

На правах рукописи

**ЛОРЕНЦ САМИРА ЭЛЬШАДОВНА**

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЕПТИДНЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ДЛЯ  
КОРРЕКЦИИ ГАСТРОПАТИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ИНДОМЕТАЦИНОМ**  
(экспериментальное исследование)

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

**Жариков Александр Юрьевич**, доктор биологических наук, доцент.

**Официальные оппоненты:**

**Шабанов Петр Дмитриевич**,

доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом нейрофармакологии им.

С.В.Аничкова Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»

**Толстикова Татьяна Генриховна**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией фармакологических исследований (ЛФИ) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Новосибирск

Защита диссертации состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.030.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова» Федерального медико-биологического агентства (192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова»

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук,

профессор

Луковникова Любовь Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Заболеваемость различными патологиями органов пищеварения по данным Федеральной службы государственной статистики Российской Федерации составляет около 34 чел./1000 чел. населения и за последние 10 лет остается примерно на одном уровне, не имея тенденции к снижению [Федеральная служба государственной статистики, 2019]. Важную роль в этом ряду занимают гастропатии, вызванные приемом нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП-индуцированные гастропатии). Данный термин описывает выявляемое при эндоскопическом исследовании повреждение слизистой оболочки верхних отделов ЖКТ с формированием эрозий и язв. Использование НПВП является второй по значимости после инфицирования *Helicobacter Pylori* причиной развития эрозивных поражений слизистой оболочки желудка (СОЖ) [[Huang J. et al., 2002; Ootani H. et al., 2006]. При этом заболеваемость *H.Pylori*-ассоциированной язвенной болезнью в ЕС, США, Японии и других странах постепенно уменьшается, тогда как НПВП-индуцированные гастропатии встречаются все чаще, и на данный момент все увереннее закрепляются в качестве основного неинфекционного этиологического фактора развития язвенной болезни желудка [Калягин, А. Н. и др., 2003, Литовский, И. А. и др., 2017, Ohno, T. et al., 1999, Takeuchi, K. et al., 2003].

На сегодняшний день доказана прямая зависимость между эпидемиологией язвенной болезни желудка и гастрита и заболеваемостью ревматоидным артритом, артрозами и другими воспалительными заболеваниями, фармакотерапия которых требует длительного назначения НПВП [Калягин, А. Н. и др., 2003, Хуцишвили, М. Ш. и др., 2007, Ширинская, Н. В. и др., 2016]. При этом установлено, что 40-50% всех острых желудочных кровотечений, потребовавших эндоскопического или хирургического вмешательства, обусловлены приемом НПВП [Гельфанд, Б. Р. и др., 2013, Евсеев, М. А. и др., 2006, Шостак, Н. А. и др., 2003, Harirforoosh, S. et al., 2013]. При общей смертности от этих осложнений около 10%, среди этих людей в 2-3 раза чаще оказываются пациенты, получающие НПВП, чем лица, не получающие препараты данной группы [Маев, И. В. и др., 2012-2013, Хуцишвили, М. Ш. и др., 2007, Brooks, J. et al., 2013, Silverstein, F. et al., 1996].

В то же время медицинское применение НПВП имеет столь важное значение, что отказаться или хотя бы ограничить прием этих препаратов возможным в обозримом будущем не представляется. Кроме того, как известно, механизм ульцерогенного действия НПВП практически идентичен основному механизму противовоспалительного, жаропонижающего и анальгетического действия НПВП, заключающемуся в блокаде циклооксигеназы и нарушении синтеза простагландинов [Laine, L. et al., 2008, Scarpignato, C. et al., 1999]. Это означает, что любое медицинское применение НПВП, особенно неселективного действия на циклооксигеназы-1,2 (ЦОГ-1,2), может и будет сопровождаться развитием гастропатии [Tanaka, A. et al., 2001-2002]. Обозначенную проблему в определенной степени удалось решить, создав НПВП, селективно ингибирующие ЦОГ-2 [Zhu, X. T. et al., 2018]. Однако оказалось, что данные лекарственные средства обладают более слабыми фармакологическими эффектами, нежели неселективные ингибиторы ЦОГ-1,2, которые по этой причине остаются наиболее часто применяемыми препаратами.

Таким образом, несмотря на существенный прогресс в рационализации применения НПВП, высокая вероятность развития неблагоприятных явлений со стороны ЖКТ при приеме этих препаратов сохраняется. В связи с этим актуальным остается вопрос поиска новых эффективных и безопасных фармакологических средств для профилактики НПВП-индуцированных гастропатий, и особенно – без снижения пищеварительной и эвакуаторной функции желудка.

В данном контексте среди изучаемых в последние годы соединений все большее внимание уделяется средствам природного происхождения или созданным по их подобию аналогам, которые, не являясь ксенобиотиками для человеческого организма, могут обладать меньшей токсичностью при достаточно высокой терапевтической активности. Особо следует выделить направление поиска новых гастропротекторов среди соединений олигопептидной природы

[Жернакова, Н. И. и др., 2010, Саватеева-Любимова, Т. Н. и др., 2012, Животова, Е. Ю. и др., 2009, Толстенюк, И. В. И др., 2016].

Ранее в нашей лаборатории были обнаружены антилитогенные свойства при экспериментальной мочекаменной болезни пептидного комплекса из тканей свиных почек [Жариков А. Ю. и др., 2017]. В этой связи следует отметить, что в настоящее время в ряде экспериментальных работ показано, что некоторые биохимические процессы в нефротелии при мочекаменной болезни и в эпителии желудка при язвенной болезни в определенной степени схожи. Так, например, при данных патологиях наблюдается усиление процессов свободнорадикального окисления в тканях, увеличение активности лактатдегидрогеназы – маркерного фермента цитолиза, ослабление биосинтетической активности клеток и т.п. [Alelign, T. et al., 2018, Dardamanis, M. et al., 2013, Khaskhali, M. H. et al., 2009, Maity, P. et al., 2008-2009, Ott, M. et al., 2007, Pal, S et al., 2010]. Поэтому возникло предположение, что пептидный комплекс из тканей свиных почек, который в эксперименте продемонстрировал способность ослаблять действие факторов повреждения нефротелия, нивелировать окислительный стресс в тканях, а также нормализовать морфофункциональные свойства эпителия, может оказывать благоприятное действие на структуру и функцию клеток слизистой оболочки желудка (СОЖ) при язвенной болезни, а значит, может являться перспективным объектом для разработки на его основе новых пептидных гастропротекторных препаратов [Жариков А. Ю. и др., 2017].

Данная работа посвящена изучению новых фармакологических средств олигопептидной структуры с гастропротекторной активностью при индометацин-индуцированной гастропатии, созданных посредством драг-дизайна на основе результатов исследования фармакологической активности и аминокислотного состава пептидного комплекса из тканей свиных почек.

**Степень разработанности темы исследования.** Известен гастропротективный эффект гексапептида даларгина (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg), который проявляет защитные свойства при различных патологиях желудка, в том числе и в условиях НПВП-индуцированной гастропатии [Болоняева, Н. А., 2005, Животова, Е. Ю., 2009].

Изучаются гастропротекторные свойства группы так называемых глипролинов. К глипролинам относятся дипептиды Pro-Gly, Gly-Pro, Hyp-Gly и Gly-Hyp, а также трипептиды Gly-Pro-Glu, Gly-Pro-Leu, Leu-Gly-Pro, Gly-Pro-Arg и др. и их модификации [Ашмарин, И. П., 2007].

Экспериментально показано гастропротекторное действие синтетических дипептидов глутамил-триптофана (EW), изовалероил-глутамил-триптофана (ivEW), никотиноил-глутамил-триптофана (nEW) и мелатонина при приеме внутрь на моделях стрессорной и индометациновой гастропатии.

**Цель исследования:** разработать и апробировать в эксперименте эффективные пептидные средства, созданные на основе пептидного комплекса из тканей свиных почек, для фармакологической коррекции индометацин-индуцированной гастропатии.

**Задачи исследования:**

1. Оценить гастропротекторную активность пептидного комплекса из тканей свиных почек на модели индометацин-индуцированной гастропатии у крыс и изучить потенциальные механизмы выявленной фармакологической активности.

2. Осуществить драг-дизайн индивидуальных пептидных молекул с потенциальной гастропротекторной активностью на основе данных об аминокислотном составе пептидного комплекса из тканей свиных почек.

3. Провести скрининг гастропротекторной активности индивидуальных олигопептидов в условиях индометацин-индуцированной гастропатии в сравнении с омепразолом, ранитидином и мизопростолом и определить соединения-лидеры.

4. Изучить влияние соединений-лидеров на активность процесса свободнорадикального окисления в тканях желудка крыс при экспериментальной индометацин-индуцированной гастропатии и определить соединение с наибольшей антиоксидантной активностью.

5. Изучить влияние пептида с наибольшей антиоксидантной активностью среди соединений-лидеров на интенсивность ЦОГ-2-ассоциированных воспалительных процессов в слизистой оболочке желудка крыс при экспериментальной индометацин-индуцированной гастропатии.

**Научная новизна.** Впервые показано гастропротекторное действие пептидного комплекса из тканей свиных почек на модели «индометациновой» гастропатии крыс. Продемонстрировано, что выявленное действие сопровождается ослаблением оксидативного повреждения тканей желудка и снижением ЦОГ-2-ассоциированных воспалительных процессов в слизистой оболочке желудка. Обоснована перспектива поиска новых пептидных гастропротекторов. Осуществлен драг-дизайн структур 7 новых индивидуальных олигопептидов с потенциальной гастропротекторной активностью.

Впервые установлено, что пептиды Leu-Ile-Lys, Leu-Ile-Lys-Ala и Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe в условиях «индометациновой» гастропатии крыс проявляют гастропротекторное действие. Это действие было наиболее выражено у пептида Leu-Ile-Lys и являлось сопоставимым по силе с препаратом сравнения омепразолом и превосходило препарат сравнения ранитидин. Пептиды Leu-Ile-Lys-Ala-Pro, Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly, Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val и Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val-Arg не обладали гастропротекторной активностью.

Впервые изучено влияние пептидов Leu-Ile-Lys, Leu-Ile-Lys-Ala и Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe на активность процесса свободнорадикального окисления в слизистой оболочке желудка крыс при экспериментальной «индометациновой» гастропатии крыс. Установлено, что в этих условиях антиоксидантной активностью обладает пептид Leu-Ile-Lys.

Впервые показано, что гастропротекторное действие пептида Leu-Ile-Lys сопровождается уменьшением экспрессии ЦОГ-2 в слизистой оболочке желудка, что указывает на ослабление воспалительных процессов. Одним из возможных механизмов гастропротекторного действия пептида Leu-Ile-Lys идентифицирована его антиоксидантная активность.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Практическая значимость работы заключается в том, что по результатам исследования найдено и изучено новое пептидное средство Leu-Ile-Lys, обладающее выраженной гастропротекторной активностью при индометацин-индуцированной гастропатии, в основе которой лежит антиоксидантная активность данного пептида. Это создает предпосылки для дальнейших доклинических и клинических исследований с целью внедрения в практику гастроэнтерологии нового эффективного лекарственного средства для коррекции гастропатии.

Теоретическая значимость работы заключается в получении знаний о новом направлении разработки пептидных гастропротекторных препаратов на основе пептидов тканей свиных почек.

**Методология и методы исследования.** В диссертации использованы современные высокоинформативные методологические подходы. Исследования выполнены на базе Центра медико-биологических исследований и кафедры фармакологии ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России. В исследовании были использованы методы: фармакологические (моделирование экспериментальной «индометациновой» гастропатии у крыс, драг-дизайн индивидуальных пептидов, скрининг их гастропротекторной активности), биохимические (определение в гомогенате желудков показателей оксидативного стресса и уровня экспрессии ЦОГ-1,2), морфологические (макро- и микроскопическая оценка структурного и функционального состояния слизистой оболочки желудка, определение активности ядрышковых организаторов эпителиоцитов), математические (статистический анализ результатов экспериментов с использованием параметрических и непараметрических критериев для независимых и зависимых выборок).

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Пептидный комплекс из тканей свиных почек на модели «индометациновой» гастропатии у крыс проявляет гастропротекторное действие, сопровождаемое угнетением экспрессии в слизистой оболочке желудка провоспалительного фермента ЦОГ-2, ослаблением активности процесса свободнорадикального окисления и снижением биосинтетической активности эпителиоцитов желудка. Это обосновывает перспективу поиска на основе данного биоматериала новых пептидных гастропротекторов.

2. По результатам скрининга гастропротекторной активности олигопептидных соединений, синтезированных на основе аминокислотного состава пептидного комплекса из тканей свиных почек, определены соединения-лидеры: пептиды Leu-Ile-Lys, Leu-Ile-Lys-Ala и Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe. Наибольшую активность проявляет трипептид Leu-Ile-Lys, по силе сопоставимую с омепразолом и превосходящую ранитидин.

3. Применение трипептида Leu-Ile-Lys при «индометациновой» гастропатии у крыс сопровождается выраженной антиоксидантной активностью и ослаблением ЦОГ-2-ассоциированных воспалительных процессов в условиях индометацин-индуцированного повреждения слизистой оболочки желудка.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Высокая степень достоверности результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных методов исследования и адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Материалы, представленные в работе, докладывались и обсуждались на научно-практической конференции «Биоресурсы Алтая на страже здоровья человека» (г. Барнаул, 2018 г.), XXIV Российского национального конгресса "Человек и лекарство" (г. Москва, 2019 г.), IX Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием "Молодая фармация - потенциал будущего" (г. Санкт-Петербург, 2019 г.), научно-практической конференции «Наукоемкие биомедицинские технологии: от фундаментальных исследований до внедрения» (г. Барнаул, 2019 г.), III Межрегиональной научно-практической конференции (с международным участием) «От Биопродуктов к Биоэкономике» (г. Барнаул, 2019 г.).

Основные положения диссертации опубликованы в 7 научных работах, в том числе 5 статьях в журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты кандидатских и докторских диссертации, из них 2 статьи – в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus.

По результатам исследования получены 2 патента на изобретение: № 2687561 от 15.05.2019 и № 2688187 от 21.05.2019.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 154 страницах печатного текста и проиллюстрирована 23 рисунками и 13 таблицами. Работа включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список цитируемой литературы. В списке приведено 239 источников, из них 177 - иностранных, 62 - отечественных авторов.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

**В первой главе** проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования. Проанализированы современные данные исследований о факторах, причинах и механизмах развития индометацин-индуцированного повреждения слизистой оболочки желудка. Рассмотрена роль простагландинов, оксида азота, пептидных регуляторов в осуществлении защитной функции в слизистой оболочке желудка, а также свободнорадикального окисления, процессов апоптоза и др. в процессе ее повреждения. На основании собранных данных предложен новый вектор разработки эффективных схем фармакологической коррекции индометацин-индуцированной гастропатии.

**Вторая глава** посвящена описанию материалов и методов исследования.

Экспериментальная часть исследования выполнена на 280 аутобредных крысах-самцах сток Вистар, возраст которых составлял 2-3 месяца, вес – 180-250 граммов. Животные получены из отделения генетики животных и человека Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск). Исследования на крысах проводили в соответствии с Приказом МЗ РФ № 199н от 1 апреля 2016

г. «Правила надлежащей лабораторной практики» и положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. На протяжении эксперимента крысы находились в общих клетках по 8-12 особей в условиях свободного потребления воды и стандартной лабораторной диеты, получая ежедневно 30-40 гр. корм для лабораторных грызунов, производимого ЗАО «Ассортимент-Агро» под торговой маркой «Чара». Все манипуляции с животными, включая взвешивание, введение исследуемых объектов, эвтаназию, осуществлялись в период времени от 10 до 12 часов дня.

*Введение объектов исследования* Объекты исследования и препараты сравнения в соответствующих экспериментальных группах животных вводились внутривентрально через зонд ежедневно в течение 7 дней до моделирования индометацинового повреждения слизистой желудка. Животные контрольной группы получали эквивалентные количества растворителя в соответствующих режимах введения. Последнее введение осуществлялось за 1 час до начала действия язвообразующего фактора. Моделирование НПВП-индуцированной гастропатии осуществлялось путем однократного внутривентрального введения индометацина в дозе 60 мг/кг в 1 мл физиологического раствора («индометациновая» гастропатия). Животным интактной группы введение не производилось.

*Объекты исследования:*

- Пептидный комплекс из тканей свиных почек, полученный в нашей лаборатории методом экстракции уксусной кислотой из лиофильно высушенной ткани свиных почек (доза 75 мг/кг).

- Индивидуальные олигопептидные соединения, полученные методом химического синтеза (SHANGHAI APEPTIDECO., LTD (г. Шанхай, Китайская народная республика)): Leu-Phe-Lys (доза 11,5 мг/кг), Leu-Phe-Lys-Ala (доза 14,8 мг/кг), Leu-Phe-Lys-Ala-Pro (доза 18,0 мг/кг), Leu-Phe-Lys-Ala-Pro-Phe (доза 20,8 мг/кг), Leu-Phe-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly (доза 23,6 мг/кг), Leu-Phe-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val (доза 26,4 мг/кг), Leu-Phe-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val-Arg (доза 29,0 мг/кг).

- Препараты сравнения: омепразол в дозе 37,0 мг/кг (Sigma aldrich, США, кат. № O104), ранитидин в дозе 25,0 мг/кг (Sigma aldrich, США, кат. № R101), мизопростол в дозе 0,09 мг/кг (Sigma aldrich, США, кат. № M6807),  $\alpha$ -токоферола ацетат в дозе 300 мг/кг (ОАО «Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербург», Россия).

*Методы исследования*

Через 4 часа после введения язвообразующего фактора животных подвергали эвтаназии одномоментной декапитацией под эфирным наркозом, извлекали желудок. Для морфологической оценки степени повреждения слизистой оболочки желудка гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также осуществляли гистохимические окраски на нейтральные гликозаминогликаны Шифф-реактивом по Мак-Манусу и на кислые гликозаминогликаны по Стивдену. В слизистой оболочке желудка подсчитывали общее число эрозий, число глубоких полосовидных эрозий и число поверхностных точечных эрозий, на основе этих данных высчитывали индекс Паулса и индекс противоязвенной активности. Высчитывали толщину СОЖ и глубину эрозий. Подсчитывали плотность воспалительного инфильтрата в 1 мм<sup>2</sup> при помощи окулярной сетки Автандилова Г.Г.

Выявление ядрышковых организаторов (ЯО) осуществляли по двухступенчатому методу Daskal Y. et al., в модификации И.П. Боброва [Бобров, И. П., 2010, 2013, Daskal, Y., 1980]. При увеличении  $\times 1000$  под масляной иммерсией микроскопа высчитывали число ядрышек, суммарную площадь AgNORs на 1 ядро и ядрышко-ядерное соотношение (Ядр/Яд) в относительных единицах (отн. ед.).

Содержание ферментов ЦОГ-1 и ЦОГ-2 в плазме крови и гомогенате желудка определяли методом иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов ELISA Kit for Prostaglandin Endoperoxide Synthase 1,2 (Cloud-CloneCorp., США).

Уровень окислительного стресса в ткани СОЖ оценивали по показателям активности прооксидантной и антиоксидантной системы. Концентрацию тиобарбитуратреактивных продуктов (ТБРП) определяли по интенсивности окраски основания Шиффа, образующегося при взаимодействии малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой. Общую прооксидантную активность (ОПА) измеряли по концентрации продуктов перекисного окисления ТВИН-80, которые накапливаются в результате окислительных процессов, после взаимодействия с тиобарбитуровой кислотой. Общую антиоксидантную активность (ОАА) определяли по выраженности угнетения окисления ТВИН-80, индуцированного  $Fe^{2+}$ /аскорбатом. Активность супероксиддисмутазы (СДО) измеряли по выраженности подавления образования нитроформазана в реакции окисления нитротетразолия супероксидными радикалами, образующимися при взаимодействии феназинметасульфата и никотинамиддинуклеотида. Активность каталазы (КАТ) определяли по выраженности подавления ферментом окисления молибдата натрия перекисью водорода. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) измеряли по концентрации восстановленного глутатиона после образования окрашенного продукта в цветной реакции с реактивом Элмана.

Для определения аминокислотного состава пептидного комплекса из тканей свиных почек использовали метод капиллярного электрофореза. Проводили методику на системе капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ®-105М» с положительной полярностью высокого напряжения

*Статистическая обработка результатов.* При статистической обработке результатов проверялась нормальность распределения по критерию Колмогорова-Смирнова в модификации Лиллиефорса. В случае наличия нормальности распределения результаты были представлены в виде выборочного среднего и стандартной ошибки среднего ( $M \pm m$ ), а статистическое сравнение данных проводилось с использованием параметрического t-критерия Стьюдента. При ненормальности распределения результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (25% перцентиль; 75% перцентиль), а статистическое сравнение данных проводилось с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Разница сравниваемых средних считалась достоверной, если показатель достоверности (p) был меньше 0,05. Все расчеты велись на персональном компьютере по общепринятым формулам. Для расчетов использовалась компьютерная программа Statistica 13.3.1 (лицензия JPZ906I448517FAACD-K).

**В третьей главе** представлены результаты собственных исследований.

В первой серии экспериментов было установлено, что введение индометацина вызывало явления выраженного эрозивного гастрита. При этом на фоне профилактического введения пептидного комплекса из тканей свиных почек наблюдалось его гастропротекторное действие, которое проявилось в двукратном снижении количества полосовидных эрозий, уменьшении средней глубины эрозий в 1,9 раза, увеличении толщины слизистой оболочки желудка в 1,2 раза и снижении индекса Паулса в 2 раза (Таблица 1, Рисунок 1).

При определении активности ядрышковых организаторов в ткани СОЖ было выявлено, что при индометациновом повреждении у крыс контрольной группы в клетках шеечных отделов отмечалась высокая площадь ядра и высокие показатели морфофункциональной активности ядрышковых организаторов. Число ядрышек составило  $2,9 \pm 0,30$  на 1 ядро. Площадь AgNORs на 1 ядро в среднем составила  $4,5 \pm 0,40$   $\mu\text{м}^2$ . Средняя площадь ядра составила –  $34,9 \pm 2,50$   $\mu\text{м}^2$ . Соотношение Ядр/Яд составило –  $0,18 \pm 0,04$  отн.ед. (Рисунок 2а). Это может свидетельствовать о значительной активности и скорости пролиферативных процессов в шеечных областях.

В подопытной группе в клетках шеечных отделов СОЖ площадь ядра была небольшая, а параметры морфофункциональной активности ЯО невысокие, число ядрышек составило  $1,2 \pm 0,10$  на 1 ядро. Площадь AgNORs составила  $1,7 \pm 0,10$   $\mu\text{м}^2$  на 1 ядро. Средняя площадь ядра составила  $17,2 \pm 0,90$   $\mu\text{м}^2$ . Ядр/Яд соотношение составило  $0,10 \pm 0,005$  отн.ед. (Рисунок 2б).



Таблица 1 – Макро- и микроскопические показатели структуры слизистой оболочки желудка у крыс при применении пептидного комплекса из тканей свиных почек в условиях экспериментальной индометациновой гастропатии

Показатель	Контрольная группа	Подопытная группа
Число повреждений СОЖ	9,6±1,7	6,8±1,2
Число полосовидных эрозий	4,8±0,9	2,2±1,0* p <sub>к</sub> =0,05 -54%
Число полосовидных эрозий (%)	51,1	32,4
Число точечных эрозий	4,6±1,4	4,6±1,2
Число точечных эрозий (%)	48,9	67,6
Индекс Паулса для полосовидных эрозий	4,8	2,2 -54%
Индекс Паулса для точечных эрозий	4,6	4,6
Толщина СОЖ (мкм)	335,6±12,4	406,7±14,4* p <sub>к</sub> =0,002 +21%
Глубина эрозий (мкм)	385,8±23,7	207,8±13,6* p <sub>к</sub> =0,00002 -46%
Плотность воспалительного инфильтрата в СОЖ в 1 мм <sup>2</sup>	1333,3±70,5	1720,0±115,5* p <sub>к</sub> =0,013 +29%

Примечание: Звездочкой обозначены статистически значимые различия относительно контрольной группы, p<sub>к</sub> – уровень статистической значимости различия соответствующего показателя по сравнению с контрольной группой.

Учитывая низкую активность биосинтетических процессов в клетках СОЖ в подопытной группе по сравнению с контролем, было сделано предположение, что механизм гастропротекторного действия пептидного комплекса из тканей свиных почек не связан напрямую со стимуляцией регенерации ткани.

Поскольку в основе ulcerогенного действия индометацина лежит его неселективное ингибирующее действие в отношении ЦОГ-1 и ЦОГ-2, в дальнейшем было решено проверить, связано ли обнаруженное гастропротекторное действие пептидного комплекса из тканей свиных почек с его возможным влиянием на циклооксигеназный путь регуляции выработки защитной слизи в желудке. Для этого было изучено влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек на уровень экспрессии ферментов ЦОГ-1,2 в гомогенате желудков и плазме крови крыс.

При оценке влияния пептидного комплекса из тканей свиных почек на уровень экспрессии ЦОГ-1,2 в СОЖ установлено, что концентрация ЦОГ-1 в плазме крови и гомогенате желудка крыс контрольной и подопытной групп не имела статистически значимых различий. В плазме крови у обеих групп она составила 1,0±0,11 нг/мл, а в гомогенате желудков: 5,4±0,26 нг/мл – в контроле и 5,6±0,27 нг/мл – в опыте. Концентрация ЦОГ-2 в плазме крови крыс контрольной группы и подопытной группы также различалась не значительно и составила 0,75±0,02 и 0,74±0,02 соответственно. В то же время в гомогенате желудков крыс величина данного показателя между группами существенно различалась (Рисунок 3). Оказалось, что у интактных животных концентрация ЦОГ-2 в СОЖ находилась на уровне 3,1±0,17 нг/мл. При этом в

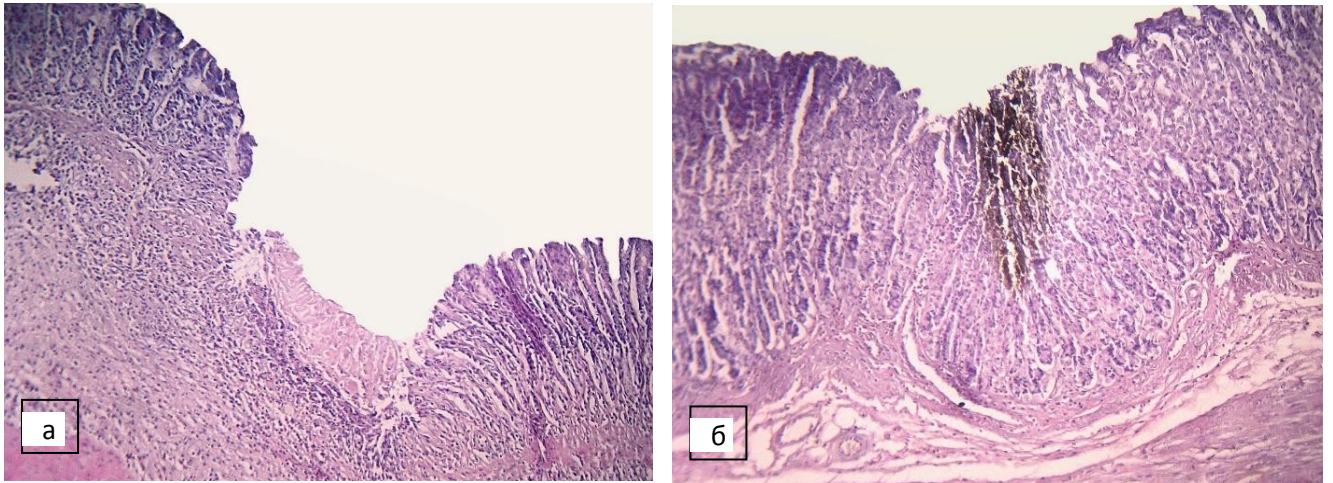


Рисунок 1 – Сравнение гистологической картины «индометациновой» гастропатии в желудках крыс контрольной группы и подопытной группы

Примечание: 1а– глубокая полосовидная эрозия в СОЖ крыс контрольной группы, 1б – поверхностная точечная эрозия с большим количеством солянокислого гематина в СОЖ у крыс подопытной группы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 100.

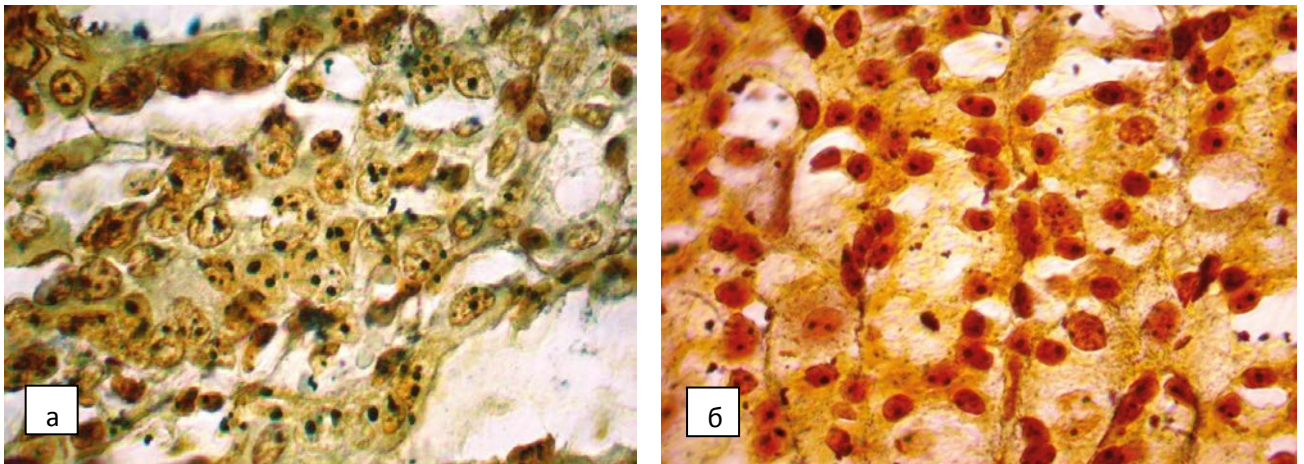


Рисунок 2 – Морфологическая оценка активности ядрышковых организаторов в клетках СОЖ крыс контрольной группы и подопытной группы

Примечание: 2а – высокая активность ядрышковых организаторов в клетках шеечных отделах СОЖ крыс контрольной группы, 2б – невысокая активность ядрышковых организаторов в клетках шеечных отделах СОЖ крыс подопытной группы. Серебрение по Боброву И.П. [Бобров И.П. и др., 2010].

контрольной группе на фоне введения индометацина она ожидаемо снизилась и составила  $2,5 \pm 0,12$  нг/мл ( $p=0,013$ ). В подопытной группе, где вводился пептидный комплекс из тканей свиных почек, концентрация ЦОГ-2 равнялась  $1,8 \pm 0,13$  нг/мл, что было в 1,4 раза меньше, чем в контроле заболевания ( $p=0,0005$ ), и в 1,7 раза меньше, чем у интактных крыс ( $p=0,000004$ ).

На наш взгляд, полученные результаты указывают на ослабление воспалительных процессов, протекающих в слизистой оболочке желудка на фоне «индометациновой» гастропатии, поскольку, как хорошо известно, ЦОГ-2 – это индуцибельный фермент, экспрессирующийся в условиях воспаления [Kargman S., 1996, O'Neill, 1993].

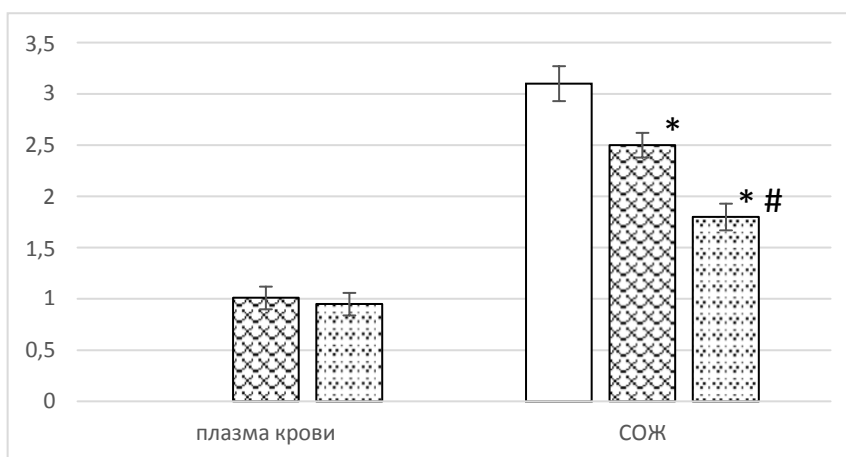


Рисунок 3 – Показатели концентрации ЦОГ-2 в плазме крови и гомогенате желудков интактных крыс, крыс контрольной группы и подопытной группы.

Примечание: По горизонтальной оси – название биологического материала, в котором измерялась концентрация ЦОГ-2. По вертикальной оси – значение показателя концентрации ЦОГ-2 в нг/мл. □ – интактные крысы, ▒ – контрольная группа, ▒ – подопытная группа.

Значения представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего. Звездочкой обозначены статистически значимые различия в контрольной группе по сравнению с интактными крысами. Знаком # обозначены статистически значимые различия в подопытной группе по сравнению с контрольной группой.

Поскольку ослабление воспаления на фоне индометацина не может быть объяснено уменьшением синтеза простагландинов, возникло предположение, что в основе данного эффекта лежат иные причины. В этой связи было решено изучить влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек на активность процесса свободнорадикального окисления в СОЖ крыс.

Результаты исследования влияния пептидного комплекса на активность процессов свободнорадикального окисления представлены в таблице 2. В подопытной группе, где вводился пептидный комплекс из тканей свиных почек, величина концентрации ТБРП уменьшилась по сравнению с контролем заболевания в 2,3 раза ( $p=0,000002$ ) и была ниже уровня интактных крыс в 1,8 раза ( $p=0,004$ ). Различия в уровне ОПА между группами не носили статистически значимого характера.

Изучение активности антиоксидантных ферментов в экспериментальных группах показало, что активность СОД в контрольной группе возросла относительно интактных крыс в 1,7 раза ( $p=0,009$ ), что, по всей видимости, носило компенсаторный характер в ответ на развивающийся оксидативный стресс. При этом в подопытной группе величина описываемого показателя была меньше, чем в контроле в 1,5 раза ( $p<0,0000001$ ) и не отличалась от уровня здоровых животных. Аналогичная в целом картина характеризовала межгрупповые различия в активности ГПО. Так, в контрольной группе значение данного показателя превышало показатели интактных крыс в 1,4 раза ( $p=0,0001$ ), а в подопытной группе на фоне применения пептидного комплекса из тканей свиных почек активность ГПО не отличалась от уровня здоровых крыс и была ниже, чем в контроле в 1,5 раза ( $p=0,000003$ ). Активность КАТ и общая антиоксидантная активность между группами различались не существенно.

Таким образом, подытоживая результаты изучения влияния пептидного комплекса из тканей свиных почек на течение экспериментальной «индометациновой» гастропатии, следует заключить, что данный объект исследования обладает выраженным гастропротекторным действием, которое сопровождается ослаблением воспалительных процессов в СОЖ, в основе

чего, по всей видимости, лежит способность пептидного комплекса из тканей свиных почек ослаблять активность процесса свободнорадикального окисления в СОЖ. Прямым репаративным действием на ткани желудка пептидный комплекс не обладает. Совокупность выявленных эффектов обосновывает перспективу разработки на основе данного биоматериала новых гастропротекторных средств пептидной природы.

Таблица 2 – Биохимические показатели активности процесса свободнорадикального окисления в гомогенате желудка крыс

ТБРП (мкмоль)	ОПА (%)	ОАА (%)	СОД (%)	ГПО (%)	КАТ (%)
Интактные крысы					
8,0±1,05	81,9±18,4	21,6±6,89	21,9±5,35	46,6±2,73	33,4±4,13
Контрольная группа					
10,2±0,89	64,4±4,05	27,3±2,24	38,0±1,12* p <sub>инт</sub> =0,009 +74%	65,9±2,74* p <sub>инт</sub> =0,0001 +41%	35,3±0,99
Подопытная группа					
4,5±0,29* p <sub>к</sub> =0,000002 -56% p <sub>инт</sub> =0,004 -44%	60,7±3,54	23,1±2,07	25,0±1,60 p <sub>к</sub> <0,0000001 -34%	45,0±2,24 p <sub>к</sub> =0,000003 -32%	29,1±1,00

Примечание: Звездочкой обозначены статистически значимые различия между контрольной группой и интактными крысами. Подчеркнуты статистически значимые различия между подопытной группой и контрольной группой. p<sub>инт</sub> – уровень статистической значимости различия соответствующего показателя по сравнению с интактной группой. p<sub>к</sub> – уровень статистической значимости различия соответствующего показателя по сравнению с контрольной группой.

На следующем этапе работы был осуществлен драг-дизайн индивидуальных молекул олигопептидов с потенциальной гастропротекторной активностью, результаты которого представлены в таблице 3.

В ходе скрининга гастропротекторной активности (в качестве препаратов сравнения использовались омепразол, ранитидин и мизопростол) среди молекул были определены соединения-лидеры: трипептид LK-3, тетрапептид LA-4 и гексапептид LF-6. При этом наиболее выраженное терапевтическое действие проявил трипептид LK-3, эффекты которого были сопоставимы с таковыми у препарата сравнения омепразол.

Оказалось, что у крыс, получавших трипептид LK-3, макроскопически СОЖ выглядела ровной, атрофических изменений обнаружено не было. Деструктивные изменения имели невыраженный характер, они проявлялись лишь в виде мелких точечных эрозий (Таблица 4). Подобные деструктивные изменения были выявлены у всех животных. Число точечных эрозий в среднем было на 81% меньше, чем в контрольной группе (p=0,0009). Средняя глубина эрозий была меньше, чем в контрольной группе, на 85% (p<0,000001), а также на 51% меньше, чем у крыс, получавших омепразол (p=0,000007). Индекс Паулса был меньше, чем в контроле заболевания на 81%.

Толщина СОЖ по периферии эрозий была на 58% больше, чем в контрольной группе (p<0,000001). Плотность воспалительного инфильтрата была на 50% меньше, чем в контрольной группе (p<0,000001). При гистохимическом окрашивании ШИК-реактивом на нейтральные мукополисахариды столбчатый эпителий поверхностных отделов СОЖ давал хорошо выраженную реакцию. При окрашивании по Сиддмену на кислые мукополисахариды

интенсивное окрашивание выявлялось в клетках глубоких отделах желудочных ямок. В подслизистом слое отмечали явления слабо выраженного воспаления.

Таблица 3 – Химические структуры индивидуальных молекул олигопептидов с потенциальной гастропротекторной активностью, созданные посредством драг-дизайна

Наименование	Шифр молекулы
пептид Leu-Ile-Lys	LK-3
пептид Leu-Ile-Lys-Ala	LA-4
пептид Leu-Ile-Lys-Ala-Pro	LP-5
пептид Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe	LF-6
пептид Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly	LG-7
пептид Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val	LV-8
пептид Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val-Arg	LR-9

У экспериментальных животных группы тетрапептида LA-4 при макроскопическом исследовании рельеф СОЖ был, в основном, ровный, определялись единичные бугристые участки. В сравнении с животными контрольной группы повреждения были менее выражены. Среднее число эрозий оказалось на 53% меньше ( $p=0,04$ ), причем наиболее опасные полосовидные эрозии практически отсутствовали (Таблица 5). Кроме того, средняя глубина эрозий также оказалось на 80% меньше, чем в контрольной группе ( $p<0,000001$ ). Толщина СОЖ была статистически значимо больше, чем у крыс контрольной группы. В подслизистом слое отмечали явления умеренно выраженного воспаления, при этом плотность воспалительного инфильтрата была на 40% меньше, чем в контроле ( $p=0,00001$ ).

У крыс группы гексапептида LF-6 макроскопически СОЖ выглядела ровной, атрофических изменений обнаружено не было. Деструктивные изменения при воздействии данного пептида имели слабо выраженный характер, были представлены, в основном, точечными эрозиями (Таблица 6). Число повреждений было на 77% меньше, чем у животных контрольной группы ( $p=0,001$ ). По совокупности эффектов данный пептид оказал действие, близкое к эффекту препарата сравнения омепразола, число эрозий при использовании гексапептида LF-6 статистически значимо не отличалось от показателя группы омепразола. Средняя глубина эрозий оказалась достоверно меньше, чем при применении омепразола.

Противоязвенная активность трех вышеописанных соединений превышала 2 ( $ПА_{LK-3}=5,3$ ;  $ПА_{LA-4}=2,1$ ;  $ПА_{LF-6}=4,3$ ). При этом активность трипептида LK-3 по результатам макро- и микроскопического исследования была наиболее близка к эффекту препарата сравнения омепразола. Остальные олигопептиды не проявили гастропротекторной активности или даже усугубляли течение экспериментальной гастропатии (в таблицах и рисунках не представлены), поэтому в дальнейших экспериментах не рассматривались.

В следующем разделе нашей работы было изучено влияние трех соединений-лидеров на активность процессов свободнорадикального окисления в СОЖ крыс при экспериментальной «индометациновой» гастропатии.

Результаты проведенного исследования представлены в таблице 7. Оказалось, что на фоне профилактического введения трипептида LK-3 концентрация ТБРП была в 1,4 раза меньше, чем в контроле ( $p=0,0001$ ) и не отличалась от уровня интактных крыс и группы препарата сравнения  $\alpha$ -токоферола ацетата. Результаты изучения показателей антиоксидантного статуса в СОЖ группы трипептида LK-3 показали, что ОАА была в 1,5 раза больше, чем в контроле ( $p=0,00002$ ). В группе  $\alpha$ -токоферола ацетата ОАА не отличалась от уровня крыс группы трипептида LK-3.

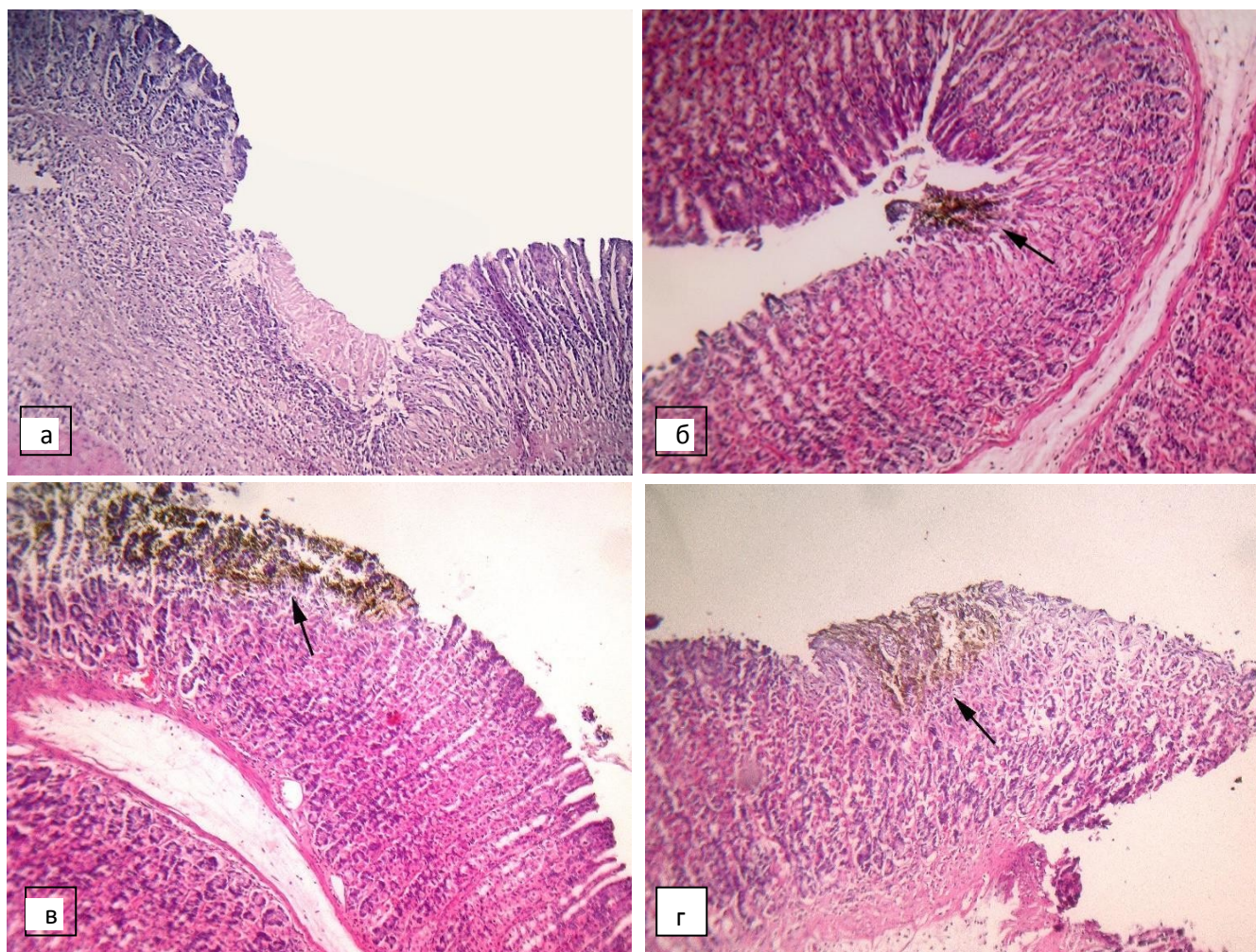


Рисунок 4 – Сравнение гистологической картины «индометациновой» гастропатии в желудках крыс контрольной группы, группы трипептида LK-3, группы тетрапептида LA-4 и группы гексапептида LF-6

Примечание: 1а – глубокая полосовидная эрозия в СОЖ крыс контрольной группы, 1б – точечная эрозия с небольшим отложением солянокислого гематина в слизистой оболочке желудка у крыс группы трипептида LK-3, 1в – точечная эрозия с небольшим отложением солянокислого гематина в слизистой оболочке желудка у крыс группы тетрапептида LA-4, 1г – точечная поверхностная эрозия со слабым отложением солянокислого гематина в слизистой оболочке желудка у крыс группы гексапептида LF-6. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 100.

Таблица 4 – Макро- и микроскопические показатели структуры слизистой оболочки желудка у крыс при применении трипептида ЛК-3в условиях экспериментальной индометациновой гастропатии

	Контрольная группа	Группа трипептида ЛК-3	Группа омепразола	Группа ранитидина	Группа мизопростола
Среднее число повреждений СОЖ	9,6±1,70	1,8±0,25 p <sub>к</sub> =0,0009 -81%	1,4±0,40 p <sub>к</sub> =0,0003 -85%	11,4±2,80 p <sub>п</sub> =0,004 +533%	14,6±2,80 p <sub>п</sub> =0,0005 +711%
Среднее число полосовидных эрозий	4,8±0,90	0 p <sub>к</sub> =0,0001 -100%	0 p <sub>к</sub> =0,0001 -100%	6,5±2,20 p <sub>п</sub> =0,01	8,0±2,10 p <sub>п</sub> =0,002
Процент поражения полосовидными эрозиями (%)	100	0	0	45,6	42,5
Среднее число точечных эрозий	4,6±1,40	1,8±0,25	1,4±0,40 p <sub>к</sub> =0,04 -70%	6,2±1,60 p <sub>п</sub> =0,02 +244%	9,2±1,70 p <sub>п</sub> =0,0008 +411%
Процент поражения точечными эрозиями (%)	100	100	100	54,4	57,5
Общий индекс Паулса	9,6	1,8 -81%	1,4 -85%	11,4 +19%	14,6 +52%

Продолжение Таблицы 4

Индекс Паулса полосовидных эрозий	4,8	0 -100%	0 -100%	5,2 -78%	6,4 -73%
Индекс Паулса для точечных эрозий	4,6	1,8 -61%	1,4 -92%	6,2 -63%	9,2 -45%
Средняя толщина СОЖ (мкм)	335,6±12,40	529,5±25,40 p <sub>к</sub> <0,000001 +58%	609,7±13,70 p <sub>к</sub> <0,000001 +82% p <sub>п</sub> =0,02 +15%	496,1±25,20 p <sub>к</sub> =0,00007 +48%	391,5±10,70 p <sub>к</sub> =0,005 +17% p <sub>п</sub> =0,0002 -26%
Средняя глубина эрозий (мкм)	385,8±23,70	56,7±6,40 p <sub>к</sub> <0,000001 -85%	115,8±5,20 p <sub>к</sub> <0,000001 -70% p <sub>п</sub> =0,000007 +104%	283,9±17,00 p <sub>к</sub> =0,004 -26,4% p <sub>п</sub> <0,000001 +401%	321,9±20,60 p <sub>п</sub> <0,000001 +468%
Средняя плотность воспалительного инфильтрата в 1 мм <sup>2</sup> СОЖ	1333,3±70,50	673,3±33,30 p <sub>к</sub> <0,000001 -50%	1040,0±211,70	1520,0±122,20 p <sub>п</sub> =0,00002 +126%	2106,7±70,50 p <sub>к</sub> =0,000003 +58% p <sub>п</sub> <0,000001 +213%

Примечание: p<sub>к</sub> – уровень статистической значимости различия соответствующего показателя по сравнению с контрольной группой. p<sub>п</sub> – уровень статистической значимости различия соответствующего показателя по сравнению с группой трипептида LK-3.



Таблица 5 – Макро- и микроскопические показатели структуры слизистой оболочки желудка у крыс при применении тетрапептида LA-4 в условиях экспериментальной индометациновой гастропатии

	Контрольная группа	Группа тетрапептида LA-4	Группа омепразола	Группа ранитидина	Группа мизопростола
Среднее число повреждений СОЖ	9,6±1,70	4,5±1,50 p <sub>к</sub> =0,04 -53%	1,4±0,40 p <sub>к</sub> =0,0003 -85%	11,4±2,80 p <sub>п</sub> =0,046 +153%	14,6±2,80 p <sub>п</sub> =0,006 +224%
Среднее число полосовидных эрозий	4,8±0,90	0,25±0,20 p <sub>к</sub> =0,0002 -95%	0 p <sub>к</sub> =0,0001 -100%	6,5±2,20 p <sub>п</sub> =0,01 +2500%	8,0±2,10 p <sub>п</sub> =0,002 +3100%
Процент поражения полосовидными эрозиями (%)	100	25	0	45,6	42,5
Среднее число точечных эрозий	4,6±1,40	4,25±1,30	1,4±0,40 p <sub>к</sub> =0,04 -70%	6,2±1,60	9,2±1,70 p <sub>п</sub> =0,04 +116%
Процент поражения точечными эрозиями (%)	100	100	100	54,4	57,5
Общий индекс Паулса	9,6	4,5 -53%	1,4 -85%	11,4 +19%	14,6 +52%

Продолжение Таблицы 5

Индекс Паулса полосовидных эрозий	4,8	0,06 -99%	0 -100%	5,2 -78%	6,4 -73%
Индекс Паулса для точечных эрозий	4,6	4,25 -8%	1,4 -92%	6,2 -63%	9,2 -45%
Средняя толщина СОЖ (мкм)	335,6±12,40	553,7±18,80 p <sub>к</sub> <0,000001 +65%	609,7±13,70 p <sub>к</sub> <0,000001 +82% p <sub>п</sub> =0,03 +10%	496,1±25,20 p <sub>к</sub> =0,00007 +48%	391,5±10,70 p <sub>к</sub> =0,005 +17% p <sub>п</sub> =0,000002 -29%
Средняя глубина эрозий (мкм)	385,8±23,70	78,5±150 p <sub>к</sub> <0,000001 -80%	115,8±5,20 p <sub>к</sub> <0,000001 -70% p <sub>п</sub> =0,03 +47.5%	283,9±17,00 p <sub>к</sub> =0,004 -26.4% p <sub>п</sub> <0,000001 +262%	321,9±20,60 p <sub>к</sub> <0,000001 +310%
Средняя плотность воспалительного инфильтрата в 1 мм <sup>2</sup> СОЖ	1333,3±70,50	800±46,20 p <sub>к</sub> =0,00001 -40%	1040,0±211,70	1520,0±122,20 p <sub>п</sub> =0,00005 +90%	2106,7±70,50 p <sub>к</sub> =0,000003 +58% p <sub>п</sub> <0,000001 +163%

Примечание: p<sub>к</sub> – уровень статистической значимости различия соответствующего показателя по сравнению с контрольной группой. p<sub>п</sub> – уровень статистической значимости различия соответствующего показателя по сравнению с группой тетрапептида LA-4

Таблица 6 – Макро- и микроскопические показатели структуры слизистой оболочки желудка у крыс при применении гексапептида LF-6 в условиях экспериментальной индометациновой гастропатии

	Контрольная группа	Группа гексапептида LF-6	Группа омепразола	Группа ранитидина	Группа мизопростола
Среднее число повреждений СОЖ	9,6±1,70	2,25±0,60 p <sub>к</sub> =0,001 -77%	1,4±0,40 p <sub>к</sub> =0,0003 -85%	11,4±2,80 p <sub>п</sub> =0,006 +407%	14,6±2,80 p <sub>п</sub> =0,0006 +549%
Среднее число полосовидных эрозий	4,8±0,90	0,25±0,20 p <sub>к</sub> =0,0002 -95%	0 p <sub>к</sub> =0,0001 -100%	6,5±2,20 p <sub>п</sub> =0,01 +2500%	8,0±2,10 p <sub>п</sub> =0,002 +3100%
Процент поражения полосовидными эрозиями (%)	100	25	0	45,6	42,5
Среднее число точечных эрозий	4,6±1,40	2,0±0,40	1,4±0,40 p <sub>к</sub> =0,04 -70%	6,2±1,60 p <sub>п</sub> =0,02 +210%	9,2±1,70 p <sub>п</sub> =0,0009 +360%
Процент поражения точечными эрозиями (%)	100	100	100	54,4	57,5
Общий индекс Паулса	9,6	2,25 -77%	1,4 -85%	11,4 +19%	14,6 +52%

Продолжение Таблицы 6

Индекс Паулса полосовидных эрозий	4,8	0,06 -99%	0 -100%	5,2 -78%	6,4 -73%
Индекс Паулса для точечных эрозий	4,6	2 -57%	1,4 -92%	6,2 -63%	9,2 -45%
Средняя толщина СОЖ (мкм)	335,6±12,40	476±9,70 p <sub>к</sub> <0,000001 +34%	609,7±13,70 p <sub>к</sub> <0,000001 +82% p <sub>п</sub> =0,000001 +28%	496,1±25,20 p <sub>к</sub> =0,000007 +48%	391,5±10,70 p <sub>к</sub> =0,005 +17% p <sub>п</sub> =0,000003 -18%
Средняя глубина эрозий (мкм)	385,8±23,70	94,8±5,60 p <sub>к</sub> <0,000001 -75%	115,8±5,20 p <sub>к</sub> <0,000001 -70% 720±46,20 p <sub>п</sub> =0,000003 -46%	283,9±17,00 p <sub>к</sub> =0,004 -26% p <sub>п</sub> <0,000001 +199%	321,9±20,60 p <sub>п</sub> <0,000001 +240%
Средняя плотность воспалительного инфильтрата в 1 мм <sup>2</sup> СОЖ	1333,3±70,50	720±46,20 p <sub>к</sub> =0,000003 -46%	1040,0±211,70	1520,0±122,20 p <sub>п</sub> =0,00002 +111%	2106,7±70,50 p <sub>к</sub> =0,000003 +58% p <sub>п</sub> <0,000001 +193%

Примечание: p<sub>к</sub> – уровень статистической значимости различия соответствующего показателя по сравнению с контрольной группой. p<sub>п</sub> – уровень статистической значимости различия соответствующего показателя по сравнению с группой гексапептида LF-6

Активность ГПО на фоне применения трипептида LK-3 была в 2,5 раза меньше, чем в контроле ( $p=0,00002$ ), и уступала даже уровню интактных крыс в 1,8 раза ( $p=0,0004$ ). Активность ГПО в группе  $\alpha$ -токоферола ацетата была меньше, чем в контроле заболевания в 1,8 раза ( $p=0,000001$ ), и уровня интактных крыс – в 1,3 раза. При этом она превышала уровень группы трипептида LK-3 в 1,4 раза ( $p=0,002$ ). Аналогичная в целом сравнительная картина характеризовала активность двух других антиоксидантных ферментов – КАТ и СОД. В группе трипептида активность КАТ LK-3 была меньше, чем в контроле заболевания, в 3,0 раза ( $p=0,00002$ ), а в группе  $\alpha$ -токоферола ацетата – в 2,3 раза ( $p<0,0000001$ ). Активность СОД после применения трипептида LK-3 уступала уровню контрольной группы в 4,7 раза ( $p=0,00005$ ), а после применения  $\alpha$ -токоферола ацетата она уступала уровню контрольной группы 3,5 раза ( $p<0,000001$ ).

На этом фоне при применении тетрапептида LA-4 и гексапептида LF-6 наблюдалась иная картина активности процессов СРО (Таблица 7). Проведенные эксперименты показали, что в характере влияния пептидов LA-4 и LF-6 на активность процесса СРО в СОЖ крыс с экспериментальной «индометациновой» гастропатией отчетливо прослеживается их прооксидантная активность. Об этом в первую очередь свидетельствует значительный рост концентрации ТБРП даже по сравнению с контрольной группой, что может свидетельствовать об усилении перекисного окисления мембранных фосфолипидов, а также низкий уровень ОАА, идентичный контрольной группе. В совокупности это указывает на то, что данные пептиды, вероятнее всего, подавляют ферментный компонент антиоксидантной защиты клеток желудка, усиливая генерацию активных форм кислорода, которые вызывают выраженное окисление мембранных фосфолипидов.

Таблица 7 – Сравнительная оценка влияния олигопептидов LK-3, LA-4 и LF-6 и препаратов сравнения  $\alpha$ -токоферола ацетата и омепразола на показатели про- и антиоксидантного статусов в СОЖ крыс при экспериментальной «индометациновой гастропатии»

Показатель	Контроль	Трипептид Leu-Ile-Lys	Тетрапептид Leu-Ile-Lys- Ala	Гексапептид Leu-Ile-Lys- Ala-Pro-Phe	$\alpha$ - токоферола ацетат	Омепразол
ТБРП (мкмоль /мг)	10,2 (9,4;11,3)	7,1 (6,4;8,2) $p_k=0,001$	16,6 (15,2;18,2) $p_k=0,00002$	20,6 (19,2;23,1) $p_k=0,00002$	4,8 (3,6;5,6) $p_k=0,0002$	2,8 (2,1;3,3) $p_k=0,000001$
ОПА %	64,7 (61,6;68,5)	74,5 (69,6;77,9) $p_k=0,026$	68,8 (65,5;70,6)	83,6 (82,2;86,6) $p_k=0,00002$	46,3 (40,5;56,5) $p_k=0,0002$	84,6 (82,0;88,1) $p_k=0,001$
ОАА %	26,8 (24,5;29,2)	40,6 (37,9;45,1) $p_k=0,00002$	21,6 (17,3;24,6)	20,5 (19,0;25,6)	36,0 (32,6;39,0) $p_k=0,000001$	46,4 (40,9;49,0) $p_k<0,000001$
ГПО %	66,4 (59,8;71,4)	26,7 (13,5;22,2) $p_k=0,00002$	19,8 (13,5;22,2) $p_k=0,00002$	17,1 (15,7;21,4) $p_k<0,000001$	37,9 (25,8;54,9) $p_k=0,000001$	11,6 (6,5;11,3) $p_k<0,000001$
КАТ %	35,8 (34,0;36,8)	11,9 (9,9;12,7) $p_k=0,00002$	10,7 (8,4;12,2) $p_k=0,00002$	7,9 (7,5;13,4) $p_k=0,00005$	15,5 (11,6;18,5) $p_k=0,00002$	7,4 (4,9;10,8) $p_k<0,000001$
СОД %	38,2 (36,5;38,9)	8,1 (6,4;9,9) $p_k=0,00005$	2,7 (1,7;3,4) $p_k<0,000001$	12,6 (10,3;14,7) $p_k=0,0001$	10,9 (6,7;16,5) $p_k<0,000001$	15,3 (13,0;16,1) $p_k<0,000001$

Примечание:  $p_k$  – уровень статистической значимости по сравнению с контролем заболевания  
Данные приведены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (25%;75%).

Таким образом, суммируя, отметим, что, согласно полученным результатам, трипептид LK-3 в условиях индометацинового повреждения СОЖ проявил выраженные антиоксидантные свойства прямого антиоксиданта, сопоставимые с таковыми у препаратов сравнения  $\alpha$ -токоферола ацетата и омега-3. При этом пептиды LA-4 и LF-6, напротив, в большей степени проявили свойства прооксидантов. В совокупности это позволяет обоснованно полагать, что прямой антиоксидантный эффект вносит существенный вклад в гастропротекторный эффект трипептида LK-3. Учитывая свойства аминокислот, входящих в состав исследуемого трипептида, снижение окислительного стресса может достигаться за счет механизмов: связывание свободных радикалов (наличие концевой лизина), хелатирования ионов металлов, имеющих потенциальную повреждающую активность за счет аминогруппы концевой лизина, усиления этих свойств в липидной мембране клеток за счет гидрофобных свойств лейцина и изолейцина.

На заключительном этапе нашего исследования мы решили изучить влияние трипептида LK-3, как соединения-лидера, на уровень содержания в СОЖ крыс циклооксигеназ. Это было необходимо, чтобы проверить, влияет ли изучаемый пептид на ЦОГ-ассоциированные процессы воспаления в желудке, и сопоставить полученные результаты с таковыми для пептидного комплекса из тканей свиных почек, являвшийся исходным материалом для разработки гастропротекторных пептидов. В результате проведенных экспериментов была получена следующая картина (Рисунок 5). Оказалось, что концентрация ЦОГ-1 в гомогенате желудков крыс не имела статистически значимых различий между контрольной группой и группой трипептида LK-3:  $5,4 \pm 0,26$  и  $7,5 \pm 1,09$  нг/мл соответственно. На этом фоне концентрация ЦОГ-2, у интактных крыс составившая  $3,1 \pm 0,18$  нг/мл, у крыс контрольной группы уменьшилась в 1,2 раза и составила  $2,5 \pm 0,12$  нг/мл ( $p=0,016$ ). При этом в группе трипептида LK-3 концентрация ЦОГ-2 составила  $1,1 \pm 0,05$  нг/мл, что было ниже уровня крыс контрольной группы в 2,3 раза ( $p < 0,00001$ ), а также в 2,8 раза уступало уровню у интактных крыс ( $p < 0,00001$ ).

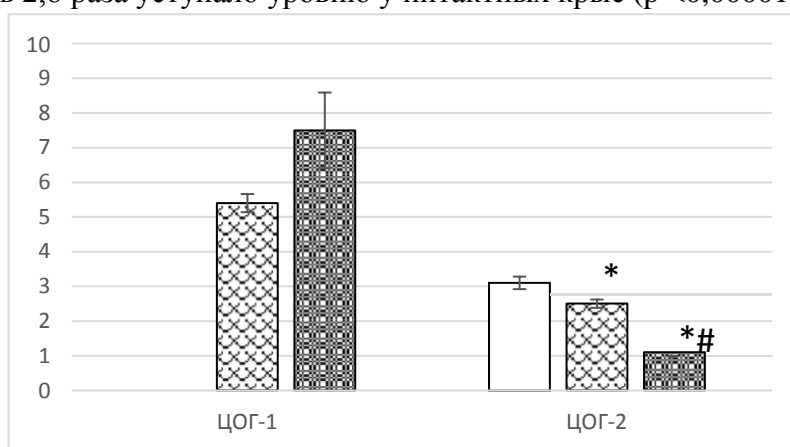


Рисунок 5 – Показатели концентрации ЦОГ-1,2 в гомогенате желудков интактных крыс, крыс контрольной группы и группы трипептида LK-3

Примечание: По горизонтальной оси – название изоформы ЦОГ. По вертикальной оси – значение показателя концентрации ЦОГ-1,2 в нг/мл. □ – интактные крысы, ▨ – контрольная группа, ▩ – группа трипептида LK-3.

Значения представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего. Звездочкой обозначены статистически значимые различия в контрольной группе по сравнению с интактными крысами. Знаком # обозначены статистически значимые различия в группе трипептида LK-3 по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что под влиянием трипептида LK-3 происходит ослабление ЦОГ-2-ассоциированных воспалительных процессов в желудках крыс с экспериментальной «индометациновой» гастропатией, что, по-видимому, могло объясняться выявленной ранее антиоксидантной активностью трипептида.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования изучено влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек в отношении экспериментальной «индометациновой» гастропатии. Установлено, что данный комплекс обладает выраженным гастропротекторным действием, ослабляя активность свободнорадикального окисления и воспалительные процессы в СОЖ.

На основе данных об аминокислотном составе пептидного комплекса осуществлен драг-дизайн 7 молекул индивидуальных олигопептидов с потенциальным гастропротекторным действием. По результатам скрининга фармакологического эффекта установлено, что противовоспалительную активность проявили 3 из 7 изучаемых пептидов: LK-3, LA-4 и LF-6. Наиболее выраженным гастропротекторным эффектом обладал трипептид LK-3. Это действие было сопоставимо с препаратом сравнения омепразол.

Изучение влияния пептидов LK-3, LA-4 и LF-6 на активность свободнорадикального окисления показало, что трипептид LK-3 обладает выраженным прямым антиоксидантным эффектом. Пептиды LA-4 и LF-6 в большей степени проявили прооксидантные свойства.

Установлено, что трипептид LK-3 существенно снижает концентрацию ЦОГ-2 в СОЖ при «индометациновой» язве, что указывает на ослабление воспалительных процессов. В основе данного эффекта, наиболее вероятно, лежит антиоксидантный эффект трипептида LK-3.

## ВЫВОДЫ

1. Профилактическое семидневное введение пептидного комплекса из тканей свиных почек на модели «индометациновой» гастропатии у крыс сопровождается гастропротекторным действием, которое характеризуется снижением количества полосовидных эрозий на 54%, уменьшением их глубины на 46%, и увеличением толщины слизистой оболочки желудка на 21%.

2. Гастропротекторное действие пептидного комплекса из тканей свиных почек сопровождается в сравнении с контрольной группой снижением активности в слизистой оболочке желудка провоспалительного фермента ЦОГ-2 на 28%, ослаблением активности процесса свободнорадикального окисления, которое выражается в снижении накопления в слизистой тиобарбитурат-реактивных продуктов на 56%, снижением активности ферментов СОД и ГПО на 32% и 34% соответственно, и снижением биосинтетической активности эпителиоцитов желудка, выражающимся в снижении числа ядрышек на ядро на 59%, площади аргирофильных гранул на 62%. Это свидетельствует о том, что пептидный комплекс ослабляет воспаление посредством ингибирования оксидативного стресса, но не обладает прямым репаративным действием на ткани желудка.

3. Скрининг гастропротекторной активности у 7-и индивидуальных олигопептидов показал ее наличие у соединений Leu-Ile-Lys, Leu-Ile-Lys-Ala и Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe. (Индекс противовоспалительной активности 5,3; 2,1; 4,3 соответственно). Пептид Leu-Ile-Lys обладает наиболее выраженной активностью, которая по силе сопоставима с омепразолом.

4. Пептид Leu-Ile-Lys обладает выраженной антиоксидантной активностью при «индометациновой» гастропатии у крыс, сопоставимой с прямым антиоксидантом  $\alpha$ -токоферола ацетатом. Эта активность выражается в снижении по сравнению с контрольной группой концентрации тиобарбитурат-реактивных продуктов в 2,1 раза, повышением общей антиоксидантной активности в 1,5 раза, снижением активности антиоксидантных ферментов СОД, ГПО и КАТ в 4,7, 2,5 и 3 раза соответственно. При этом пептиды Leu-Ile-Lys-Ala и Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe не проявили свойства антиоксидантов.

5. Пептид Leu-Ile-Lys обладает противовоспалительным действием в условиях индометацин-индуцированного повреждения слизистой желудка, о чем свидетельствует ослабление активности провоспалительного фермента ЦОГ-2 в 2,3 раза по сравнению с уровнем крыс контрольной группы. Наиболее вероятным механизмом противовоспалительной активности является антиоксидантное действие пептида Leu-Ile-Lys.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лоренц, С.Э. Гастропротекторное действие пептидного комплекса из тканей свиных почек при экспериментальной "индометациновой" язве у крыс / С. Э. Лоренц, А. Ю. Жариков, И. П. Бобров [и др.]. // **Сибирский научный медицинский журнал**. – 2017. – Т. 37, № 6. – С. 5-9.
2. Лоренц, С. Э. Оценка морфофункциональной активности ядрышковых организаторов в клетках слизистой оболочки желудка крыс на фоне фармакологической коррекции "индометациновой" язвы пептидным комплексом из тканей свиных почек / С. Э. Лоренц, А. Ю. Жариков, И. П. Бобров [и др.]. // **Бюллетень медицинской науки**. – 2018. – № 1(9). – С. 38-41.
3. Лоренц, С. Э. Влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек на показатели свободнорадикального окисления и экспрессию ЦОГ-1,2 при индометацин-индуцированной гастропатии / С. Э. Лоренц, А. Ю. Жариков, И. П. Бобров [и др.]. // **Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология**. – 2018. – № 6 (154). – С. 81-85
4. Лоренц, С. Э. Сравнительная морфофункциональная оценка гастропротекторной активности пептидного комплекса из тканей свиных почек, омепразола, ранитидина и мизопростола при «индометациновой» язве желудка у крыс / С. Э. Лоренц, А. Ю. Жариков, И. П. Бобров [и др.]. // **Бюллетень медицинской науки**. – 2018. – №4(12). – С. 24-29
5. Lorentz, S.E. Pharmacologically active tripeptide Leu-Phe-Lys in indomethacin-induced gastric ulcer / S. E. Lorentz, A. Yu. Zharikov, I. P. Bobrov [et al.]. // **International Journal of Biomedicine**. – 2018. – Т.8, № 4. – С. 351-354.
6. Лоренц, С.Э. Влияние трипептида Leu-Phe-Lys на активность свободнорадикального окисления и уровень экспрессии циклооксигеназы-1 и -2 в слизистой оболочке желудка при экспериментальной индометациновой язве крыс / С. Э. Лоренц, О. Н. Мазко, О. Г. Макарова, [и др.]. // **Казанский медицинский журнал**. – 2019. – Т. 100, № 3. – С. 439-444.
7. Жариков, А.Ю. Поиск новых молекул олигопептидов для фармакологической коррекции НПВС-индуцированной язвы желудка / А. Ю. Жариков, С. Э. Лоренц, И. П. Бобров [и др.]. // **Биомедицина**. – 2019. – №3. – С. 90-97

### ПОЛУЧЕННЫЕ ПАТЕНТЫ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ (RU)

1. Патент № 2687561 Российская Федерация. МПК А61К 38/02(2006.01) А61Р 1/04(2006.01). Средство для лечения язвенной болезни желудка / А.Ю. Жариков, С.Э. Лоренц; заявитель и патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – заявка №2018109631; 19.03.2018; опубл. 15.05.2019, Бюл. № 14
2. Патент № 2688187 Российская Федерация. МПК А61К 38/06(2006.01) А61Р 1/04(2006.01) Фармакологическое средство для лечения язвенной болезни желудка / А.Ю. Жариков, С.Э. Лоренц, И.П. Бобров, О.Н. Мазко, О.Г. Макарова; патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – заявка №2018127226; 24.07.2018; опубл. 21.05.2019, Бюл № 15

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

НПВП – нестероидный противовоспалительный препарат  
 ЖКТ – желудочно-кишечный тракт  
 СОЖ – слизистая оболочка желудка  
 ЦОГ – циклооксигеназа  
 ТБРП – тиобарбитуратреактивные продукты  
 ОПА – общая прооксидантная активность  
 ГПО – глутатионпероксидаза  
 СОД – супероксиддисмутаза