



ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ ТКАНЕЙ СВИНЫХ ПОЧЕК НА ПОКАЗАТЕЛИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ И ЭКСПРЕССИЮ ЦОГ-1,2 ПРИ ИНДОМЕТАЦИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГАСТРОПАТИИ

Лоренц С.Э., Жариков А.Ю., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Кореновский Ю.В., Поповцева А.В., Филиппев С.С., Атабаева О.Ш.
ФГБОУ ВО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России (Барнаул, Россия)

INFLUENCE OF THE PEPTIDE COMPLEX FROM PORK KIDNEYS TISSUES ON INDICATORS OF FREE RADICAL OXIDATION AND THE EXPRESSION OF COX-1,2 IN EXPERIMENTAL GASTROPATHY

Lorents S. E., Zharikov A. Yu., Mazko O. N., Makarova O. G., Korenovsky Yu. V., Popovtseva A. V., Filipiev S. S., Atabaeva O. Sh.
Federal public budgetary educational institution of higher education "Altay State Medical University" of the Ministry of Healthcare of Russia (Barnaul, Russia)

Для цитирования: Лоренц С.Э., Жариков А.Ю., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Кореновский Ю.В., Поповцева А.В., Филиппев С.С., Атабаева О.Ш. Влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек на показатели свободнорадикального окисления и экспрессию ЦОГ-1,2 при индометацин-индуцированной гастропатии. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018;154(6): 81–85.

For citation: Lorents S. E., Zharikov A. Yu., Mazko O. N., Makarova O. G., Korenovsky Yu. V., Popovtseva A. V., Filipiev S. S., Atabaeva O. Sh. Influence of the peptide complex from pork kidneys tissues on indicators of free radical oxidation and the expression of COX-1,2 in experimental gastropathy. Experimental and Clinical Gastroenterology. 2018;154(6): 81–85.

Лоренц С.Э. — преподаватель кафедры фармакологии

Жариков А.Ю. — д.б.н., проректор по научной работе и инновациям, заведующий кафедрой фармакологии

Мазко О.Н. — к.б.н., доцент кафедры фармакологии; заведующий лабораторией биомедицины Центра медико-биологических исследований

Макарова О.Н. — к.ф.н., доцент кафедры фармации, старший научный сотрудник лаборатории биомедицины Центра медико-биологических исследований

Кореновский Ю.В. — к.м.н., заведующий кафедрой общей и биологической химии, клинической лабораторной диагностики

Поповцева А.В. — к.м.н., доцент кафедры общей и биологической химии, клинической лабораторной диагностики

Филиппев С.С. — студент 5 курса фармацевтического факультета, лаборант лаборатории биомедицины

Атабаева О.Ш. — к.б.н., доцент кафедры фармакологии

Lorents S. E. — lecturer of the Department of Pharmacology

Zharikov A. Y. — Vice-rector of science, the head of the Department of Pharmacology, Grand-PhD in Biological sciences

Mazko O. N. — PhD in Biological sciences, Associate-professor of the Department of Pharmacology, the head of Biomedicine laboratory

Makarova O. G. — PhD in pharmaceutical sciences, Associate-professor of the Department of Pharmacy, senior scientist of Biomedicine laboratory

Korenovsky Y. V. — PhD in Medical sciences, the head of the Department of Chemistry, Biochemistry, Clinical laboratory Diagnostics

Popovtseva A. V. — PhD in Medical sciences, Associate-professor of the Department Chemistry, Biochemistry, Clinical laboratory Diagnostics

Filipiev S. S. — 5th year student of the Pharmacy Faculty, laboratory assistant of Biomedicine laboratory

Atabaeva O. S. — PhD in Biological sciences, Associate-professor of the Department of Pharmacology

Лоренц Самира Эльшадовна

Lorents Samira E.
pharm_s@mail.ru

Исследования проводились на базе кафедры фармакологии ФГБОУ Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России; лаборатории биомедицины Центра медико-биологических исследований.

Резюме

Цель исследования: изучение влияния пептидного комплекса из тканей свиных почек на уровень экспрессии ЦОГ-1 и ЦОГ-2 и активность процесса свободно-радикального окисления в слизистой оболочке желудка крыс на фоне экспериментальной индометацин-индуцированной язвенной болезни желудка.

Материалы и методы: эксперименты проводили на 67 самцах крыс линии Wistar. Язвенное поражение моделировалось однократным внутрижелудочным введением индометацина в дозе 60 мг/кг в 1 мл физиологического раствора. Пептидный комплекс животным опытной группы вводили внутрижелудочно ежедневно в дозе 75 мг/кг в течение 7 дней до моделирования язвенного поражения. Концентрацию ферментов ЦОГ-1, 2 в плазме крови и гомогенате желудка определяли методом иммуноферментного анализа. Активность процессов свободно-радикального окисления оценивали по интенсивности окраски продуктов соответствующих биохимических реакций.

Результаты: под действием пептидного экстракта концентрация ЦОГ-2 в слизистой желудка была снижена на 26,5% относительно группы сравнения. Концентрация ТБРП была меньше в 2,3 раза по сравнению с контролем заболевания. Повышенная под действием индометацина активность СОД и ГПО снижалась до уровня здоровых крыс.

Заключение: Введение пептидного комплекса из тканей свиных почек сопровождается ослаблением выраженности воспалительного процесса в области язвенного поражения, о чём свидетельствует снижение концентрации ЦОГ-2 в слизистой оболочке желудка, а также ослаблением окислительного повреждения клеток желудка и усилением их ферментной антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: пептидный комплекс; язвенная болезнь желудка; экспериментальная гастропатия; окислительный стресс; антиоксидантное действие; циклооксигеназа

Summary

The aim was to investigate the influence of the peptide complex from pork kidney tissues on indicators of free radical oxidation and the expression of COX-1,2 in experimental Indometacine-induced gastropathy.

Materials and methods: There were examined 67 male Wistar rats. Experimental peptic ulcer disease was reached by the injection into the stomach of 60mg/kg Indometacine. The experimental group had got 75mg/kg for 7 days up to the Indometacine injection. The concentration of enzymes COX-1, 2 in blood plasma and gastric homogenate were determined by the method of enzyme immunoassay. The activity of free radical oxidation processes was evaluated by the coloring intensity of the products of the corresponding biochemical reactions.

Results: In the experimental group the concentration of COX-2 in the gastric mucosa was reduced by 26.5% comparing to the intact group. Thiobarbituric acid-reactive substances concentration was reduced in 2,3 times comparing to the control group. Increased under the effect of indomethacin, the concentrations of superoxide dismutase and glutathione peroxidase were equal the concentrations of healthy rats.

Conclusion: The injection of a peptide complex from pork kidney tissues for 7 days is accompanied by reducing of the inflammatory process in the gastric mucosa, as evidenced by a decrease in the concentration of COX-2 in the stomach homogenate, as well as reducing of oxidative damage to gastric cells and strengthening their enzyme antioxidant protection.

Key words: peptide complex, peptic ulcer disease, experimental gastropathy, oxidative stress, cyclooxygenase, antioxidant activity

Введение

Ранее нами была установлена гастропротекторная активность полученного в нашей лаборатории пептидного комплекса из тканей свиных почек на модели индометациновой язвы у крыс. Профилактическое введение вызывало достоверное снижение числа и глубины эрозий слизистой оболочки желудка (СОЖ), а также повышение её толщины [1].

Естественно, нас заинтересовал вопрос о возможных механизмах выявленного эффекта. Как известно, в основе патогенеза индометацин-индуцированной язвы желудка лежит ингибирование циклооксигеназы (ЦОГ) – ключевого фермента синтеза так называемых гастропротекторных простагландинов

(PgE2 и PgI2) [2,3]. Поэтому представляло интерес изучить возможное влияние пептидного комплекса на уровень экспрессии ЦОГ-1 и ЦОГ-2.

Кроме того, известно, что в процессе язвообразования происходит усиление окислительного повреждения клеток слизистой оболочки желудка за счет активации перекисного окисления липидов [4–6]. Учитывая, что в предыдущих экспериментах нами была выявлена антиоксидантная активность пептидного комплекса на фоне экспериментальной мочекаменной болезни [7], мы предположили, что в механизме гастропротекторного действия пептидного комплекса также может иметь место

снижение выраженности оксидативного повреждения клеток СОЖ.

Таким образом, целью настоящего исследования стало изучение влияния пептидного комплекса

из тканей свиных почек на уровень экспрессии ЦОГ-1 и ЦОГ-2 и активность процесса свободно-радикального окисления в слизистой оболочке желудка крыс.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 67 самцах крыс линии Wistar массой 200–250 г. и возрастом 2–3 месяца. Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Исследования выполняли с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Пептидный комплекс получали из тканей свиных почек методом уксуснокислой экстракции [1].

Исследование ЦОГ-1 и ЦОГ-2 проводили на 37 животных, разделенных на 3 группы: 1) Группа сравнения – 8 интактных крыс; 2) контрольная группа (модель заболевания) – 12 крыс 3), подопытная группа (модель заболевания + профилактическое введение пептидного комплекса) – 17 крыс. Моделирование язвенного повреждения слизистой оболочки желудка производили однократным внутрижелудочным введением индометацина в дозе 60 мг/кг в 1 мл физиологического раствора. За 24 часа до введения животных лишали пищи. Пептидный экстракт животным подопытной группы вводили внутрижелудочно ежедневно в дозе 75 мг/кг в течение 7 дней до моделирования язвенного поражения. Последнее введение осуществлялось за 1 час до введения ulcerогенного агента. Через 4 часа животных подвергали эвтаназии под эфирным наркозом, желудки извлекали, вскрывали по малой кривизне, промывали физиологическим раствором, измельчали, гомогенизировали трёхкратным циклом замораживания-размораживания. Кровь забирали в охлажденные пробирки, обработанные раствором гепарина и центрифугировали.

Содержание ферментов ЦОГ-1 и ЦОГ-2 в плазме крови и гомогенате желудка определяли методом иммуноферментного анализа. Использовали наборы реагентов американского производства. Анализ проводили по методике, предложенной фирмой-изготовителем. Результаты ИФА определяли по интенсивности окраски на фотометре для

микропланшет при длине волны 450 нм. Обработка результатов проводилась с использованием статистического пакета SigmaPlot 11.0 (SYSTATSoftware, США). Множественные межгрупповые парные сравнения проводили с использованием критерия Холма-Сидака.

Исследование антиоксидантной активности пептидного комплекса проводили на 30 крысах, разделенных поровну на группу сравнения, контрольную и подопытную группы. В гомогенате желудка крыс определяли активность процессов свободно-радикального окисления (СРО). Суммарный показатель концентрации всех прооксидантов и свободно-радикальных метаболитов, общую прооксидантную активность (ОПА) оценивали по интенсивности окраски флуоресцентного комплекса, образующегося при взаимодействии продуктов перекисного окисления ТВИН-80 с тиобарбитуровой кислотой. Дополнительно определяли концентрацию в ткани малонового диальдегида (МДА) и других тиобарбитуратреактивных продуктов окисления жирных кислот (ТБРП).

Для оценки антиоксидантного статуса клеток определяли активность антиоксидантных ферментов: каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО). Активность КАТ определяли по подавлению ферментом окисления молибдата натрия перекисью водорода. Активность СОД оценивали по содержанию в пробе нитроформазана, окрашенного продукта восстановления нитротетразолия супероксидными радикалами. Маркером активности ГПО служило определение неокисленного глутатиона по цветной реакции с реактивом Элмана [7].

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием теста Манна-Уитни. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – средняя арифметическая, m – стандартная ошибка средней. В качестве границы статистической значимости различий между независимыми выборками принимали $p < 0,05$. Уровень статистической значимости различий рассчитывали с использованием t -критерия Стьюдента.

Результаты исследования

Результаты определения концентрации ЦОГ-1 и ЦОГ-2 в гомогенате желудка и плазме крови крыс представлены в таблице 1.

Как следует из таблицы 1, содержание ЦОГ-1 в плазме и слизистой желудка и ЦОГ-2 в плазме практически не различались между контрольной и подопытной группами. В то же время были зафиксированы достоверные различия между концентрациями ЦОГ-2 в гомогенате желудка крыс трех групп. Так, под действием индометацина кон-

центрация ЦОГ-2 в слизистой оболочке желудка крыс контрольной группы снизилась на 19% по сравнению с интактными животными. При этом в подопытной группе, где крысы получали пептидный комплекс из тканей свиных почек, концентрации ЦОГ-2 была на 26,5% меньше, чем в интактной группе. Различия между тремя группами были достоверны (группа сравнения против подопытной – $p < 0,001$; контрольная против подопытной – $p = 0,001$; группа сравнения против контрольной – $p = 0,016$).

Таблица 1.

Концентрации ЦОГ-1 и ЦОГ-2 в плазме крови и гомогенате желудка крыс

Примечание:

знаком * обозначены достоверные изменения относительно интактных крыс; подчеркнуты достоверные изменения относительно контрольной группы

Аббревиатуры:

ЦОГ – циклооксигеназа

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием теста Манна-Уитни. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – средняя арифметическая, m – стандартная ошибка средней. В качестве границы статистической значимости различий между независимыми выборками принимали $p < 0,05$. Множественные межгрупповые парные сравнения проводили с использованием критерия Холма-Сidak.

Группа \ Показатель	ЦОГ-1 в плазме крови, нг/мл	ЦОГ-1 в гомогенате желудка, нг/мл	ЦОГ-2 в плазме крови, нг/мл	ЦОГ-2 в гомогенате желудка, нг/мл
Сравнения (n=8)	не определялось	не определялось	не определялось	3,07±0,17
Контрольная (n=12)	1,01±0,114	5,44±0,264	1,01±0,14	2,49±0,12*
Подопытная (n=17)	0,95±0,11	5,57±0,266	0,95±0,11	1,83±0,13*

Таблица 2.

Биохимические показатели активности процессов СРО в гомогенате желудка крыс

Примечание:

знаком * обозначены достоверные изменения относительно интактных крыс; подчеркнуты достоверные изменения относительно контрольной группы

Аббревиатуры:

ОПА – общая прооксидантная активность; ТБРП – тиобарбитурат-реактивные продукты; ОАА – общая антиоксидантная активность; СОД – супероксиддисмутаза; ГПО – глутатионпероксидаза; КАТ – каталаза.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием теста Манна-Уитни. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – средняя арифметическая, m – стандартная ошибка средней. В качестве границы статистической значимости различий между независимыми выборками принимали $p < 0,05$. Уровень статистической значимости рассчитывали с использованием t-критерия Стьюдента.

группа \ показатель	ОПА,%	ТБРП, мкмоль	ОАА,%	СОД,%	ГПО,%	КАТ,%
Интактная группа	81,86±18,14	8,03±1,05	21,57±6,89	21,92±5,35	46,63±2,73	33,42±4,13
Контрольная группа	64,38±4,05	10,16±0,89*	27,30±2,24	37,97±1,12*	65,86±2,74*	35,25±0,99
Опытная группа	60,65±3,54	4,48±0,29	23,07±2,07	24,97±1,60	45,01±2,24	29,06±1,00

Результаты определения показателей активности СРО в гомогенате желудка крыс, показаны в таблице 2.

Изучение показателей активности процессов свободно-радикального окисления продемонстрировало повышение концентрации ТБРП в СОЖ крыс контрольной группы относительно интактных крыс на 21%. При применении пептидного комплекса концентрация ТБРП была меньше в 2,3 раза по сравнению с контролем заболевания ($p < 0,05$). Активность СОД была выше в контрольной группе на 16% относительно интактной ($p < 0,05$), но на фоне введения исследуемого пептидного комплекса

показатель существенно не отличался от показателя активности СОД здоровых крыс. Такая же картина наблюдалась в случае ГПО: под действием ультцерогенного фактора активность фермента была выше на 29% ($p < 0,05$), но на фоне применения пептидного комплекса она соответствовала уровню интактных крыс. Показатели общей антиоксидантной активности и концентрация каталазы были незначительно повышены в группе контроля заболевания по сравнению с интактными крысами. У крыс, получавших пептидный комплекс, и здоровых животных эти показатели существенно не отличались.

Обсуждение полученных результатов

Таким образом, входе исследования установлено, что введение пептидного комплекса не влияет на активность ЦОГ-1 в слизистой желудка и плазме крови, а также на активность ЦОГ-2 в плазме крови. Однако при этом снижает активность ЦОГ-2 в слизистой оболочке желудка. Как известно, ЦОГ-1 является конститутивным ферментом клеток слизистой оболочки и участвует в синтезе гастропротекторных простагландинов. Введение индометацина вызывает снижение активности этого фермента. Одинаковый уровень ЦОГ-1 у крыс контрольной и подопытной групп свидетельствует о том, что гастропротекторное действие пептидного

комплекса не связано напрямую с подавлением ингибирующей активности индометацина. В то же время ЦОГ-2 является индуцибельным ферментом, его продукция стимулируется провоспалительными цитокинами и факторами роста, которые образуются во время воспалительной реакции [2,3]. В том числе, этот фермент принимает непосредственное участие в развитии повреждений на фоне приема индометацина, т.к. уровень его содержания в слизистой оболочке гастродуоденальной области значительно повышается при индометацин-индуцированной гастропатии [8]. По всей видимости, снижение концентрации ЦОГ-2 в слизистой

оболочке желудка крыс подопытной группы по сравнению с контрольной группой связано с уменьшением выраженности воспалительного процесса в области язвенного поражения.

Не исключено, что данный эффект может коррелировать со снижением выраженности оксидативного повреждения клеток желудка. Результаты исследования показали, что на фоне введения пептидного комплекса произошло значительное снижение концентрации ТБРП в ткани слизистой оболочки желудка. ТБРП являются продуктами перекисного окисления липидов, и их накопление может привести к повышению проницаемости и повреждению клеточных мембран, подавлению деления и регенерации клеток [5]. Снижение их

концентрации свидетельствует о понижении активности процессов перекисного окисления липидов. Компоненты антиоксидантной системы (СОД, ГП, КАТ) взаимодействуют среди прочего с активными формами кислорода, способными вызвать окислительную модификацию различных биополимеров [5]. Индометацин способен индуцировать образование свободных радикалов в клетках слизистой оболочки желудка [9], с чем, вероятно, и связано повышение антиоксидантных ферментов. Восстановление концентраций ферментов до уровня здоровых крыс при введении пептидного комплекса может быть связано с его способностью угнетать процессы образования свободных радикалов в ткани.

Выводы

1. Введение пептидного комплекса из тканей свиных почек сопровождается ослаблением выраженности воспалительного процесса в области язвенного поражения, о чём свидетельствует снижение концентрации ЦОГ-2 в слизистой оболочке желудка.
2. Введение пептидного комплекса из тканей свиных почек сопровождается ослаблением оксидативного повреждения клеток желудка и усилением их ферментной антиоксидантной защиты.

Литература | Reference

1. Лоренц С.Э., Жариков А.Ю., Бобров И.П. и соавт. Гастропротекторное действие пептидного комплекса // Сиб. науч. мед. ж. – 2017. – Т. 37, № 6. – С. 5–9.
Lorenz S. E., Zharikov A. Yu., Bobrov I. P. et al. Gastro-protective effect of peptide complex // Siberian scientific medical journal. – 2017. – Vol. 37, № 6. – P. 5–9.
2. Новиков В.Е., Крюкова Н.О., Крикова А.В. НПВН-индуцированные гастропатии и их профилактика // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2008. – Т. 6, № 1. – С. 26–30.
Novikov V. E., Kryukova N. O., Krikova A. V. NSAIDs-induced gastropathies and their prevention // Reviews of clinical pharmacology and drug therapy. – 2008. – Vol. 6, № 1. – P. 26–30.
3. Курсов С.В., Никонов В.В. Циклооксигеназа: физиологические эффекты, действие ингибиторов и перспективы дальнейшего использования парацетамола (аналитический обзор) // Медицина неотложных состояний. – 2016. – Т. 76, № 5. – С. 27–35.
Kursov S. V., Nikonov V. V. Cyclooxygenase: physiological effects, inhibitor action and prospects for further use of paracetamol (analytical review) // medicine of emergency conditions. – 2016. – Vol. 76, № 5. – P. 27–35.
4. Радбиль О.С. Свободные радикалы и заболевания органов пищеварения // Клини. мед. – 1989. – № 3. – С. 17–21.
Radbil O. S. Free radicals and diseases of the digestive system // Clinical medicine – 1989. – № 3. – P. 17–21.
5. Шербатых А.В., Кулинский В.И., Большешапов А.А., Соколова С.В. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная система при язвенной болезни желудка, двенадцатиперстной кишки и постгастрорезекционных синдромах // Сиб. мед. журн. – 2005. – № 3. – С. 9–13.
Shcherbatykh A. V., Kulinsky V. I., Bolsheshapov A. A., Sokolova S. V. Lipid Peroxidation and antioxidant system in gastric ulcer, duodenal ulcer and postgastrectomy syndromes // Siberian scientific medical journal. – 2005. – № 3. – P. 9–13.
6. Лелявина Т.И., Инешина Е.Г., Жигаев Г.Ф. и др. Перекисное окисление липидов и длительно незаживающие гастродуоденальные язвы // Сиб. мед. ж. – 2002. – Т. 34, № 5. – С. 46–48.
Lelyavina T. I., Ineshina E. G., Zhigaev G. F. et al. Lipid Peroxidation and nonhealing gastroduodenal ulcer // Siberian scientific medical journal – 2002. – Vol. 34, № 5. – P. 46–48.
7. Жарикова Г.В., Жариков А.Ю., Киселев В.И. и соавт. Влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек на показатели свободнорадикального окисления при экспериментальной мочекаменной болезни // Сиб. науч. мед. ж. – 2017. – Т. 37, № 2. – С. 17–21.
Zharikova G. V., Zharikov A. Yu., Kiselev V. I. et al. The influence of peptide complex from the tissues of pig kidneys on the indicators of free radical oxidation in experimental urolithiasis // Siberian scientific medical journal 2017. – Vol. 37, № 2. – P. 17–21
8. Степанов Ю.М., Бреславец Ю.С., Динамика содержания ЦОГ-2 в слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки на фоне медикаментозной коррекции НПВП-гастропатий. Гастроэнтерология, 2013, том 47 № 1, с36–42
Stepanov Yu. M., Breslavets Yu. S. Dynamics of the content of COX-2 in the mucosa of the stomach and duodenum on the background of medicamentous correction of NSAID-gastropathy. Gastroenterology, 2013, volume 47 No. 1, C36–42
9. Усманова Ш.Э., Якубов А.В. Состояние окислительного стресса в слизистой желудка и пути его коррекции при индометацин-индуцированной гастропатии. Современная медицина, актуальные вопросы, 2014, № 28, с. 88–97
Usmanova sh. e, Yakubov A. V. the state of oxidative stress in the gastric mucosa and ways of its correction in indomethacin-induced gastropathy. Modern medicine, topical issues, 2014, № 28, p. 88–97