюл. exper. биол. и мед. - 1990. - №7. - С. 96-98.

9. Сиротин Б.З., Жмеренецкий К.В. Микроциркуляция: влияние лекарственных препаратов. - Хабаровск, 2010. - 128 с.

10. Таджибова Л.Т., Астаева М.Д., Исмаилова Ж.Г. и др. Влияние даларгина на свободнорадикальные процессы в крови крыс при умеренной гипотермии // Бюл. exper. биол. и мед. - 2010. - №9. - С. 271-274.

11. Тимошин С.С., Жданова Т.Ф. Изучение сравнительного влияния различных лигандов опиоидных рецепторов на процессы клеточного деления эпителия языка белых крыс // Бюл. exper. биол. и мед. - 1987. - №9. - С. 354-355.

12. Флейшман М.Ю., Животова Е.Ю., Лебедев О.А. и др. Анализ механизмов влияния аргининсодержащего аналога дерморфина на процессы пролиферации в сли-

зистой оболочке желудка белых крыс // Бюл. exper. биол. и мед. - 2007. - №9. - С. 282-285.

13. Bal-Price A., Gartlon J., Brown G.C. Nitric oxide stimulates PC 12 cell proliferation via cGMP and inhibits at higher concentrations mainly via energy depletion // Nitric Oxide. - 2006. - Vol. 14, №3. - P. 238-246.

14. Cataldi A. Cell responses to oxidative stressors // Curr. Pharm. Des. - 2010. - Vol. 16, №12. - P. 1387-1395.

15. Costa A.D., Garlid K.D., West I.C. et al. Protein kinase G transmits the cardio-protective signal from cytosol to mitochondria // Circ. Res. - 2005. - Vol. 19, №4. - P. 329-336.

16. Xia Z., Luo T., Liu H.M. et al. L-arginine enhances nitritative stress and exacerbates tumor necrosis factor-alpha toxicity to human endothelial cells in culture: prevention by propofol // J. Cardiovasc. Pharmacol. - 2010. - Vol. 55, №4. - P. 358-367.

Координаты для связи с авторами: Животова Елена Юрьевна — канд. мед. наук, ст. науч. сотр. ЦНИЛ ДВГМУ, e-mail: elena-jivotova@yandex.ru; Лебедев Ольга Антоновна — доктор мед. наук, вед. науч. сотр. НИИ ОМиД, e-mail: leoaf@mail.ru; Тимошин Сергей Сергеевич — зав. ЦНИЛ ДВГМУ, тел.: 8(4212) 32-99-64, e-mail: timoshinss@yandex.ru.



УДК 616 - 001.21 : 616.017.1

А.В. Любин, А.В. Солпов, К.Г. Шаповалов

АГРЕГАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ И ЛИМФОЦИТАРНО-ТРОМБОЦИТАРНАЯ АДГЕЗИЯ ПРИ ЭЛЕКТРОТРАВМЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Читинская государственная медицинская академия,
672090, ул. Горького, 39а, тел.: 8(3022) 32-00-85, e-mail: macadem@mail.chita.ru, г. Чита

Электрический ток, входя в тело человека, движется в направлении от одного полюса к другому, распространяясь веерообразно, главным образом, по тканям, оказывающим наименьшее сопротивление. Ткани человеческого организма обладают различным сопротивлением к электрическому току (по степени возрастания): нерв - кровеносный сосуд - мышца - кожа - сухожилие - подкожная жировая клетчатка — кость [13, 15]. Иначе говоря, электрический ток, преодолев сопротивление кожи и подкожной жировой клетчатки, проходит через более глуболежащие ткани параллельными пучками вдоль потоков тканевой жидкости, кровеносных и лимфатических сосудов, оболочек нервных стволов [8, 11-13]. Это обуславливает высокую степень уязвимости кровеносных сосудов при электрической травме [9, 12]. Сообразно с этим проявляются нарушения сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, свертывания крови и фибринолиза, веду-

щие к ДВС-синдрому, нарушениям микроциркуляции, эндотелиальной дисфункции.

Особый интерес представляет изучение феномена лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА) (Ю.А. Витковский и соавт., 1999-2005). Этот показатель является интегральным и одновременно отражает изменения в системах гемостаза и иммунитета. Известно, что тромбоциты содержат ряд биологически активных веществ, в том числе цитокины, серотонин, АДФ и прочие [2, 4, 7, 10]. Предыдущими работами, проведенными на кафедре нормальной физиологии, изучены механизмы лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии в условиях нормы и патологии [2-5]. Установлена взаимосвязь между ЛТА и другими параметрами иммунитета. Особую актуальность данное научное направление имеет в области электротравмы, поскольку данная патология всегда протекает с нарушениями в реологии крови и с патологическими