

УДК 612.398.145.1:612.015.1:612.32:599.323.4

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2017.3.50-53

Влияние аргининсодержащего глипролина PRPGP на синтез ДНК и свободнорадикальное окисление в слизистой оболочке желудка белых мышей на модели индометацин-индуцируемого язвообразования

И.В. Толстенок¹, О.А. Лебедько^{1,2}, Л.А. Андреева³, А.А. Иннокентьев¹, М.Ю. Флейшман¹¹ Дальневосточный государственный медицинский университет (680000, г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, 30),² Хабаровский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания – НИИ охраныматеринства и детства (680022, г. Хабаровск, ул. Воронежская, 49, корп. 1), ³ Институт молекулярной генетики

Российской академии наук (123182, г. Москва, площадь академика И.В. Курчатова, 2)

На модели гастропатии, индуцированной индометацином, изучали влияние глипролина Pro-Arg-Pro-Gly-Pro на синтез ДНК (авторадиография с ³H-тимидином), интенсивность свободнорадикального окисления (хемилюминесценция) и площадь эрозивно-язвенного поражения в слизистой оболочке желудка белых мышей. В физиологических условиях введение пептида PRPGP не вызывало изменений индекса меченых ядер, параметров люминесценции и эрозивно-язвенных повреждений. При воздействии индометацина после пятикратного введения глипролина в дозе 1 мг/кг наблюдали эрозивно-язвенные повреждения слизистой оболочки, снижение индекса меченых ядер, а также усиление процессов свободнорадикального окисления и угнетение антиоксидантной антирадикальной системы защиты.

Ключевые слова: олигопептиды, нестероидные противовоспалительные препараты, оксидативный стресс, оксид азота

Пептиды семейства глипролинов относятся к регуляторным белкам. Трипептид Pro-Gly-Pro (PGP) – один из наиболее изученных глипролинов, перспективен для создания на его основе официального препарата. Кроме того, аминокислотная последовательность PGP входит в состав официальных препаратов «Семакс» и «Селанк». Среди глипролинов встречаются аргининсодержащие олигопептиды. Пептид PGP является фрагментом олигопептида Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (PRPGP), синтезированного в лаборатории сектора регуляторных пептидов (отдел химии физиологически активных веществ ИМГ РАН).

Важную роль в поддержании гомеостаза различные группы исследователей отводят аминокислоте аргинин, в том числе, и при гастропатиях, индуцированных нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП-гастропатиях) [5, 9, 11, 12, 13]. Оксид азота синтезируется из аргинина путем присоединения нитроксидсинтазой к атому азота гуанидиновой группы молекулярного кислорода, с одновременным образованием цитрулина [3].

Исследователями отмечается широкий спектр терапевтического действия аргинина – гепатотропные, противомикробные, иммуностропные, психотропные свойства [4]. Показано, что комбинация аргинина с ибупрофеном положительно влияет на репарацию эрозивно-язвенных поражений слизистой оболочки желудка за счет усиления ангиогенеза и выработки фактора роста фибробластов [14]. После курсового введения опиоидных аргининсодержащих пептидов в дозе 100 мкг/кг мышам и крысам наблюдали

противоязвенные эффекты с уменьшением площади поражения, активацией синтеза ДНК, ослаблением проявлений оксидативного стресса [1, 2, 7]. Этот процесс опосредуется активацией системы «нитроксидсинтаза – оксид азота» [2].

В ранее проведенных исследованиях было показано, что введение PGP в дозировке 1 мг/кг на фоне приема индометацина стимулировало пролиферацию в слизистой оболочке желудка. Однако введение аргининсодержащего пептида Arg-Gly-Pro в той же дозировке, также на фоне приема индометацина, вело к инверсии защитных эффектов с утяжелением эрозивно-язвенных повреждений слизистой оболочки [10]. В задачи настоящего исследования входило выяснение характера влияния PRPGP на процессы синтеза ДНК и состояния свободнорадикального окисления в эпителии слизистой оболочки желудка в физиологических условиях и на модели НПВП-гастропатии.

Материал и методы

Опыты проводили на 59 белых мышках-самцах массой 23–28 г, полученных через ОАО «Дальхимфарм» из центрального питомника лабораторных животных РАМН (отделение Крюково). При постановке опытов руководствовались приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 г. В первой части экспериментов использовали 31 животное. PRPGP вводили внутривентриально в дозе 1 мг/кг один раз в день в течение пяти дней. На пятый день животным интрагастрально (через зонд) вводили индометацин в дозе 250 мг/кг. Контрольная группа мышей получала эквивалентное количество

0,9% раствора хлорида натрия. Животные выводились из эксперимента путем декапитации на 7-е сутки.

Площадь эрозивно-язвенных поражений определяли с помощью компьютерной морфометрии. Анализ ДНК-синтетической активности эпителия слизистой оболочки желудка осуществляли методом автордиографии с ^3H -тимидином. Тимидин вводили в дозе 1 мкКи/г массы тела. Радиоавтографы изготавливали с использованием фотоэмульсии Ilford Scientific Product K. 2 Emulsion in gel form (CAT 1355109). Индекс меченых ядер (ИМЯ) определяли в зоне собственных желез желудка на продольных послойных срезах при подсчете 2500–3000 клеток и выражали в процентах.

Процессы свободнорадикального окисления в гомогенатах желудка исследовали методом хемилюминесценции (во второй части экспериментов использовано 28 животных). Свечение регистрировали на спектрометре LS 50B (Perkin Elmer) по ранее описанной методике [8]. Определяли светосумму за 1 мин спонтанной люминесценции (величина которой прямо коррелирует с интенсивностью генерации активных метаболитов кислорода), максимум амплитуды быстрой вспышки Fe^{2+} -индуцированного свечения (указывающего на содержание гидроперекисей липидов), светосумму за 2 мин Fe^{2+} -индуцированного свечения (отражающие скорость образования перекисных радикалов преимущественно липидной природы), максимум амплитуды H_2O_2 -индуцированного люминол-зависимого свечения (величина которого обратно коррелирует с перекисной резистентностью субстрата), светосумму за 2 мин H_2O_2 -индуцированного люминол-зависимого свечения (величина которой обратно коррелирует с активностью антиоксидантной антирадикальной системы защиты). Статистическую обработку полученных данных проводили путем вычисления средних арифметических величин и их средних ошибок с использованием *t*-критерия Стьюдента для анализа достоверности разности после проверки значений на нормальность.

Результаты исследования

Введение PRPGP в физиологических условиях не оказало влияния на процессы синтеза ДНК слизистой

Таблица 1

Влияние PRPGP на синтез ДНК в слизистой оболочке желудка белых мышей, получавших индометацин ($M \pm m$)

Группа	ИМЯ, %
Контроль (n=8)	10,58±1,33
PRPGP (n=8)	8,87±1,05
Индометацин (n=7)	7,16±0,74 ¹
PRPGP + индометацин (n=8)	6,55±0,70 ^{1,2}

¹ Разница с контролем статистически значима.

² Разница с группой «индометацин» статистически значима.

оболочки, свободнорадикального окисления в гомогенатах желудка и язвообразования. Внутрижелудочное введение индометацина привело к формированию эрозивно-язвенных повреждений, но средняя площадь язв у 8 животных группы «PRPGP + индометацин» ($3,72 \pm 1,14 \text{ мм}^2$) достоверно не отличалась от таковой в группе «индометацин» (7 животных – $3,23 \pm 0,67 \text{ мм}^2$). Воздействие индометацина сопровождалось достоверным уменьшением ИМЯ в пилорическом отделе желудка (табл. 1).

Как и в предыдущих исследованиях [10], моделирование НПВП-гастропатии индуцировало оксидативный стресс на органном уровне – в ткани желудка. Отмечались выраженная активация свободнорадикального окисления, повышение концентрации гидроперекисей липидов, ускорение образования перекисных радикалов, ослабление антиоксидантной защиты и снижение перекисной резистентности (табл. 2).

В группе животных, пятикратно получавших PRPGP, отмечено уменьшение ИМЯ по сравнению с группой «индометацин» (табл. 1). По параметрам свободнорадикального окисления и площади эрозивно-язвенных повреждений слизистой оболочки группы «PRPGP+индометацин» и «индометацин» не различались. Как мыши, получавшие индометацин, так и мыши, получавшие его с PRPGP, имели сниженные показатели синтеза ДНК, интенсификацию процессов свободнорадикального окисления и увеличенную площадь повреждения слизистой оболочки желудка.

Таблица 2

Показатели хемилюминесценции гомогенатов желудка белых мышей ($M \pm m$)

Группа	Показатель, отн. ед. ¹				
	S-sp	h	Sind-1	H	Sind-2
Контроль (n=8)	1,11±0,07	1,88±0,13	2,53±0,14	1,10±0,06	1,73±0,08
PRPGP (n=8)	1,25±0,08 ³	2,03±1,14 ³	2,64±0,12 ³	1,89±0,12 ³	1,22±0,07 ³
Индометацин (n=7)	3,92±0,15 ²	5,28±0,28 ²	12,03±0,43 ²	6,45±0,21 ²	7,47±0,28 ²
PRPGP + индометацин (n=5)	4,14±0,18 ²	5,96±0,23 ²	14,83±0,45 ^{2,3}	7,79±0,29 ²	8,05±0,27 ^{2,3}

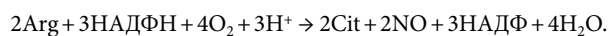
¹ S-sp – светосумма за 1 мин спонтанной люминесценции, h – максимум амплитуды быстрой вспышки Fe^{2+} -индуцированного свечения, Sind-1 – светосумма за 2 мин Fe^{2+} -индуцированного свечения, H – максимум амплитуды H_2O_2 -индуцированного люминол-зависимого свечения, Sind-2 – светосумма за 2 мин H_2O_2 -индуцированного люминол-зависимого свечения.

² Разница с контролем статистически значима.

³ Разница с группой «индометацин» статистически значима.

Обсуждение полученных данных

Пептид PRPGP в дозировке 1 мг/кг в данном исследовании не продемонстрировал корректирующего действия в условиях экспериментальной НПВП-гастропатии. Возможно, это обусловлено эффектами, связанными с биосинтезом оксида азота под действием ферментов и с последующей активацией соответствующих каскадов биохимических реакций в клетках-мишенях. В зависимости от собственной концентрации и редокс-фона оксид азота способен запускать каскады сигнальной трансдукции, направленные либо на выживание клеток и пролиферацию, либо на остановку клеточного цикла и апоптоз [15]. Теоретически можно предположить, что после протеолиза PRPGP до отдельных аминокислот, образовавшийся аргинин будет весь без остатка включен в реакцию биосинтеза оксида азота, описываемую следующим уравнением [3]:



При весе мышцы-самца 25 г и введении 1 мг/кг доза PRPGP равна 25 мкг. Атомный вес остатка аргинина в пептиде составляет 156 а.е.м, а молярная масса, соответственно, – 156 г/моль. Молярная масса пептида PRPGP равняется 522,6 г/моль. Было рассчитано количество грамм остатка аргинина в PRPGP, как отношение (N) молярной массы остатка аргинина к молярной массе пептида:

$$N = 157 \text{ г/моль} / 523 \text{ г/моль} = 0,3 \text{ и } 0,000025 \text{ г} \times 0,3 = 7,5 \times 10^{-6} \text{ г}.$$

Затем, по уравнению реакции [3] рассчитали массу оксида азота (x) с учетом того, что молекулярная масса аргинина – $2 \times 174,2$ г/моль, а молекулярная масса окиси азота – 2×30 г/моль:

$$x = (2 \times 30 \text{ г/моль}) \times 0,0000075 \text{ г} / 2 \times 174,2 \text{ г/моль} = 1,29 \times 10^{-6} \text{ г}.$$

Количество вещества (v) оксида азота равно $(1,29 \times 10^{-6} \text{ г} : 30 \text{ г/моль}) 4,3 \times 10^{-8}$ моль. Учитывая объем циркулирующей крови у мышей (77 мл/кг), можно рассчитать теоретическую молярную концентрацию (C_M) пептида (на исходный вес мышцы объем циркулирующей крови будет равен $77 \text{ мл} \times 0,025 \text{ кг} / 1 \text{ кг} = 1,93 \text{ мл}$, или 0,00193 л):

$$C_M = (4,3 \times 10^{-8} \text{ моль}) / 0,00193 \text{ л} = 2,23 \times 10^{-5} \text{ моль/л (M)} = 22,3 \text{ мкмоль/л (мкM)}.$$

Согласно данным D.D. Thomas et al. [15] при превышении концентрации окиси азота в 1 мкM происходит нитрозирование специфических белков – поли(АДФ-рибозо)полимераз. Это семейство содержит 18 различных ферментов, катализирующих переборску остатков аденозиндифосфат-рибозы от никотинамидадениндинуклеотида для дальнейшего образования поли(АДФ-рибозо)цепи, которая составляет основу для восстановления структуры ДНК. Избыточная активность белков этого семейства

истощает запасы аденозинтрифосфата с дальнейшим нарушением функционирования митохондрий и повышением содержания ионов кальция [4].

Активное накопление продуктов свободнорадикального окисления разобщает кардиолипин и цитохромоксидазу С с дальнейшим окислением самого кардиолипина в производные гидроперекисей липидов. Все показатели хемолуминисценции, отражающие биогенез свободных радикалов, в опыте были резко повышены, что указывает на формирование тяжелого оксидативного стресса. Избыточная концентрация ионов кальция вызывает открытие митохондриальных Ca^{2+} -зависимых каналов, играющих основную роль в апоптозе [13]. Через эти каналы в межклеточную среду выходит комплекс IV дыхательной цепи (цитохромоксидаза С), который здесь связывается с фактором активации протеаз апоптоза (Araf-1 – apoptotic protease activating factor-1), формируя апоптосому. Затем происходит последовательная активация каспаз 7 и 3, расщепляющих структурные белки, что приводит к апоптозу клетки [6].

Настоящее исследование, как и работы, выполненные в нашей лаборатории ранее [10], позволяют сделать вывод о разнонаправленном действии глипролинов PGP, RGP, PRPGP (в дозе 1 мг/кг) в отношении синтеза ДНК, процессов свободнорадикального окисления и репаративных процессов на модели эрозивно-язвенных повреждений слизистой оболочки желудка.

Выводы

1. Введение пептида PRPGP в дозе 1 мг/кг в условиях экспериментальной НПВП-гастропатии не оказывало корректирующего действия на показатели ИМЯ, площадь эрозивно-язвенных повреждений слизистой оболочки желудка и процессов свободно-радикального окисления.

2. Возможный механизм действия PRPGP в условиях экспериментальной НПВП-гастропатии – избыточная генерация окиси азота, приводящая к истощению антирадикальной защиты клетки с последующей активацией апоптоза через каскад сигнальной трансдукции.

Литература / References

1. Болоняева Н.А., Животова Е.Ю., Флейшман М.Ю. и др. Применение даларгина для профилактики и лечения НПВП-гастропатий // Дальневосточный медицинский журнал. 2005. №2. С. 28-30. (Bolonyayeva N.A., Zhivotova E.Yu., Fleyshman M.Yu. [et al.]. The use of dalargin for the prevention and treatment of NSAIDs-gastropathies // Far East Medical Journal. 2005. No. 2. P. 28–30.)
2. Животова Е.Ю., Масленникова Н.В., Флейшман М.Ю. [и др.]. Система NOS-NO – универсальное звено в реализации гастропротективных эффектов опиоидных пептидов // Дальневосточный медицинский журнал. 2011. № 4. С. 83–86. (Zhivotova E.Yu., Maslennikova N.V., Fleyshman M.Yu. [et al.]. The NOS-NO system is a universal link in the implementation of gastroprotective effects of opioid peptides // Far East Medical Journal. 2011. No. 4. P. 83–86.)

3. Жилюк В.И., Мамчур В.И. Роль эндотелия в механизмах нейропротекторного действия ноотропных средств в условиях гипергликемии // Журнал НАМН України. 2013. Т. 19, № 2. С. 184–193. (Zhilyuk V.I., Mamchur V.I. The role of endothelium in the mechanisms of neuroprotective action of nootropic agents in conditions of hyperglycemia // NAMS Journal of Ukraine. 2013. Vol. 19, No. 2. P. 184–193.)
4. Кишко Т.О., Шандренко С.Г., Дмитренко Н.П. Аргинин: биологическое действие, влияние на синтез оксида азота // Журнал АМН Украины. 2008. Т. 14, № 1. С. 150–158. (Kishko T.O., Shadarenko S.G., Dmitrenko N.P. Arginine: biological action, effect on the synthesis of nitric oxide // NAMS Journal of Ukraine. 2008. Vol. 14, No. 1. P. 150–158.)
5. Кульманова М.У., Касимова Г.З., Сабирова Р.А. Оксид азота и его роль в развитии патологических состояний. Ташкент: ТМА, 2014. 169 с. (Kulmanova M.U., Kasimova G.Z., Sabirova R.A. Nitric oxide and its role in the development of pathological conditions. Tashkent: TMA, 2014. 169 p.)
6. Левченкова О.С., Новиков В.Е., Пожилова Е.В. Митохондриальная пора как мишень фармакологического воздействия // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2014. Т. 13, № 4. С. 24–33. (Levchenkova O.S., Novikov V.E., Pozhilova E.V. Mitochondrial pore as a target of pharmacological action // Vestnik Smolenskoy Gosudarstvennoy Medicinskoy Akademii. 2014. Vol. 13, No. 4. P. 24–33.)
7. Масленникова Н.В., Сазонова Е.Н., Тимошин С.С. Влияние бета-казоморфина-7 на процессы синтеза ДНК в клеточных популяциях новорожденных белых крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008. Т. 145, № 2. С. 170–172. (Maslennikova N.V., Sazonova E.N., Timoshin S.S. The effect of beta-casomorphin-7 on the processes of DNA synthesis in the cellular populations of newborn white rats // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2008. Vol. 145, No. 2. P. 170–172.)
8. Тимошин С.С., Брагина В.В., Лебедев О.А. [и др.]. Влияние ингибитора HMG-CoA-редуктазы на процессы синтеза ДНК и свободнорадикальное окисление в слизистой оболочке желудка в норме и при индуцируемом индометацином язвенно-эрозивном поражении желудка у белых мышей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. Т. 152, № 9. С. 265–267. (Timoshin S.S., Bragina V.V., Lebedko O.A. [et al.]. The effect of HMG-CoA reductase inhibitor on DNA synthesis processes and free radical oxidation in the gastric mucosa in normal and indomethacin-induced ulcerative erosive lesions of the stomach in white mice // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2011. Vol. 152, No. 9. P. 265–267.)
9. Флейшман М.Ю., Животова Е.Ю., Лебедев О.А. [и др.]. Протективное действие аналога дерморфина седатина на индуцируемое индометацином повреждение слизистой оболочки желудка // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009. Т. 148, № 7. С. 72–75. (Fleyshman M.Yu., Zhivotova E.Yu., Lebedko O.A. [et al.]. The protective effect of the dermorphine sedatin analog on indomethacin-induced damage to the gastric mucosa // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2009. Vol. 148, No. 7. P. 72–75.)
10. Флейшман М.Ю., Толстенков И.В., Лебедев О.А. [и др.]. Влияние глипролинов на синтез ДНК и свободнорадикальное окисление в слизистой оболочке желудка мышей в физиологических условиях и при приеме нестероидных противовоспалительных препаратов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 159, № 4. С. 500–503. (Fleyshman M.Yu., Tolstenkov I.V., Lebedko O.A. [et al.]. The effect of glyprolines on DNA synthesis and free radical oxidation in the mucous membrane of the stomach of mice under physiological conditions and with the administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2015. Vol. 159, No. 4. P. 500–503.)
11. Dabo U., Oluwole F., Adedeji T. Effects of L-arginine and L-citrulline on indomethacin-induced gastric ulceration and gastric pH in male albino rats // European Journal of Medicinal Plants. 2014. Vol. 4, No. 6. P. 623–640.
12. Fleishman M.Yu., Kuznetsov A.V. [et al.]. Effect of the arginine-containing μ, δ -opioid receptor agonist sedatin on DNA synthesis in the epithelium of the gastric fundus in albino rats // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2004. Vol. 137, No. 3. P. 235–237.
13. Guha P., Dey A., Chatterjee A. [et al.]. Pro-ulcer effects of resveratrol in mice with indomethacin-induced gastric are reserved by L-arginine // British Journal Pharmacology. 2010. Vol. 159, No. 3. P. 726–734.
14. Sanchez-Fidalgo S., Martin-Lacave L, Illanes M. [et al.]. Administration of L-arginine reduces the delay of the healing process caused by ibuprofen. Implication of COX and growth factors expression // Histology and Histopathology. 2005. Vol. 20, No. 2. P. 437–447.
15. Thomas D.D., Ridnour L.A., Isenberg J.S. [et al.]. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling // Free Radical Biological Medicine. 2008. Vol. 45, No 1. P. 18–31.

Поступила в редакцию 20.07.2016.

THE EFFECT OF ARGININE-CONTAINING GLYPROLINE PRPGP ON DNA SYNTHESIS AND FREE RADICAL OXIDATION IN THE MUCOSA OF THE STOMACH OF WHITE MICE ON THE MODEL OF INDOMETHACIN-INDUCED ULCER FORMATION

I.V. Tolstenkov¹, O.A. Lebedko^{1,2}, L.A. Andreeva³, A.A. Innokentev¹, M.Yu. Fleushman¹

¹ Far Eastern Medical University (30 Muravyeva-Amurskogo St. Khabarovsk 680000 Russian Federation), ² Khabarovsk branch of the Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration – RI of the maternity and child welfare service (49/1 Voronezhskaya St. Khabarovsk 680022 Russian Federation), ³ Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences (2 Akademika I.V. Kurchatova Sq. Moscow 123182 Russian Federation)

Objective. The effect of the oligopeptide Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (PRPGP) on DNA synthesis and free radical oxidation in the epithelium of the gastric mucosa on the model of gastroindomation induced by indomethacin was studied.

Methods. The work was performed on 59 white mice injected with PRPGP (5 days to 1 mg/kg) and intra-gastric indomethacin (on day 5, 250 mg/kg) intramarginally administered. In the stomachs of mice after excretion of animals from the experiment, the area of erosive ulcerative lesions of the mucosa, the synthesis of DNA (autoradiography with ³H-thymidine), and the intensity of free radical oxidation (chemiluminescence) were measured.

Results. Under physiological conditions, the administration of the peptide did not cause changes in the gastric mucosa. After the introduction of indomethacin, erosive and ulcerative lesions of the mucous membrane developed, the index of labeled nuclei decreased in the stomach tissue and the intensity of free radical oxidation increased.

Conclusions. Under the influence of indomethacin in the mucous membrane of the stomach of white mice, oxidative stress developed. Glyproline PRPGP weighted the processes of free radical oxidation. The inversion of the action of the peptide in this study can be explained by the dose-dependent effect of nitric oxide. The theoretical concentration of nitric oxide formed from the peptide after proteolysis was calculated. It was found to be 22.3 μ M. Exceeding the threshold concentration of nitric oxide (1 μ M) caused the activation of poly (ADP-ribose) polymerases, disruption of mitochondria and accumulation of calcium ions, which led to apoptosis through a cascade of consecutive reactions.

Keywords: oligopeptides, non-steroidal anti-inflammatory drugs, oxidative stress, nitric oxide