

Е.Ю. Самарина¹, О.А. Лебедько^{1,2}, Е.Н. Сазонова^{1,2}

КОРРЕКЦИЯ ОПИОИДНЫМ ПЕПТИДОМ СЕДАТИН ПОСТГИПОКСИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ТКАНЕВОГО ГОМЕОСТАЗА РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ 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 Федерального государственного бюджетного научного учреждения

«Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» –

Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства,

680022, ул. Воронежская, 49, корп. 1, тел. 8-(4212)-98-05-91, e-mail: iomid@yandex.ru, г. Хабаровск

Резюме

Изучали протективное влияние неселективного μ/δ -агониста опиоидных рецепторов пептида седатин на тканевой гомеостаз различных клеточных популяций белых крыс при воздействии оксидативного стресса. Пятикратное гипоксическое воздействие угнетало синтез ДНК в эпителиях экто- и энтодермального происхождения; вызывало достоверное снижение количества ядрышек в ядрах миосимпластов языка, гладких миоцитов двенадцатиперстной кишки, гепатоцитов; увеличивало количество ядрышек в кардиомиоцитах левого и правого желудочков; хемилюминесцентные показатели сыворотки крови свидетельствовали о достоверной активации свободнорадикального окисления и снижении резервов антиоксидантной защиты. Введение седатина перед каждым гипоксическим воздействием устраняло угнетение синтеза ДНК и уменьшение количества ядрышек в исследуемых клеточных популяциях; показатели ХМЛ-анализа сыворотки крови свидетельствовали о частичной коррекции состояния оксидативного стресса. Таким образом, седатин в условиях оксидативного стресса проявлял выраженный цитопротективный эффект, реализующийся в разных клеточных популяциях.

Ключевые слова: седатин, синтез ДНК, ядрышки, оксидативный стресс.

E.Yu. Samarina¹, O.A. Lebedko^{1,2}, E.N. Sazonova^{1,2}

CORRECTION OF POST HYPOXIA DISORDERS OF TISSUE HOMEOSTASIS OF DIFFERENT CELLS POPULATIONS WITH OPIOID PEPTIDE SEDATIN IN 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 authors studied protective effect of non-selective μ/δ -agonist opioid receptors of peptide sedatin on tissue homeostasis of different cell population in albino rats exposed to oxidative stress. Five-time hypoxic exposure suppresses DNA synthesis in the epithelium of ecto-and-endodermal origin, causes a reliable decrease of the number of nucleoli in the nuclei of myosimplasts of the tongue, smooth myocytes of the duodenum, hepatocytes, increased the amount of nucleoli in cardiomyocytes of the right and left ventricles, chemoluminescent indexes of blood serum confirm a reliable activity of free radicals oxidation and decrease of anti-oxidant defense reserves. Sedatin introduction before every hypoxia exposure eliminates DNA synthesis suppression and diminishing of nucleoli numbers in the studied cells population. Findings of CML analysis of blood serum confirms a partial correction of oxidative stress. Thus, sedatin, under the condition of oxidative stress, demonstrated a marked cytoprotective effect in different cells' populations.

Key words: Sedatin, DNA synthesis, nucleoli, oxidative stress.

Пептид седатин – синтетический аналог опиоидного пептида дерморфина, неселективный μ/δ -агонист опиоидных рецепторов. В настоящее время седатин проходит стадию доклинических исследований, как перспективный фармакологический препарат. Ранее было выявлено влияние седатина на пролиферативные процессы в эпителиальной ткани белых крыс [6], способность седатина повышать выживаемость животных при гипоксической нагрузке [5], а также снижать смертность и уменьшать активность свободнорадикального окисления в тканях сердца новорожденных белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию [2].

Целью настоящего исследования было изучение протективного влияния седатина на тканевой гомеостаз различных клеточных популяций белых крыс при

воздействии оксидативного стресса.

Материалы и методы

При постановке опытов руководствовались Приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003. В экспериментах использовали 3-месячных самцов белых крыс линии Вистар. Формировали 4 экспериментальные группы.

1-я группа – «Контроль» (n=8) – животные были подвергнуты внутрибрюшинному введению изотонического раствора хлорида натрия в объеме 0,1 мл ежедневно в течение 5 суток.

2-я группа – «Седатин» (n=8) – животные были подвергнуты внутрибрюшинному введению пептида седатин (H-Arg-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-OH (научно-про-

изводственное объединение «Пептос», Россия)) в дозе 100 мкг/кг, растворенном в 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия, ежесуточно в течение 5 суток.

3-я группа – «Гипоксия» (n=8) – для моделирования гипоксии животных помещали в барокамеру и «поднимали» на высоту 9 000 метров над уровнем моря, что соответствовало парциальному давлению кислорода 42 мм рт. ст. Гипоксическое воздействие повторяли ежесуточно в течение 5 суток. Ежесуточная гипоксическая экспозиция составляла 4 часа. За 60 минут до гипоксического воздействия животным внутрибрюшинно инъецировали изотонический раствор хлорида натрия в объеме 0,1 мл.

4-я группа – «Седатин+гипоксия» (n=8) – животных подвергали пятикратному гипоксическому воздействию. За 60 мин до гипоксического воздействия животным внутрибрюшинно инъецировали раствор седатина в дозе 100 мкг/кг в объеме 0,1 мл.

Через 24 часа после заключительного воздействия животных выводили из эксперимента.

Исследовали процессы синтеза ДНК в эпителиях языка и двенадцатиперстной кишки методом авторадиографии. Для этого за 1 час до выведения из эксперимента животным вводили ³H-тимидин в дозе 1 мКи на 1 г массы (удельная активность 84 Ки/моль). После стандартной гистологической обработки тканей, полученные срезы помещали на предметные стекла, депарафинировали, покрывали ядерной фотозмульсией (Ilford, Великобритания) и инкубировали в течение двух недель, после чего обрабатывали проявителем и фиксатором. Готовые радиоавтографы окрашивали гематоксилином и эозином. В исследуемых тканях определяли индекс меченых ядер (ИМЯ) путем подсчета 1 000 ядер в зонах пролиферации и выражали в процентах. Интенсивность метки (ИМ) рассчитывали как среднее количество треков на 50 ядер эпителиоцитов.

Ядрышковый аппарат исследовали по методу Ag-NORs [4]. Подсчитывали среднее количество ядрышек в ядрах миосимпластов языка, гладких миоцитов двенадцатиперстной кишки, гепатоцитов, кардиомиоцитов левого и правого желудочков, просматривая в каждой исследуемой ткани по 200 ядер клеток.

Для интегральной оценки процессов свободнорадикального окисления в сыворотке крови животных использовали метод хемилюминесценции (ХМЛ). Регистрацию ХМЛ осуществляли на люминесцентном спектрометре LS 50B «PERKIN ELMER» по методикам, описанным ранее [3]. Определяли: S_{sp} – интенсивность генерации свободных радикалов; h – содержание гидроперекисей липидов; S_{ind-1} – скорость образования и накопления перекисных радикалов; H и S_{ind-2} – показатели, величины которых обратно коррелируют с перекисной резистентностью и активностью антиоксидантной антирадикальной защиты, соответственно.

Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием t-критерия Стьюдента с применением программы Statistica 5.0. Различия между группами считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Пятикратное гипоксическое воздействие угнетало ДНК-синтетические процессы в исследованных эпите-

лиях (табл. 1). В эпителии языка мы зарегистрировали достоверное уменьшение показателя ИМ на 21,4%, что косвенно свидетельствует о снижении скорости синтеза ДНК. В эпителии двенадцатиперстной кишки было выявлено достоверное уменьшение ИМ на 24,1 % и достоверное снижение ИМЯ на 8,1 %. Таким образом, в дуоденальном эпителии мы зарегистрировали постгипоксическое снижение как пролиферативного пула эпителиоцитов, так и скорости синтеза ДНК.

Таблица 1

Показатели синтеза ДНК в эпителиальной ткани белых крыс исследуемых групп

Показатели	Контроль	Гипоксия	Седатин	Седатин + гипоксия
<i>Эпителий языка</i>				
ИМЯ, %	12,41±1,24	11,21±0,73	15,45±0,76*↑	12,57±0,38
ИМ	31,53±1,03	24,79±0,70*↓	30,95±0,89	30,73±0,90
<i>Эпителий двенадцатиперстной кишки</i>				
ИМЯ, %	40,39±0,39	37,10±0,71*↓	40,09±1,04	48,80±0,47*↑
ИМ	45,07±0,92	34,23±0,92*↓	41,81±1,87	54,32±0,89*↑

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к группе «Контроль».

При анализе влияния гипоксического воздействия на клетки стабильных клеточных популяций мы исследовали количество ядрышек в ядрах клеток. Косвенно этот показатель позволяет оценить белок-синтетическую активность ткани [1]. Гипоксическое воздействие приводило к достоверному снижению количества ядрышек в ядрах миосимпластов языка на 9,7 %, в ядрах гладких миоцитов двенадцатиперстной кишки на 18,9 %, в ядрах гепатоцитов на 8,5 % (табл. 2). По данным Young R.M., et al. (2008), снижение белок-синтетической активности тканей при гипоксии физиологически обосновано [10].

Таблица 2

Количество ядрышек в ядрах клеток различных клеточных популяций у белых крыс исследуемых групп

Показатели	Контроль	Гипоксия	Седатин	Седатин+ гипоксия
Миосимпласты языка	2,07±0,05	1,87±0,06*↓	2,12±0,06	2,36±0,06*↑
Миоциты двенадцатиперстной кишки	2,22±0,04	1,80±0,04*↓	2,09±0,05	2,18±0,05
Гепатоциты	1,99±0,04	1,82±0,04*↓	2,29±0,07*↑	2,06±0,09
Кардиомиоциты левого желудочка	2,43±0,10	2,97±0,07*↑	2,36±0,11	2,18±0,03
Кардиомиоциты правого желудочка	2,07±0,06	2,43±0,09*↑	2,11±0,08	1,98±0,07

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к группе «Контроль».

При исследовании ядрышкового аппарата кардиомиоцитов после воздействия гипоксии, мы получили противоположные результаты (табл. 2). Гипоксическое воздействие достоверно увеличивало количество ядрышек в кардиомиоцитах левого желудочка на 22,2 %, в кардиомиоцитах правого желудочка – на 17,4 %. Способность гипоксического воздействия индуцировать гипертрофию кардиомиоцитов описана в литературе [7].

Зарегистрированные изменения структурного гомеостаза развивались на фоне системного оксидаци-

тивного стресса: хемилюминесцентные показатели сыворотки крови свидетельствовали о достоверной активации свободнорадикального окисления и снижении резервов антиоксидантной защиты (табл. 3).

Таблица 3

Хемилюминесцентные показатели сыворотки крови животных исследуемых групп

Показатели	Контроль	Гипоксия	Седатин	Седатин + гипоксия
S _{sp}	0,211±0,019	0,412±0,041*	0,202±0,012	0,327±0,028*
S _{ind-1}	0,475±0,032	1,077±0,057*	0,368±0,018*	0,774±0,012*,**
h	0,187±0,014	0,392±0,028*	0,177±0,011	0,271±0,009*,**
S _{ind-2}	2,237±0,055	5,143±0,218*	2,197±0,052	3,807±0,070*,**
H	1,942±0,049	3,756±0,080*	1,669±0,053*	2,268±0,097*,**

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к группе «Контроль»; ** – $p < 0,05$ по отношению к группе «Гипоксия».

Введение седатина перед каждым гипоксическим воздействием существенно изменяло ответ организма на гипоксию. В клеточных популяциях эпителиоцитов языка, гладких миоцитов двенадцатиперстной кишки, гепатоцитов и кардиомиоцитов имело место полное нивелирование постгипоксических отклонений: показатели синтеза ДНК и количество ядрышек не отличались от соответствующих контрольных параметров (табл. 1, 2).

При анализе ДНК-синтетических процессов в эпителии двенадцатиперстной кишки и ядрышек в мио-симпластах языка мы наблюдали инверсию эффекта: снижение анаболических показателей сменилось на их достоверное возрастание (табл. 1, 2). Интересно отметить, что на интактном фоне седатин не вызывал изменения исследуемых параметров в этих клеточ-

ных популяциях. У животных группы «Седатин» мы наблюдали лишь стимулирующее влияние пептида на процессы поддержания структурного гомеостаза в эпителии языка (повышение ИМЯ на 24,5 %) и гепатоцитах (возрастание среднего количества ядрышек на 15,1 %).

Хемилюминесцентное исследование выявило существенное снижение выраженности системного постгипоксического оксидативного стресса при использовании седатина. ХМЛ-показатели экспериментальной группы «Седатин+гипоксия» оставались достоверно выше контрольного уровня, что свидетельствует о сохранении активации свободнорадикального окисления и снижения антиоксидантной защиты. Однако отклонения параметров были достоверно меньше показателей группы «Гипоксия», что свидетельствует о частичной коррекции состояния оксидативного стресса. Следует отметить, что седатин оказывал антиоксидантный эффект и на интактном фоне: ХМЛ-анализ сыворотки крови выявил достоверное снижение скорости образования перекисных радикалов и увеличение перекисной резистентности.

Таким образом, неселективный μ/δ -агонист опиоидных рецепторов пептид седатин оказывает выраженное цитопротективное влияние в условиях гипоксического воздействия. В литературе описаны кардиопротективные [9] и нейропротективные [8] эффекты опиоидных пептидов. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о реализации цитопротективного эффекта седатина в различных клеточных популяциях, что сопровождается достоверным снижением выраженности оксидативного стресса на организменном уровне.

Литература

1. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
2. Крыжановская С.Ю., Лебедько О.А., Сазонова Е.Н. и др. Влияние синтетических аналогов дерморфина на тканевой гомеостаз миокарда новорожденных белых крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2007. – Т. 144, № 10. – С. 413-416.
3. Лебедько О.А., Рыжавский Б.Я., Задворная О.В. Свободнорадикальный статус неокортекса белых крыс и его модификация производными тестостерона // Дальневосточный медицинский журнал. – 2011. – № 4. – С. 95-99.
4. Мамаев Н. Н., Мамаева С.Е. Структура и функция ЯОР хромосом: молекулярные, цитологические, клинические аспекты // Цитология. – 1992. – № 10. – С. 3-12.
5. Трутаев И.В. Синтетические аналоги природных олигопептидов и их использование в ветеринарной медицине: автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. – Воронеж, 2009. – 25 с.
6. Флейшман М.Ю., Животова Е.Ю., Лебедько О.А. и др. Протективное действие аналога дерморфина се-
- датура на индуцируемое индометацином повреждение слизистой оболочки желудка // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2009. – Т. 147, № 7. – С. 72-75.
7. Chiu C.Z., Wang B.W., Shyu K.G. Angiotensin II and the JNK pathway mediate urotensin II expression in response to hypoxia in rat cardiomyocytes // J Endocrinol. – 2014. – Vol. 220, № 3. – P. 233-246.
8. Gao C.J., Niu L., Ren P.C., et al. Hypoxic preconditioning attenuates global cerebral ischemic injury following asphyxial cardiac arrest through regulation of delta opioid receptor system // Neuroscience. – 2012. – Vol. 202. – P. 352-362.
9. Younès A., Pepe S., Yoshishige D., et al. Ischemic preconditioning increases the bioavailability of cardiac enkephalins // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2005. – Vol. 289, № 4. – P. 1652-1661.
10. Young R.M., Wang S.J., Gordan J.D. Hypoxia-mediated selective mRNA translation by an internal ribosome entry site-independent mechanism // J Biol Chem. – 2008. – Vol. 283, № 24. – P. 16309-16319.

Literature

1. Korzhevskiy D.E., Gilyarov A.V. Basics of histologic technique. – Spb.: SpetsLit, 2010. – P. 95.
2. Krichanovskaya S.Yu., Lebedko O.A., Sazonova E.N. and all. Influence of synthetic analogues of dermorphin on newborn white rat myocardial tissue homeostasis // Bulletin of experimental biology and medicine. – 2007. – Vol. 144, № 10. – P. 413-416.
3. Lebedko O.A., Rizhavsii B.Ya., Zadvornaya O.V. Free-radical status of white rat neocortex and its // Far Eastern medical journal. – 2011. – № 4. – P. 95-99.

4. Mamaev N.N., Mamaeva S.E. Structure and function of chromosomes nuclear organizers: molecular, cytological and clinical aspects // Cytology. – 1992. – № 10. – P. 3-12.
5. Trutaev I.V. Synthetic analogues of natural oligopeptides and their application in veterinary medicine: author's thesis of doctor of biological sciences. – Voronezh, 2009. – P. 25.
6. Fleishman M.Yu., Zhivotova E.Yu., Lebedko O.A., et al. Protective mechanism of sedatin – dermorphin analogue on gastric mucosa damaged by indomethacin // Bulletin of experimental biology and medicine. – 2009. – Vol. 147, № 7. – P. 72-75.
7. Chiu C.Z., Wang B.W., Shyu K.G. Angiotensin II and the JNK pathway mediate urotensin II expression in response to hypoxia in rat cardiomyocytes // J Endocrinol. – 2014. – Vol. 220, № 3. – P. 233-246.
8. Gao C.J., Niu L., Ren P.C., et al. Hypoxic preconditioning attenuates global cerebral ischemic injury following asphyxial cardiac arrest through regulation of delta opioid receptor system // Neuroscience. – 2012. – Vol. 202. – P. 352-362.
9. Younès A., Pepe S., Yoshishige D., et al. Ischemic preconditioning increases the bioavailability of cardiac enkephalins // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2005. – Vol. 289, № 4. – P. 1652-1661.
10. Young R.M., Wang S.J., Gordan J.D. Hypoxia-mediated selective mRNA translation by an internal ribosome entry site-independent mechanism // J Biol Chem. – 2008. – Vol. 283, № 24. – P. 16309-16319.

Координаты для связи с авторами: Самарина Елена Юрьевна – старший преподаватель кафедры нормальной и патологической физиологии ДВГМУ; Лебедько Ольга Антоновна – д-р мед. наук, зав. КДЛ НИИ ОМиД РАМН, e-mail: leoaf@mail.ru; Сазонова Елена Николаевна – д-р мед. наук, вед. науч. сотр. ЦНИЛ ДВГМУ, зав. кафедрой нормальной и патологической физиологии ДВГМУ, тел. +7-924-206-34-63, e-mail: sazen@mail.ru.



УДК 543.872:577.125:612.35:615.27

В.И. Тиханов

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО (СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО) ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ, ВЫЗЫВАЕМОГО НЕОСТИГМИНОМ, НА ФОНЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ЖИВОТНЫМ ГЕКСАМЕТОНИЯ И 3-ЧАСОВОГО ОХЛАЖДЕНИЯ ЖИВОТНЫХ

*Амурская государственная медицинская академия,
675000, ул. Горького, 95, тел.8-(4162)-319-009, e-mail: amurgma@list.ru, г. Благовещенск*

Резюме

Неостигмин на фоне предварительно введённого животным гексаметония влиял на изменение содержания диеновых конъюгатов (ДК), гидроперекисей (ГП) общих липидов (ОЛ) печени, малонового диальдегида (МДА) ткани печени в период 3-часовой холодовой нагрузки.

Результаты свидетельствуют о разнонаправленных эффектах, возникающих в инкубационной среде в присутствии неостигмина, гексаметония при окислении липидов микросом печени *in vitro*, при индуцировании ферментативных (NADP•H-зависимых) и неферментативных (аскорбатзависимых) механизмов окисления липидов.

Сопоставление результатов экспериментов, полученных *in vivo*, *in vitro* приводят к выводу – изменения в содержании продуктов ПОЛ не могут быть объяснены химическими элементами, входящими в структуры фармакологических агентов неостигмин гексаметоний и не могут быть объяснены комбинационной работой введённых фармакологических агентов с холинорецепторным аппаратом плазматической мембраны гепатоцитов.

Ключевые слова: неостигмин гексаметоний, ферментативное (NADP•H-зависимое) окисление липидов, неферментативное (аскорбатзависимое) окисление липидов, диеновые конъюгаты, гидроперекиси, малоновый диальдегид.