

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

ЛОРЕНЦ САМИРА ЭЛЬШАДОВНА

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

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
доцент А.Ю. Жариков

Барнаул – 2020 г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1 Защитные факторы слизистой оболочки желудка .....	13
1.1.1 Общие механизмы защиты .....	13
1.1.2 Роль оксида азота .....	14
1.1.3 Роль простагландинов .....	15
1.1.4 Роль пептидов в регуляции функций желудка .....	18
1.2 Патогенетические механизмы НПВП-индуцированной гастропатии ....	22
1.2.1 Циклооксигеназный путь .....	23
1.2.2 Роль оксидативного повреждения в развитии гастропатий. Нарушение митохондриального метаболизма .....	24
1.2.3 Аутофагия как механизм гибели клеток под действием индометацина	25
1.2.4 Другие механизмы повреждающего действия .....	27
1.3 Лекарственные средства, используемые для коррекции НПВП- индуцированных гастропатий .....	29
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	33
2.1 Экспериментальные животные и условия эксперимента .....	33
2.1.1 Моделирование индометацин-индуцированной гастропатии и схема введения объектов исследования и препаратов сравнения .....	33
2.1.2 Распределение животных по экспериментальным группам .....	34
2.2 Характеристика объектов исследования .....	38
2.2.1 Пептидный комплекс из тканей свиных почек .....	38
2.2.2 Олигопептидные соединения .....	39
2.2.3 Препараты сравнения: омепразол, ранитидин, мизопростол, $\alpha$ -токоферола ацетат .....	40
2.2.4 Дозы объектов исследования .....	41
2.3 Методы исследования .....	42
2.3.1 Морфологическая оценка степени повреждения слизистой оболочки	

желудка .....	42
2.3.2 Определение активности ядрышковых организаторов в ткани слизистой желудка крыс .....	43
2.3.3 Определение концентрации ЦОГ-1,2 в тканях желудка крыс .....	44
2.3.4 Определение параметров оксидативного стресса в желудках крыс ...	45
2.3.4.1 Определение концентрации тиобарбитуратреактивных продуктов...	46
2.3.4.2 Определение общей прооксидантной активности .....	47
2.3.4.3 Определение общей антиоксидантной активности .....	48
2.3.4.4 Определение активности супероксиддисмутазы .....	49
2.3.4.5 Определение активности каталазы .....	50
2.3.4.6 Определение активности глутатионпероксидазы .....	51
2.3.5 Анализ аминокислотного состава пептидного комплекса из тканей свиных почек .....	52
2.4 Статистическая обработка результатов .....	53
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	54
3.1 Влияние пептидного комплекса тканей свиных почек на течение экспериментальной индометацин-индуцированной гастропатии .....	54
3.1.1 Макро- и микроскопическая оценка состояния слизистой оболочки желудка крыс при применении пептидного комплекса из тканей свиных почек на фоне экспериментальной «индометациновой» гастропатии .....	54
3.1.2 Влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек на морфофункциональную активность ядрышковых организаторов в слизистой оболочке желудка при экспериментальной «индометациновой» гастропатии.....	59
3.1.3 Влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек на уровень экспрессии ЦОГ-1,2 в слизистой оболочке желудка при экспериментальной «индометациновой» гастропатии .....	63
3.1.4 Влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек на	

активность процесса свободнорадикального окисления в слизистой оболочке желудка при экспериментальной «индометациновой» гастропатии.....	67
3.2 Определение аминокислотного состава пептидного комплекса тканей свинных почек и драг-дизайн химических структур индивидуальных олигопептидов .....	70
3.3 Скрининг гастропротекторной активности олигопептидов в условиях экспериментальной индометацин-индуцированной гастропатии .....	72
3.4 Влияние пептидов Leu-Ile-Lys, Leu-Ile-Lys-Ala, Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe на активность процесса свободнорадикального окисления в слизистой оболочке желудка при экспериментальной «индометациновой» гастропатии .....	97
3.5 Влияние трипептида Leu-Ile-Lys на активность ЦОГ-1,2 в слизистой оболочке желудка крыс.....	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	114
ВЫВОДЫ .....	123
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	126
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	154

## ВВЕДЕНИЕ

**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 [54]. 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) [131, 174]. 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 [26, 36, 171, 206].

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 [26, 56, 61, 203]. При этом установлено, что 40-50% всех острых желудочных кровотечений, потребовавших эндоскопического или хирургического вмешательства, обусловлены приемом НПВП [12, 15, 62, 120]. 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 [37, 38, 58, 73, 192].

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 ulcerогенного действия НПВП практически идентичен основному механизму противовоспалительного, жаропонижающего и анальгетического действия НПВП, заключающемуся в блокаде циклооксигеназы и нарушении синтеза простагландинов [145, 187]. Это означает, что любое медицинское применение НПВП, особенно неселективного действия на ЦОГ-1,2, может и будет сопровождаться развитием гастропатии [216, 217]. Обозначенную проблему в определенной степени удалось решить, создав НПВП, селективно ингибирующие ЦОГ-2 [238]. 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 [20, 49, 52, 53].

Ранее в нашей лаборатории были обнаружены антилитогенные свойства при экспериментальной мочекаменной болезни пептидного комплекса из тканей свиных почек [16]. 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. [63, 86, 139, 157, 176, 178]. 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 гастропатии, а значит, может являться перспективным объектом для разработки на его основе новых пептидных гастропротекторных препаратов [16].

Данная работа посвящена поиску и 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**

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 [9, 20].

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 [4].

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.

Трипептид Leu-Phe-Lys проявляет наибольшую активность, сопоставимую с активностью омепразола и превосходящую таковую для ранитидина.

3. Применение трипептида Leu-Phe-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.

**Личное участие автора.** Личное участие автора заключалось в анализе современной научной литературы, реализации экспериментальных исследований, получении и анализе первичных данных, статистической обработке результатов. Автором лично сформулированы цели и задачи исследования. Осуществлена подготовка научных публикаций по теме исследования.

## ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Защитные факторы слизистой оболочки желудка

#### 1.1.1 Общие механизмы защиты

Известно, что возникновение эрозий в слизистой оболочке желудка происходит, когда баланс между агрессивными и защитными факторами смещается в сторону агрессивных. Основными источниками повреждений СОЖ являются кислотно-пептический фактор, грубоволокнистые и агрессивные химические компоненты пищи, яды и токсичные лекарственные препараты, а также болезнетворные бактерии и продукты их жизнедеятельности (*H. pylori*, стрептококки, стафилококки, грибы рода *Candida* и др.) [57].

Механизмы защиты желудка можно разделить на три основных уровня: преэпителиальный, эпителиальный и постэпителиальный защитный механизм [85, 90].

Преэпителиальный защитный механизм состоит в основном из слизистого слоя, который содержит слизистые, бикарбонатные и поверхностно-активные фосфолипиды и предотвращает контакт эпителиальных клеток с люминальными вредными агентами, такими как желудочная кислота. Слизь представляет собой водонерастворимый гель, состоящий из гликопротеиновых полимеров, тесно прилегающих к поверхности эпителиальных клеток. В состав ее входят IgA, лизоцим, лактоферрин и другие компоненты. Слой слизи защищает слизистую оболочку желудка от физических и химических воздействий, от действия соляной кислоты и пепсина, бактерий, вирусов и их токсинов [180]. Секреция бикарбонатов уменьшает агрессивные свойства соляной кислоты и повышает уровень pH защитного слоя слизи. Слизь и бикарбонаты секретируются желудочными эпителиальными клетками (а именно поверхностными добавочными клетками). В результате pH на поверхности эпителиальных клеток

слизистой оболочки желудка обычно поддерживается в нейтральном диапазоне, когда рН просвета желудка достигает 1-2.

Сами поверхностные эпителиальные клетки служат второй линией защиты. Их плотные узловые комплексы ограничивают диффузию ионов водорода, они отвечают за секрецию слизи и бикарбоната, а также они обладают способностью мигрировать в место повреждений для восстановления поврежденного региона (реституция).

Микроциркуляция слизистой оболочки желудочного подслизистого слоя относится к важнейшим постэпителиальным механизмам защиты. Кровоток обеспечивает достаточный запас микронутриентов и кислорода для обеспечения нормальной жизнедеятельности эпителиальных клеток и достаточной секреции слизи и бикарбоната. Кроме того, защитной функцией является удаление кислотных и других токсичных побочных продуктов обмена. Облегчая удаление кислоты, повышенный микроциркуляторный кровоток предотвращает накопление вредной концентрации ионов  $H^+$  в ткани и, таким образом, ограничивает кислотное повреждение поверхности слизистой оболочки [128].

### 1.1.2 Роль оксида азота

Одним из важных постэпителиальных защитных факторов является оксид азота, (NO). NO синтезируется ферментом NO-синтазой (NOS), которая конвертирует L-аргинин в цитруллин с высвобождением оксида азота. Фермент представлен в организме в трех изоформах: эндотелиальная (eNOS), нейрональная (nNOS) и индуцибельная (iNOS) [80, 111]. eNOS и nNOS экспрессируются в нормальных условиях эндотелиальными клетками и нейронами соответственно и выполняют ряд важных поддерживающих гомеостаз функций, таких как вазопротекция, поддержание нормальной микроциркуляции, оптимизация нейротрансмиссии и поддержание нейропластичности [99].

Оксид азота путем активации гуанилатциклазы и через накопление вторичного посредника циклического гуанозинмонофосфата участвует во многих

протективных процессах в слизистой оболочке желудка: стимуляции выработки защитной слизи, ангиогенезе, регенерации поврежденных участков СОЖ [104]. Его конечные эффекты – антиагрегирующий, вазодилатирующий, противосвертывающий.

iNOS, не секретируемая в нормальных условиях, экспрессируется в большей степени макрофагами и нейтрофилами в соответствующих условиях, связанных с воспалением [229]. При высокой экспрессии iNOS или разобщении eNOS в ходе биохимических реакций вместо формы NO могут начать накапливаться активные формы азота, например, пероксинитрат ( $\text{ONOO}^-$ ) [113]. Это очень активный окислительный радикал, который участвует в модификации липидов, повреждает ДНК, подавляет функции ферментов и т.п. [169]. Образование активных форм азота является нежелательной реакцией и может закреплять патологические механизмы при изъязвлении.

Повреждающее действие агрессивных факторов в разной степени ослабляет эффективность вышеперечисленных защитных механизмов, поэтому достаточное понимание их роли важно для определения патогенетических механизмов развития гастропатий. В частности, именно под воздействием лекарственных препаратов и продуктов жизнедеятельности микроорганизмов может снижаться активность работы защитных факторов, и в этом случае регенерация слизистой становится недостаточной, развиваются эрозивные повреждения.

### **1.1.3 Роль простагландинов**

Впервые защитная роль простагландинов (PG) в слизистой оболочке желудка была показана Robert et al. В 1979 году. Ученые обнаружили защитный эффект простагландина  $E_2$  в слизистой оболочке желудка крыс при гастропатиях, индуцированных различными токсикантами [183]. Так, ими была предложена концепция «цитопротекции», которая подразумевала защиту клеток слизистой от повреждения без существенного снижения секреции кислоты.

Обмен простагландинов в клетках слизистой оболочки желудка последовательно катализируется несколькими ферментами. Первый этап синтеза из арахидоновой кислоты происходит под действием так называемой  $\text{PGH}_2$ -синтазы, имеющей два каталитических центра: циклооксигеназу и пероксидазу.

Известно, что циклооксигеназа существует в двух изоформах ЦОГ-1 и ЦОГ-2. Хотя обе изоформы катализируют одни и те же реакции, ЦОГ-1 является конститутивным ферментом в большинстве клеток: он синтезируется и активен в базальном состоянии. Уровень активности ЦОГ-1 не меняется значительно в процессе роста и развития клеток. В то же время, ЦОГ-2 обычно присутствует в тканях в незначительных количествах и индуцируется цитокинами, факторами роста и другими стимуляторами во время воспалительной реакции [78, 170]. В некоторой мере, эйкозаноиды, продуцируемые ЦОГ-1, участвует в осуществлении базисных функций, таких как секреция слизи для защиты слизистой оболочки желудка, гемостаз и поддержание функции почек, в то время как синтезируемые ЦОГ-2 приводят к воспалительным и другим патологическим изменениям [219]. Однако разделение изоформ ЦОГ на «физиологическую» и «патологическую» не совсем корректно, оба этих фермента могут участвовать в защитных функциях организма. Так, ЦОГ-1 в основном отвечает за выработку конститутивных эндогенных ПГ, участвующих в защите слизистой оболочки, тогда как ЦОГ-2 в основном отвечает за те, которые участвуют в заживлении уже появившихся язв желудка или тонкой кишки [212-215].

Циклооксигеназы катализируют превращение арахидоновой кислоты в нестабильное соединение  $\text{PGG}_2$ , который впоследствии конвертируется пероксидазой в  $\text{PGH}_2$ . Затем под действием ряда  $\text{PG}$ -метаболизирующих ферментов (синтетаз) исходное соединение превращается в  $\text{PGE}_2$ , 6-кето  $\text{PGF}_{1\alpha}$ , тромбосан  $\text{B}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  и  $\text{PGD}_2$ .

Ключевую роль в поддержании целостности слизистой оболочки играет  $\text{PGE}_2$ . Его функциональная активность опосредуется через рецепторы, связанные с G-белком, которые подразделяется на 4 специфических подтипа:  $\text{EP}_1$ - $\text{EP}_4$ , и их распределение объясняет множественные эффекты этого простаноида.



Стимуляция EP1 рецепторов, связанных с Gq-белком, вызывает активацию фосфолипазы C (PLC $\beta$ ) с последующим накоплением инозитол-трифосфата (IP3) и диацилглицерола (DAG). Эти вторичные посредники высвобождают ионы кальция в цитозоль, что приводит к активирующим эффектам. EP2, EP4 рецепторы, будучи связанными с Gs-белком, активируют аденилатциклазу, которая отвечает за накопление другого вторичного мессенджера – цАМФ, который через цАМФ-зависимую протеинкиназу А осуществляет релаксирующие эффекты. EP3 рецепторы, связанные с Gi - белком, ингибируют аденилатциклазу, осуществляя противоположные эффекты.

Эндогенные простагландины играют роль в регуляции различных функций желудка, таких как секреция кислоты и гастрин, секреция слизи и бикарбоната, кровоснабжение и поддержание целостности слизистой оболочки, что способствует цитопротекции желудка [164]. Согласно исследованиям, PGE2 ингибирует секрецию кислоты через рецепторы EP3 и увеличивает секрецию слизи и бикарбоната в желудке через рецепторы EP4 и EP1 [148, 178, 182, 184, 189, 209]. При холодовом стрессе, а также ишемии, сопровождающейся реперфузией, цитопротекция обусловлена в основном PGI2 через рецепторы IP и частично EP4. PGI2 поддерживает микроциркуляцию в слизистой оболочке, а также менее эффективно, чем PGE2 снижает желудочную секрецию кислоты и гастрин.

PGE2 также проявляет защитный эффект против вызванного кислотой повреждения двенадцатиперстной кишки и индуцированных индометацином поражений тонкой кишки, через стимуляцию рецепторов EP3 / EP4. Эти эффекты в желудке и двенадцатиперстной кишке функционально связаны с ингибированием желудочного сокращения (EP1), стимуляцией дуоденальной секреции HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(EP3/EP4) и подавлением бактериальной инвазии вследствие ингибирования кишечной моторики (EP4), а также стимуляцией секреции слизи (EP3/EP4). Кроме того, PGE2 проявляет заживляющее действие на эрозии желудка и тонкой кишки посредством повышенной экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и стимуляции ангиогенеза через активацию

рецепторов EP4. Важно, что именно рецепторам EP1 и их регуляции тонуса мускулатуры желудка, по современным представлениям, отводится лидирующая роль в протекторной функции простагландинов [207].

Очень важной частью защитного действия простагландинов является их эффективность в отношении тонуса и проницаемости сосудов. В частности, мощным вазодилататором и антиагрегантом является простациклин (PGI<sub>2</sub>). Простациклин снижает содержание ионов кальция в клетках путем накопления вторичного мессенжера – циклического аденозинмонофосфата. Вазодилатирующим эффектом обладает и PGE<sub>2</sub>, а PGF<sub>2α</sub> отвечает в большей мере за вазоконстрикцию крупных сосудов и дилатацию мелких [35, 60, 219]. В целом, баланс процессов вазоконстрикции и вазодилатации поддерживает нормальную микроциркуляцию слизистой, обеспечивая достаточную скорость регенерации эпителия, тем самым выполняя протекторную функцию.

В целом, простагландины играют ключевую роль в защите эпителия желудка, усиливая преэпителиальные, эпителиальные, постэпителиальные защитные механизмы: регулируют секрецию бикарбоната и слизи, ингибируют секрецию желудочной кислоты и играют важную роль в поддержании регенерации эпителиальных клеток и кровотока слизистой оболочки [160]. Именно поэтому препараты, способные ингибировать их синтез проявляют столь высокую токсичность в отношении СОЖ.

#### **1.1.4 Роль пептидов в регуляции функций желудка**

Помимо вышперечисленных факторов, в регуляции секреторной и моторной функции желудка принимают участие ряд эндогенных пептидов, эффекты которых могут быть заимствованы для создания лекарственных препаратов для защиты желудка пептидной природы.

На данный момент накоплено немало данных об участии нейрорегуляторных пептидов в протекции желудка. Вводимые центрально и/или периферически нейропептиды, такие как амилин, адреномедуллин, бомбезин,

холецистокинин, нейротензин, опиоидные пептиды, тиреотропин-рилизинг-гормон и вазоактивный кишечный пептид, влияют как на секрецию кислоты, так и на поражения слизистой оболочки желудка, вызванные различными ульцерогенами [115].

Иммуногистохимическими методами в составе афферентных нейронов было обнаружено большое число нейропептидов, которые транспортируются не только в центральном, но и в периферическом направлении (антидромно), а также способны накапливаться и храниться в везикулах в чувствительных нервных терминалях и локально выделяться экзоцитозом при стимуляции чувствительных терминалей разными химическими и физическими факторами. То есть, афферентные нейроны также имеют эфферентоподобную функцию в желудочно-кишечном тракте, и нейропептиды, высвобождаемые из периферических нервных окончаний первичных афферентных нейронов, могут вызывать защиту слизистой оболочки желудка. В частности, капсаицин-чувствительные волокна, стимуляция которых неоднократно продемонстрировала протекторное действие в желудке на фоне приема НПВП, секретируют нейропептиды – тахикины и кальцитонинген-родственный пептид (CGRP) [71, 81, 125, 126, 206].

CGRP является характерным примером нейропептида, обладающего широким спектром действия и всеми отличительными особенностями, которые дают право причислить его к разряду пептидных регуляторов [2]. Данный нейропептид является одним из мощных вазодилататоров, механизм которого опосредован участием простагландинов и оксида азота [46, 75, 206]. При этом есть данные о том, что CGRP повышает резистентность слизистой оболочки желудка, защищая эндотелий сосудов от повреждений, а не вызывая вазодилатацию [154].

Кроме CGRP капсаицин-чувствительные нейроны секретируют пептиды семейства тахекинов – субстанцию Р и др. Эти вещества также принимают участие в регуляции функций желудка, в основном опосредуя свои эффекты так же, как и CGRP [45, 127].

По некоторым данным, CGRP является основным передатчиком, с помощью которого афферентные нервные волокна в слизистой оболочке желудка подавляют выделение кислоты. Этот вывод сделан в соответствии с высокой способностью пептида ингибировать секрецию кислоты у крыс и собак через активацию CGRP<sub>1</sub> рецепторов [94, 138, 149]. Кроме того, CGRP и другие афферентные нейропептиды принимают участие в патофизиологической регуляции моторной активности желудка [129]. Таким образом, данная группа регуляторов оказывает многогранное действие на функции желудка и поэтому обеспечивает высокую эффективность протекции.

Пептиды с некоторой структурной гомологией с CGRP, такие как адреномедуллин и амилин, также могут активировать рецепторы CGRP<sub>1</sub> [82, 127]. В контексте НПВП-индуцированных гастропатий важно, что способность CGRP усиливать устойчивость слизистой оболочки желудка к агрессивным факторам остается высокой при использовании индометацина [146].

Эндокринными клетками желудка синтезируется грелин – пептид, состоящий из 28 аминокислотных остатков и способный взаимодействовать с рецептором к соматотропин-рилизинг фактору. Связываясь с рецепторами, грелин ведет к активации протеинкиназы C с последующим высвобождением кальция из внутриклеточного депо и способствует торможению калиевых каналов. Известно, что он активно влияет на функцию системы пищеварения, стимулирует секрецию гормона роста, тем самым улучшает процессы регенерации, улучшает деятельность миокарда и обладает целым рядом эндокринных функций [43].

Для грелина обнаружено защитное действие на фоне введения этанола. Механизмы, с помощью которых грелин обеспечивает свою гастропротекторную активность против повреждения слизистой оболочки, на данный момент изучаются. Согласно Sabilia et al., благоприятное влияние грелина при остром поражении опосредовано выделением NO и активностью сенсорных нейронов. В исследовании P.C. Konturek, продемонстрировано также, что лечение грелином вызвало дозозависимое снижение экспрессии TNF-α мРНК, что свидетельствует о противовоспалительном эффекте этого пептида [97, 142, 191].

В исследовании Brzozowski T. et al. обнаружены и другие механизмы действия этого пептида. Грелин оказывал мощное защитное действие на желудок крыс, подвергшихся воздействию этанола и стресса, и эти эффекты зависели от активности блуждающего нерва и гиперемии, опосредованных системами NOS-NO и ЦОГ-PG [74]. Несколько групп ученых после ряда экспериментов предположили у грелина наличие антиоксидантного действия [169, 200]. Об этом факте говорит как снижение АФК в препаратах желудка, так и повышение уровня эндогенного грелина на фоне общего оксидативного стресса организма.

Эндогенная опиоидная система влияет на многие желудочно-кишечные процессы. Опиоидные рецепторы были идентифицированы в ЖКТ, а эндогенные опиоиды (энкефалины, динарфины) локализованы в энтеральных нейронах и хромаффинных клетках. Опиоиды задерживают опорожнение желудка, ингибируют моторику желудочно-кишечного тракта, уменьшают секрецию соляной кислоты и индуцируют гастропротекцию в различных (кислотозависимых и независимых) моделях гастропатии.

Gyires et al. исследовали роль эндогенных энкефалинов в защите слизистой желудка. По их данным, дельторфин II, [D-Ala 2, D-Leu 5] -энкефалин (DADLE), [D-Pen 2, D-Pen 5] -энкефалин (DPDPE) -, Агонист  $\mu$ -опиоидного рецептора - [D-Ala 2, Phe 4GlyT-ol] энкефалин (DAGO), а также  $\beta$ -эндорфин ингибируют повреждение слизистой оболочки, вызванное как этанолом, так и индометацином. Было обнаружено, что в протективном эффекте играет роль активация супраспинальных дельта-опиоидных рецепторов, причем гастропротекторное действие не зависит от влияния опиоидов на секрецию кислоты, зато при повреждении слизистой желудка этанолом в защитном действии играют роль секреция NO и PG [114-116].

Суммируя вышесказанное, следует заключить, что эндогенные пептиды играют весомую роль в регуляции функций ЖКТ и гастропротекции. Множественные исследования демонстрируют, что экзогенное введение этих веществ и их структурных аналогов способствуют выраженной защите СОЖ от

различных агрессивных влияний. Основными механизмами, при этом, являются NO-, ЦОГ-опосредованные механизмы и антиоксидантный эффекты.

## **1.2 Патогенетические механизмы НПВП-индуцированной гастропатии**

Неоднократно показано, что хронический прием НПВП ведет к значительному увеличению риска развития язвенных поражений слизистой ЖКТ [70, 77, 136]. Суммируя общие патогенетические механизмы повреждающего действия НПВП на слизистую оболочку органов пищеварения, необходимо выделить: 1) основной путь – блокирование выработки простагландинов E2 и I2 (через ЦОГ); 2) путь вследствие основного и прочие механизмы: уменьшение выработки желудочной слизи и бикарбонатов, снижение кровотока в слизистой оболочке желудка, уменьшение агрегации тромбоцитов, увеличение выработки соляной кислоты и пепсиногена, повышение образования свободных радикалов и снижение образования глутатиона, стимуляция хемотаксиса нейтрофилов, увеличение содержания фактора некроза опухолей, увеличение синтеза токсичных для желудочной слизистой лейкотриенов В4, изменение внутриклеточного содержания кальция, разобщение окислительного фосфорилирования, ингибирование синтез NO, что вызывает нарушение кровообращения и прилипание лейкоцитов к сосудистому эндотелию в слизистой оболочке желудка, стимуляция апоптоза эпителиальных клеток [25].

Клеточными мишенями для не-ЦОГ-опосредованного действия НПВП являются цГМФ, фосфодиэстераза, рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами, ИККβ, АМФ киназа и др. [24, 53, 112, 186]. Также доказано, что повреждения возникают в результате снижения кровотока в желудке и легкой ишемии, вызываемой слизистой оболочкой желудка. Адекватный кровоток может оказывать выраженное протективное действие на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта, предупреждая развитие экспериментальных эрозивных повреждений гастродуоденальной зоны. Гипоксия ткани слизистой,

возникающая при нарушении кровотока, приводит к глубоким геморрагическим некрозам с образованием эрозий [11, 156, 190].

### 1.2.1 Циклооксигеназный путь

Наиболее важная роль в механизме ulcerогенного действия НПВП отводится ингибированию циклооксигеназы и, соответственно, нарушению метаболизма простагландинов. Экспериментально подтверждено, что НПВП вызывают поражения слизистой желудка в дозах, способных значительно снижать уровень PGE<sub>2</sub> [216, 217]. Ранее считалось, что именно ингибирование ЦОГ-1, конститутивной изоформы фермента, ответственно за развитие повреждения в слизистой оболочке желудка. Однако затем исследования подтвердили, что при подавлении эффектов ЦОГ-1 типа значительно повышается экспрессия генов ЦОГ-2 [216]. Такая реакция рассматривается как адаптивный механизм защиты слизистой от агрессивных факторов в условиях подавления нормальных протективных функций. Соответственно, ингибирование двух изоформ одновременно способно принести намного более выраженный вред слизистой оболочке желудка, нежели ингибирование ЦОГ-1 отдельно [217].

Индометацин, производное индолуксунсной кислоты, по данным метаанализа результатов исследований гастротоксичности различных НПВП, является одним из препаратов с высокой вероятностью развития гастродуоденальных осложнений [106]. Индометацин – обратимый неселективный ингибитор ЦОГ. Он обратимо блокирует обе изоформы фермента. Это приводит к снижению концентрации простагландинов, в особенности ПГЕ<sub>2</sub>, в слизистой оболочке желудка и снижению всех протективных функций, происходит уменьшение синтеза слизи и бикарбоната, ухудшение кровотока слизистой оболочки, увеличение секреции кислоты, физико-химическое повреждение клеточных мембран [145, 187].

При всем этом сам по себе факт ингибирования синтеза простагландинов является важным, но не единственным достаточным фактором для развития

эрозий в слизистой желудка [141, 205, 231]. В целом, в развитии данного патологического эффекта принимает участие целый комплекс механизмов.

### **1.2.2 Роль оксидативного повреждения в развитии гастропатий. Нарушение митохондриального метаболизма**

Считается, что НПВП-индуцированный митохондриальный окислительный стресс (MOS) является важным простагландин-независимым путем индукции повреждения слизистой желудка [143, 157, 211].

Митохондрии – мембранные органеллы клеток, выполняющие ряд важнейших функций. Структурная и функциональная целостность митохондрий лежит в основе поддержания биоэнергетического гомеостаза и клеточного здоровья. Постоянное динамическое равновесие важно для функций, выполняемых митохондриями, включая производство аденозинтрифосфата (АТФ), внутриклеточную регуляцию уровня  $Ca^{2+}$ , буферизацию эндоплазматического ретикулума и гибель клеток за счет активации апоптоза [166, 184, 195, 226].

Митохондриальная дыхательная цепь является основным источником реактивных форм кислорода (ROS), которые в основном образуются в комплексах I и III дыхательной цепи. Что еще более важно, митохондриальная дыхательная цепь является в то же время одной из основных мишеней для разрушающих эффектов ROS. НПВП разобщают митохондриальное окислительное фосфорилирование, что снижает концентрацию внутриклеточного АТФ. Это приводит к высвобождению цитохрома из митохондриального межмембранного пространства в цитозоль и к высвобождению ROS, такого как супероксид ( $O_2^-$ ) и перекись водорода ( $H_2O_2$ ), тем самым вызывая активацию каспаз и перекисное окисление липидов клеток, все это приводит к клеточному апоптозу [72, 75, 167, 196, 220]. Кроме того, это изменение приводит к потере межклеточной целостности, поскольку межклеточные соединения находятся под контролем АТФ-зависимых актин-миозиновых комплексов и, как следствие, повышается



проницаемость и последующие повреждения слизистой оболочки. [70, 160]. Повреждающее действие также снижает пролиферацию клеток СОЖ.

В исследовании, опубликованном в апреле 2019 года, было показано, что индометацин сдвигает динамику митохондрий в сторону усиленного деления, что индуцирует биоэнергетический кризис и затем вызывает апоптоз клеток слизистой оболочки желудка крысы *in vivo* [166].

Если говорить точнее о механизмах проапоптического действия, показано, что одним из путей, активированных индометацином, является путь протеинкиназы С-дзета (PKC $\zeta$ )-p38 MAPK-динамин-зависимый протеин 1, который является активатором митохондриального деления. Вследствие обнаруженного механизма индометацин вызывал нарушение метаболических параметров митохондрий: снижалось базальное дыхание, сильно уменьшалась продукция АТФ и происходила потеря клеточного резерва. Эти нарушения постепенно приводили к деполяризации митохондрий и индукции апоптоза клеток, который увеличивался в течение 24 часов после введения.

Важной проблемой в этом процессе является возможность образования замкнутого цикла: избыточная продукция ROS снижает потенциал митохондриальной мембраны, из-за чего нарушается нормальное течение биохимических реакций, из митохондрий высвобождаются новые избыточные количества ROS, которые разрушают мембраны митохондрий [120, 130].

### **1.2.3 Аутофагия как механизм гибели клеток под действием индометацина**

Одним из важных механизмов защиты клеток от апоптоза является макроаутофагия (аутофагия). Этот процесс активируется в случае повреждения клеток эпителия агрессивными факторами. В частности, аутофагия играет важную роль в поддержании гомеостаза клеток во время лишения питательных веществ, окислительного стресса или стресса эндоплазматического ретикулума [199]. Цель аутофагии состоит в том, чтобы разрушить лишние и поврежденные органеллы, цитозольные белки и инвазивные микроорганизмы внутри клетки. В процессе

аутофагии обычно перерабатываются макромолекулярные агрегаты, образующиеся в результате окислительного стресса, опосредованными путями, что может также снижать митохондриальную выработку ROS путем рециркуляции старых и поврежденных митохондрий [121]. Таким образом, считается, что аутофагия является важным клеточным антиоксидантным механизмом [110].

Кодируется этот процесс генами, связанными с аутофагией, и включает в себя: образование и прологнацию изолирующей мембраны, образование двухмембранного секвестрирующего компартмента, называемого фагофором, который превращается в аутофагосому (сливаясь с лизосомой). После того, как частица доставлена в лизосому и разложена, полученные макромолекулы (или малые молекулы) высвобождаются обратно в цитозоль и используются в качестве компонентов для построения новых макромолекул и источников энергии для поддержания жизнеспособности клеток, что составляет доминирующую роль аутофагии [165, 225]. Однако считается, что чрезмерная аутофагия также может быть вовлечена в процесс гибели клеток [79].

Данные, полученные в ходе исследований влияния индометацина на процесс аутофагии, неоднозначны. С одной стороны, ряд исследований сообщает, что ингибирование аутофагии фармакологическими или генетическими средствами защищает клетки от цитотоксичности индометацина, в связи с чем возникает предположение, что индометацин вызывает повреждение, стимулируя чрезмерную аутофагию [119, 150, 155].

С другой стороны, в литературе есть данные, демонстрирующие, что индометацин ингибирует процесс аутофагической деградации [171]. В исследовании 2018 года показано, что препарат нарушал лизосомальную функцию, повышая проницаемость мембран лизосом. Также обнаружено, что, повышая лизосомальный pH, индометацин ингибировал активность кислых лизосомальных ферментов. Однако предположение об ингибировании аутофагии более вероятно применимо в отношении измененных клеток (неоплазий) желудка, а данные, указывающие на активацию процесса более обширны.

При этом интересно, что, как упоминалось ранее, аутофагия может возникать в ответ на митохондриальный оксидативный стресс, а также на стресс эндоплазматического ретикулума. Таким образом, эти механизмы могут быть как последовательными, так и параллельными звеньями патогенеза НПВП-индуцированной гастропатии. Действительно, есть исследования, обнаружившие взаимосвязь между этими видами стресса и активацией аутофагии [119, 171]. При этом доказано, что эти стрессовые влияния и накопление активных форм кислорода внутри клеток под действием индометацина провоцирует фосфорилирование Atg и аутофагию в клетках слизистой оболочки кишечника, что позволяет предположить наличие такой же причинно-следственной взаимосвязи процессов в ткани желудка [119, 171].

Суммируя вышесказанное, следует заключить, что индометацин оказывает многогранное повреждающее воздействие на течение окислительных процессов в митохондриях, что приводит к накоплению токсических продуктов, фрагментации митохондрий и, в конце концов, апоптозу клеток. Помимо этого, окислительный стресс также неразрывно связан с активацией аутофагии, как отдельным механизмом защиты клеток, но в случае патологии приводящим к их гибели. В связи с этим, роль митохондриального окислительного стресса в патогенезе НПВП-индуцированных гастропатий является весомой и, по мере углубления знаний о ней, приобретает все большее значение в понимании механизмов повреждающего действия на слизистую.

#### **1.2.4 Другие механизмы повреждающего действия**

Обсуждая механизмы PG-независимого повреждения индометацином, следует заметить еще один обнаруженный путь его пагубного влияния на слизистую. Изменение окислительно-восстановительного гомеостаза активирует сигнализацию ядерного фактора  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), который связан с провоспалительным повреждением тканей [177]. NF- $\kappa\text{B}$  является ядерным белком, одним из важнейших супрессоров апоптоза. NF- $\kappa\text{B}$  регулирует

эксперсию более 400 генов, многие из которых являются критическими для выживания клеток [30]. При предотвращении активации или ингибировании этого фактора запускается несколько механизмов апоптоза, включая митохондриальный путь через высвобождение цитохрома С и активацию каспазы-3. Снижается экспрессия ряда белков-ингибиторов апоптоза и ингибиторов каспаз [112].

Индометацин, имея кислотную природу, ( $pK_a = 4,5$ ) в кислой среде желудка остается в неионизированном состоянии, и может проникать внутрь клеток [134]. В цитоплазме клеток ( $pH\ 7.1$ ) молекула ионизируется, и теряет способность к диффузии. Накопление ионов препарата внутри клеток усугубляет гастротоксичность [219]. Так, происходит индукция местной обратной диффузии ионов  $H^+$  в слизистую оболочку желудка, нарушается нормальное кислотно-щелочное равновесие в клетках, возникает тканевой ацидоз и повреждение клеток [187].

Была также продемонстрирована роль повышенного мышечного сокращения в патогенном механизме индуцированного индометацином изъязвления желудка [163, 209]. Mersereau и Hinchey были первыми, кто продемонстрировал важность гипермобильности желудка и складок слизистой оболочки в генезе поражений желудка в ответ на НПВП [163]. Группа японских ученых сообщала, что индометацин в ulcerогенной дозе усиливает моторику желудка и вызывает микроциркуляторные нарушения из-за патологического сдавления слизистой оболочки желудочной стенки [173, 211]. Экспериментально значимость этого звена была продемонстрирована следующим образом: при введении индометацина в низкой дозе, способной ингибировать синтез PG препарат показал более 90% ингибирования генерации PG слизистой оболочки, однако метод сам по себе не вызывал какого-либо повреждения желудка. При этом, когда индометацин вводили в комбинации с 2-дезоксид-Д-глюкозой (агент, вызывающий гипермобильность желудочной стенки), это спровоцировало тяжелые поражения в желудке. Таким образом, ученые пришли к выводу, что дефицит PG может иметь решающее значение в увеличении восприимчивости слизистой оболочки к повреждению на фоне гипермобильности [205].

Влияние индометацина на сократительную активность желудка кажется особенно важным на фоне обнаруженной закономерности: в одном из экспериментов ингибиторы кислотности желудка не защищали слизистую желудка от повреждений в присутствии экзогенной кислоты, в отличие от атропина, который снижал перистальтику желудка и предотвращал образование эрозий даже в присутствии экзогенной кислоты [209].

### **1.3 Лекарственные средства, используемые для коррекции НПВП-индуцированных гастропатий**

Спектр лекарственных средств, используемых для лечения и профилактики НПВП-гастропатии, довольно широк и включает в себя антациды, препараты висмута, аналоги простагландина, антисекреторные препараты ( $H_2$ -блокаторы, ингибиторы протонной помпы) [28]. Однако терапия этими группами препаратов все еще несовершенна, ограничениями часто являются побочные эффекты.

Учитывая тот факт, что ингибирование ЦОГ и снижение синтеза эндогенных простагландинов занимает лидирующую позицию среди механизмов повреждающего действия НПВП, применение экзогенных простагландинов является оправданным для профилактики возникновения повреждений.

Синтетический аналог простагландина  $E_1$  мизопростол по результатам крупного мета-анализа продемонстрировал эффективность в профилактике язв желудка (74%) и двенадцатиперстной кишки (53%) по сравнению с плацебо [161]. Частота серьезных ЖКТ-осложнений в группе больных, получавших НПВП в сочетании с 800 мкг мизопростола, составила 0,76% по сравнению с группой, получавшей плацебо (1,5%), причем наиболее опасная патология – перфорация язвы – возникала на фоне приема мизопростола в 10 раз реже, чем в контроле [192]. Эффект мизопростола связан с его способностью стимулировать продукцию бикарбонатов и слизи, поддерживать нормальный местный кровоток и целостность слизистой оболочки как защитного барьера. Мизопростол усиливает пролиферацию эпителия слизистой оболочки в ответ на повреждение [22].

К сожалению, клиническая польза мизопростола ограничена в основном его желудочно-кишечными побочными эффектами, такими как спазмы, боли в животе и диарея, а также побочными эффектами, не связанным с ЖКТ (повышение сократительной активности миометрия, системная вазоплегия, гипотензия, гиперемия лица, головные боли) [185].

В настоящий момент центральное место в лечении и профилактике НПВП-гастропатий занимают антисекреторные препараты, такие как блокаторы гистаминовых рецепторов и ингибиторы протонной помпы (ИПП) [28, 96].

При этом при сравнении этих двух основных групп препаратов, многие исследования подтверждают, что блокаторы гистаминовых рецепторов (ранитидин, фамотидин) недостаточно эффективны в лечении НПВП-индуцированных гастропатий. Препараты группы ИПП (омепразол) проявляют наиболее высокую терапевтическую активность как в лечении, так и в профилактировании патологии [96, 132, 133, 147, 218].

Ингибиторы протонной помпы обеспечивают более мощное и продолжительное торможение секреции желудочной кислоты, более высокую скорость заживления и облегчение симптомов и рекомендуются в качестве начальной терапии для большинства пациентов. Метаанализ рандомизированных контролируемых исследований, в которых сравнивали ингибиторы протонного насоса с блокаторами  $H_2$ -рецепторов, систематически демонстрируют лучшие результаты при использовании ИПП [181, 188, 201]. По данным исследования OMNIUM удалось поддержать ремиссию на фоне приема НПВП в течение 6 мес. при назначении омепразола у 61% больных, а при назначении мизопростола – у 48% больных. Омепразол оказался более эффективным, чем ранитидин в предупреждении НПВП-гастропатий и по данным исследования ASTRONAUT [235].

Несмотря на высокую эффективность, группу ИПП нельзя считать идеальной для профилактики и лечения НПВП-индуцированных гастропатий. В последние десятилетия все чаще сообщается о нежелательных эффектах, вызванных длительным применением данной группы.

Во-первых, эти препараты не защищают в достаточной степени слизистую кишечника. В одном из исследований продемонстрировано, что 68% пациентов испытывают повреждение кишечных мембран через 2 недели после применения внутрь НПВП в сочетании с ИПП [156]. Поскольку рН в желудке очень низок, ИПП являются эффективными средствами лечения НПВП-индуцированных язв желудка [235]. Тем не менее, в кишечнике эти препараты теряют свою значимость, поскольку рН составляет около 8. В кишечнике НПВП снижают продукцию АТФ в митохондриях кишечных эпителиальных клеток. Как следствие, проницаемость мембраны увеличивается в результате нарушения системы обслуживания в соединении между клетками [70]. Кишечные бактерии, желчные кислоты и протеазы, таким образом, проникают через клеточную мембрану, что приводит к миграции и активации нейтрофилов. Активированные нейтрофилы продуцируют цитокины или оксид азота, который вызывает повреждение кишечных мембран [123].

Во-вторых, что более важно, одним из часто встречаемых в литературе ограничений является информация о том, что ИПП могут изменять состав микробиома кишечника, что даже усугубляет индуцированное НПВП повреждение тонкого кишечника [103, 135, 227]. Мета-анализ, опубликованный в 2013 году, оценивающий связь между приемом пациентами ИПП и бактериальным разрастанием микрофлоры тонкого кишечника, пришел к выводу, что использование ИПП было статистически связано с риском чрезмерного роста бактерий тонкого кишечника. Предположительно, этот эффект может быть связан с хроническим подавлением кислоты и полученной гипохлоргидрией, являющейся прямым следствием механизма действия ИПП [153].

Таким образом, современные методы терапии и профилактики НПВП-индуцированных гастропатий сложно назвать совершенными. Все ещё остается ряд нерешенных проблем, связанных с недостаточной эффективностью или нежелательными реакциями на терапию, соответственно, вопрос поиска оптимальных средств защиты еще не закрыт.

Доказано, что острая фаза повреждения слизистой желудка включает в себя воспалительные реакции и дисбаланс окисления, при которых наблюдается иррегуляции провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкины (IL-1 $\beta$  и IL-6), миграция нейтрофилов и мононуклеарных клеток и генерация свободных радикалов [66]. Поэтому на сегодняшний день актуально мнение, что терапевтические мишени при эрозивных процессах в желудке не должны ограничиваться контролем секреции кислоты, они также включать контроль воспалительных реакций и регуляцию несбалансированного окисления [102].

Учитывая вышесказанное, нас заинтересовал вопрос поиска новых средств эффективной коррекции НПВП-индуцированной гастропатии. Перспективным направлением этого поиска мы определили область пептидных молекул.



## **ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Экспериментальные животные и условия эксперимента**

Экспериментальная часть исследования выполнена на 280 аутбредных 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, производимый 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.

#### **2.1.1 Моделирование индометацин-индуцированной гастропатии и схема введения объектов исследования и препаратов сравнения**

НПВП-индуцированная гастропатия моделировалась путем однократного внутрижелудочного введения индометацина в дозе 60 мг/кг в 1 мл физиологического раствора («индометациновая» гастропатия).

Объекты исследования и препараты сравнения в соответствующих экспериментальных группах животных вводились внутрижелудочно через зонд ежесуточно в течение 7 дней до моделирования индометацинового повреждения слизистой желудка. Последнее введение осуществлялось за 1 час до начала

действия язвообразующего фактора. Животные контрольной группы получали эквивалентные количества растворителя в соответствующих режимах введения.

### 2.1.2 Распределение животных по экспериментальным группам

Крысы распределялись по экспериментальным группам в соответствии с разделами исследования. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1– Распределение экспериментальных животных по группам

Краткое описание серии экспериментов	Группы животных	Количество животных
<b>РАЗДЕЛ 1 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСА ТКАНЕЙ СВИНЫХ ПОЧЕК НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНДОМЕТАЦИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГАСТРОПАТИИ</b>		
Макро- и микроскопическая оценка состояния слизистой оболочки желудка крыс при введении пептидного комплекса из тканей свиных почек на фоне «индометациновой» гастропатии	<i>Контрольная группа</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии)	8 крыс
	<i>Подопытная группа</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение пептидного комплекса из тканей свиных почек)	8 крыс
Изучение активности ядрышковых организаторов эпителиоцитов желудка крыс при введении пептидного комплекса из тканей свиных почек на фоне «индометациновой» гастропатии	<i>Контрольная группа</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии)	10 крыс
	<i>Подопытная группа</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение пептидного комплекса из тканей свиных почек)	10 крыс

## Продолжение Таблицы 1

Изучение активности ЦОГ-1,2 в слизистой оболочке желудка крыс при введении пептидного комплекса из тканей свиных почек на фоне «индометациновой» гастропатии	<i>Группа интактных животных</i> (здоровые крысы без введения индометацина и объекта исследования)	8 крыс
	<i>Контрольная группа</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии)	12 крыс
	<i>Подопытная группа</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение пептидного комплекса из тканей свиных почек)	17 крыс
Изучение активности процесса свободнорадикального окисления в слизистой оболочке желудка крыс при введении пептидного комплекса из тканей свиных почек на фоне «индометациновой» гастропатии	<i>Группа интактных животных</i> (здоровые крысы без введения индометацина и объекта исследования)	10 крыс
	<i>Контрольная группа</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии)	10крыс
	<i>Подопытная группа</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение пептидного комплекса из тканей свиных почек)	10крыс
<b>РАЗДЕЛ 2 СКРИНИНГ ГАСТРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ОЛИГОПЕПТИДОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНДОМЕТАЦИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГАСТРОПАТИИ</b>		
Макро- и микро-скопическая оценка состояния слизистой оболочки желудка крыс при	<i>Группа пептида Leu-Ile-Lys</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение пептида Leu-Ile-Lys)	8 крыс

## Продолжение Таблицы 1

введении олигопептидов на фоне «индометациновой» гастропатии	<i>Группа пептида Leu-Ile-Lys-Ala</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение пептида Leu-Ile-Lys-Ala)	10 крыс
	<i>Группа пептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение пептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro)	10 крыс
	<i>Группа пептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение пептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe)	10 крыс
	<i>Группа пептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение пептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly)	10 крыс
	<i>Группа пептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение пептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val)	10 крыс
	<i>Группа пептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val-Arg</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение пептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val-Arg)	10 крыс
	<i>Группа препарата сравнения омепразол</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение препарата сравнения омепразол)	8 крыс

## Продолжение Таблицы 1

	<i>Группа препарата сравнения ранитидин</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение препарата сравнения ранитидин)	8 крыс
	<i>Группа препарата сравнения мизопростол</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение препарата сравнения мизопростол)	8 крыс
Изучение активности процесса свободнорадикального окисления в слизистой оболочке желудка крыс при введении соединений-лидеров олигопептидов на фоне «индометациновой» гастропатии	<i>Группа интактных животных</i> (здоровые крысы без введения индометацина и объекта исследования)	10 крыс
	<i>Контрольная группа</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии)	10 крыс
	<i>Группа пептида Leu-Ile-Lys</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение пептида Leu-Ile-Lys)	10 крыс
	<i>Группа пептида Leu-Ile-Lys-Ala</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение пептида Leu-Ile-Lys-Ala)	10 крыс
	<i>Группа пептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение пептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe)	10 крыс
	<i>Группа препарата сравнения α-токоферола ацетат</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение препарата сравнения α-токоферола ацетат)	10 крыс
	<i>Группа препарата сравнения омепразол</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение препарата сравнения омепразол)	10 крыс

## Окончание Таблицы 1

Изучение активности ЦОГ-1,2 в слизистой оболочке желудка крыс при введении трипептида Leu-Phe-Lys на фоне «индометациновой» гастропатии	<i>Группа пептида Leu-Phe-Lys</i> (моделирование «индометациновой» гастропатии + введение трипептида Leu-Phe-Lys)	15 крыс
---	--	---------

## 2.2 Характеристика объектов исследования

### 2.2.1 Пептидный комплекс из тканей свиных почек

Изучаемый комплекс получали из исходной субстанции с помощью метода экстракции уксусной кислотой. Для этого материал (лиофилизат почек свиньи) заливали раствором кислоты уксусной в концентрации 0,1Н в соотношении 1:10 и экстрагировали в течение суток при температуре 5°C, периодически перемешивая экстрагируемый материал. После этого производили замораживание при температуре -20°C, затем оттаивали и профильтровывали полученный первичный экстракт через фильтр с порами 0,22 мкм. На следующем этапе для осаждения белков первичный экстракт заливали ацетоном в соотношении экстракт:ацетон – 1:6 и оставляли на 18 часов при температуре 5°C. Полученный осадок, представляющий собой крупные молекулы белка, отделяли декантацией, а надосадочную жидкость центрифугировали в течение 10 мин при скорости вращения 3000 об/мин. Полученный осадок растворяли в 100 мл дистиллированной воды. Вторичный экстракт профильтровывали, чтобы отделить осадок примесей. Затем супернатант выпаривали и досушивали при температуре 60°C в течение 48 часов.

В результате образовывался белый порошок с коричневатым оттенком, практически не имеющий вкуса и запаха, который и представлял собой

пептидный экстракт (пептидный комплекс). Выход по массе составил в среднем  $3,88 \pm 0,40$  % (n=10).

### 2.2.2 Олигопептидные соединения

Характеристики изучаемых олигопептидных соединений представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Химическая структура олигопептидных соединений

Наименование	Чистота
пептид Leu-Ile-Lys	98%
пептид Leu-Ile-Lys-Ala	98%
пептид Leu-Ile-Lys-Ala-Pro	98%
пептид Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe	98%
пептид Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly	98%
пептид Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val	98%
пептид Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val-Arg	98%

Индивидуальные олигопептиды для исследования гастропротекторных свойств в скрининге, были заказаны на предприятии SHANGHAI APEPTIDE CO., LTD (г. Шанхай, Китайская народная республика), посредником являлась компания ЗАО «Эвалар» (г. Бийск, Россия). Для получения использовался метод химического синтеза.

Все пептиды, молекулы которых представлены в таблице 2 (кроме Leu-Ile-Lys), по физическим свойствам являлись белыми мелкокристаллическими порошками практически без вкуса и запаха, легкорастворимыми в воде. Трипептид Leu-Ile-Lys несколько отличался по физическим свойствам, т.к. являлся аморфным гигроскопичным порошком белого цвета, практически без вкуса и запаха, легкорастворимым в воде.

### 2.2.3 Препараты сравнения: омепразол, ранитидин, мизопростол, $\alpha$ -токоферола ацетат

В качестве препаратов сравнения при оценке гастропротекторной активности объектов исследования использовались следующие лекарственные средства: омепразол, ранитидин, мизопростол,  $\alpha$ -токоферола ацетат.

Омепразол – классический гастропротекторный препарат из группы ингибиторов протонной помпы (ИПП), которые занимают центральное место в лечении язвенной болезни желудка и лечении и профилактики гастропатий [28, 96]. Эффективно снижает секрецию соляной кислоты обкладочными клетками желудка, напрямую ингибируя фермент  $H^+/K^+$ -АТФазу.

Ранитидин – препарат из группы блокаторов  $H_2$ -гистаминовых рецепторов, гастропротекторный эффект которого также связан со снижением секреции соляной кислоты в желудке, препарат с доказанной эффективностью, хотя и уступающей препаратам группы ИПП [235].

Мизопростол – синтетический аналог простагландина  $E_1$ , гастропротекторный эффект наступает вследствие стимуляции простагландиновых рецепторов, которая приводит к повышению выработки защитной слизи, бикарбонатов, улучшению микроциркуляции и пролиферации в ткани желудка.

$\alpha$ -токоферола ацетат – классический антиоксидант, способный напрямую взаимодействовать с активными формами кислорода и снижать их повреждающее действие на клетки, был выбран в качестве препарата сравнения для определения антиоксидантной активности соединений.

В экспериментальных исследованиях использовались: субстанция омепразола в дозе 37,0 мг/кг (Sigma aldrich, США, каталожный номер O104), ранитидина в дозе 25,0 мг/кг (Sigma aldrich, США, каталожный номер R101), мизопростол в дозе 0,09 мг/кг (Sigma aldrich, США, каталожный номер M6807). Дозы препаратов сравнения были выбраны на основе исследований, проведенных ранее другими учеными в сходных экспериментах – при сравнении



гастропротекторной активности или антиоксидантной активности изучаемых средств с базисными препаратами [25, 29, 33]. Растворы для перорального введения в каждом случае готовились методом разведения субстанций в физиологическом растворе с расчетом, чтобы необходимая доза содержалась в 1 мл полученного раствора. Введение растворов производилось внутривентриально через зонд.

Препарат сравнения  $\alpha$ -токоферола ацетат – вещество, растворимое в жирах, поэтому раствор для внутривентриального введения готовился методом разведения заводской лекарственной формы оливковым маслом для приготовления лекарственных форм с расчетом, чтобы необходимая доза 300 мг/кг лекарственного препарата содержалась в 1 мл конечного раствора. В качестве лекформы для разведения использовали заводской препарат под торговым названием «Раствор  $\alpha$ -токоферола ацетата (витамина E) 10% в масле» (производитель ОАО «Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербург, Россия) [41].

#### 2.2.4 Дозы объектов исследования

Дозы объектов исследования представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Дозы объектов исследования

Наименование	Доза (мг/кг)
пептидный комплекс из тканей свиных почек	75,0
пептид Leu-Ile-Lys	11,5
пептид Leu-Ile-Lys-Ala	14,8
пептид Leu-Ile-Lys-Ala-Pro	18,0
пептид Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe	20,8
пептид Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly	23,6
пептид Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val	26,4
пептид Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val-Arg	29,0

Примечание: доза пептидного комплекса из тканей свиных почек определена в ходе эксперимента, дозы индивидуальных олигопептидов определены расчетным путем на основе

результатов определения массовых долей аминокислот в аминокислотном составе пептидного комплекса из тканей свиных почек.

## **2.3 Методы исследования**

### **2.3.1 Морфологическая оценка степени повреждения слизистой оболочки желудка**

Через 4 часа после введения язвообразующего фактора животных подвергали эвтаназии одномоментной декапитацией под эфирным наркозом, извлекали желудок. Желудок очищали, промывали холодным физиологическим раствором. Для проведения морфологического исследования материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Проводку материала осуществляли по изопропиловому спирту с помощью автомата проводки карусельного типа TISSUE-TEK VIPTM6 (Sakkura, Япония). Заливали материал в парафин при помощи станции парафиновой заливки TISSUE-TEK TEC 5 (Sakkura, Япония). Гистологические срезы толщиной 5-7 мкм получали с использованием полуавтоматического роторного микротомы Accu-Cut SRM (Sakkura, Япония) и окрашивали гематоксилином и эозином в автомате для автоматической окраски микропрепаратов TISSUE-TEK Prisma (Sakkura, Япония). Также осуществляли гистохимические окраски на нейтральные гликозаминогликаны Шифф-реактивом по Мак-Манусу и на кислые гликозаминогликаны 1% раствором альцианового синего на 3% уксусной кислоте (pH=2,5) по Сиддмену. Заключали препараты под пленку в аппарате для автоматического заключения микропрепаратов TISSUE-TEK Film (Sakkura, Япония).

В каждом случае на макроскопическом уровне в слизистой оболочке желудка подсчитывали общее число эрозий, число глубоких полосовидных эрозий и число поверхностных точечных эрозий. Кроме того, высчитывали индекс Паулса (ИП), или индекс изъязвления для каждого вида повреждений по формуле:

$$\text{ИП} = (N \times K)/100, \quad (1)$$

где ИП – индекс Паулса;

N – среднее число деструкций на 1 животное;

K – процент поражений животных в группе.

Индекс противоязвенной активности рассчитывали, как отношение индекса Паулса для контрольной группы к индексу опытной группы:

$$\text{ПА} = \text{ИП}_{\text{контроль}}/\text{ИП}_{\text{опыт}}, \quad (2)$$

Вещества, индекс ПА которых больше либо равен 2 единицам, считали обладающими антиульцерогенной активностью (Pauls F. Et al., 1947; Зуева Е.П. и др., 2003).

Высчитывали толщину СОЖ и глубину эрозий. Подсчитывали плотность воспалительного инфильтрата в 1 мм<sup>2</sup> при помощи окулярной сетки Автандилова Г.Г. Морфометрические исследования проводили с использованием специально созданной системы компьютерного анализа изображений, состоящей из микроскопа Leica DME (Германия), цифровой камеры Leica EC3 (Leica Microsystems AG, Германия) и программного обеспечения ВидеоТест-Морфология 5.2.

### **2.3.2 Определение активности ядрышковых организаторов в ткани слизистой желудка крыс**

Выявление ядрышковых организаторов (ЯО) осуществляли по двухступенчатому методу Daskal Y. et al., в модификации И.П. Боброва [6, 7, 89]. На препарат наслаивали одну каплю раствора нитрата серебра, приготовленного путем растворения 1 г AgNO<sub>3</sub> в 1 мл дистиллированной воды непосредственно

перед использованием. Инкубировали обработанный препарат в термостате 1 мин 40 с при температуре 60 °С во влажной камере. Влажная камера представляла собой чашку Петри с фильтром, смоченным водой дистиллированной. После инкубации на препарат наслаивали по одной капле раствора формальдегида 40% и коллоидного проявителя, представлявшего собой 2% раствор желатина в 1% водном растворе муравьиной кислоты, и еще раз инкубировали в термостате при температуре 60°С в течение 20-50 с. После обрабатывали ацетатным буфером с рН =2,4 в течение 1 мин и добавляли водный раствор метилового зеленого концентрации 0,2% для докрасивания. После 2-3 минутной дифференцировки в n-бутиловом спирте материал обрабатывали толуолом и заключали в полистирол.

В результате окрашивания в препаратах отчетливо определялись округлые черные гранулы AgNORs на фоне коричневых ядрышек и более светлых ядер. 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.). В каждом случае исследовали не менее 25-30 ядер клеток шейных отделов слизистой оболочки желудка крысы (СОЖ).

### **2.3.3 Определение концентрации ЦОГ-1,2 в тканях желудка крыс**

Содержание ферментов ЦОГ-1 и ЦОГ-2 в плазме крови и гомогенате желудка определяли методом иммуноферментного анализа. Данный метод основан на специфическом взаимодействии определяемого вещества (ЦОГ-1,2) с антителами и детекции образовавшегося комплекса антиген-антитело с помощью ферментативной реакции с использованием в качестве фермента для метки пероксидазы хрена.

Для определения использовали наборы реагентов ELISA Kit for Prostaglandin Endoperoxide Synthase 1,2 (Cloud-CloneCorp., США). Анализ проводили по методике, предложенной фирмой-изготовителем. Микропланшет, входящий в данный набор, был предварительно покрыт антителами,

характерными для PTGS 1,2. Стандарты и образцы добавляли в соответствующие лунки микропланшета с биотинилированными антителами, характерными для PTGS 1,2. Далее в каждую лунку микропланшета добавляли авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена, и помещали в инкубатор. Затем добавляли раствор субстрата тетраметилбензидина. Только в тех лунках, которые содержат ЦОГ-1,2, биотинилированные антитела и конъюгированный авидин, происходило изменение цвета.

Фермент-субстратная реакция прекращалась при добавлении раствора серной кислоты. Результаты ИФА определяли по интенсивности окраски на фотометре для микропланшет при длине волны 450 нм. Полученные результаты затем пересчитывались на концентрацию фермента методом градуировочного графика.

#### **2.3.4 Определение параметров оксидативного стресса в желудках крыс**

Как известно, важное значение в развитии язвенного поражения эпителия желудка имеет оксидативное повреждение, в связи чем определение уровня оксидативного стресса в ткани слизистой желудка является важным диагностическим параметром при оценке эффективности коррекции гастропатии [107, 223]. Уровень окислительного стресса в ткани СОЖ оценивали по показателям активности прооксидантной и антиоксидантной системы. Для оценки прооксидантной активности в ткани измеряли содержание тиобарбитуратреактивных продуктов (ТБРП), а также общую прооксидантную активность (ОПА). Антиоксидантная активность измерялась за счет ферментов: глутатионпероксидазы (ГПО), супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ), а также оценивалась общая антиоксидантная активность (ОАА), включающая в себя комплексную противокислительную активность ферментных и неферментных систем [51].

Для определения указанных показателей желудка извлекали, вскрывали по малой кривизне, промывали физиологическим раствором, измельчали, гомогенизировали трехкратным циклом замораживания-размораживания.

#### 2.3.4.1 Определение концентрации тиобарбитуратреактивных продуктов

Для определения концентрации ТБРП использовалась методика, основанная на измерении окраски основания Шиффа, которое образуется при взаимодействии малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой. Соединение, образующееся в ходе реакции, окрашивает раствор в розовый цвет, интенсивность которого является прямо пропорциональной концентрации ТБРП в исходном растворе. Измерение проводили фотометрически при длине волны  $\lambda=535$  нм.

Приготовление контрольной пробы происходило путем смешивания следующих веществ: вода очищенная – 3 мл, трихлоруксусная кислота 30% – 1 мл, соляная кислота 5М – 0,1 мл. Для опытных проб в пробирку помещали: воду очищенную – 0,5 мл, надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования биоматериала – 0,5 мл, раствор трихлоруксусной кислоты 30% – 1 мл, 5М раствор HCl – 0,1 мл, раствор тиобарбитуровой кислоты 0,75% – 1 мл.

Немедленно после приготовления пробы помещали на водяную баню при температуре 100 °С и инкубировали в течение 15 минут. Затем пробирки охлаждали и центрифугировали 15 минут при 3000 об/минуту. Надосадочную жидкость после центрифугирования собирали в кювету с длиной оптического пути 1 см и измеряли оптическую плотность при длине волны 535 нм. Для измерения использовали спектрофотометр Cary 50 (Varian Agilent Technologies, Австралия). В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Концентрацию ТБРП рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{ТБРП} = \frac{D_0}{0,16} \times 6,2, \quad (3)$$

где ТБРП – концентрация тиобарбитуратреактивных продуктов (мкмоль)

$D_o$  – оптическая плотность опытной пробы;

0,16 – коэффициент, полученный при построении калибровочной кривой  
малонового диальдегида;

6,2 – разведение гомогената.

### 2.3.4.2 Определение общей прооксидантной активности

Для определения общей прооксидантной активности (ОПА) использовалась методика, основанная на измерении концентрации продуктов перекисного окисления ТВИН-80, которые накапливаются в результате окислительных процессов. Концентрацию измеряли фотометрически по окраске раствора, полученное в ходе реакции накопленных продуктов с тиобарбитуровой кислотой. Интенсивность окраски измеряли фотометрически при длине волны  $\lambda=535$  нм [51].

Приготовление контрольной пробы происходило путем смешивания следующих веществ: вода очищенная – 0,2 мл и ТВИН-80 в концентрации 1% – 2 мл. Для опытных проб в пробирку помещали: надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования биоматериала – 0,2 мл, и ТВИН-80 в концентрации 1% – 2 мл.

Полученные образцы помещали в термостат на 48 часов и инкубировали при 40°C, после чего охлаждали и переливали полученный раствор в пластиковые пробирки. После этого добавляли 1 мл трихлоруксусной кислоты в концентрации 40% и инкубировали 60 минут при комнатной температуре. Далее центрифугированием при 6000 об/минуту в течение 15 минут отделяли осадок. К надосадочной жидкости добавляли 1 мл р-ра тиобарбитуровой кислоты в концентрации 0,25%. Полученную смесь помещали на водяную баню (100°C) и оставляли на 15 минут, после чего охлаждали. Полученный раствор розового цвета использовали для определения оптической плотности. Для этого его

помещали в кювету с длиной оптического пути 1 см и на спектрофотометре Cary 50 (Varian Agilent Technologies, Австралия) измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 535 нм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Величину ОПА рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{ОПА} = \frac{D_0 - D_k}{D_0} \times 100\%, \quad (4)$$

где ОПА – общая прооксидантная активность в процентах;

$D_0$  – оптическая плотность опытной пробы;

$D_k$  – оптическая плотность контрольной пробы.

#### 2.3.4.3 Определение общей антиоксидантной активности

Определяли общую антиоксидантную активность по выраженности угнетения окисления ТВИН-80, индуцированного  $\text{Fe}^{2+}$ /аскорбатом [50].

Контрольный и опытные образцы разводили в 200 мл флаконах из темного стекла с притертыми пробками. Во все флаконы вносили раствора ТВИН-80 по 2 мл, а также раствор сульфата железа 0,2 мл и аскорбиновой кислоты 0,1 мл. К контрольному образцу добавляли 1 мл воды дистиллированной, в опытные образцы добавляли материал гомогената желудков в разведении 1:10 (0,1 мл гомогената + 0,9 мл дистиллированной воды).

Полученные растворы помещали в термостат при 40°C и инкубировали в течение 48 часов. Затем содержимое флаконов переливали в центрифужные пластиковые пробирки, в каждую пробирку вносили по 1 мл трихлоруксусной кислоты 30% и при комнатной температуре оставляли на 60 минут. Затем пробирки помещали в центрифугу и в течение 15 минут центрифугировали при 6000 оборотов/мин. В ходе центрифугирования был получен супернатант, к 2 мл которого добавляли 1 мл тиобарбитуровой кислоты помещали на водяную баню



(температура 100°C) и инкубировали 15 минут. Добавленная тиобарбитуровая кислота реагирует малоновым диальдегидом, образуя комплекс, который окрашивает раствор в розовый цвет. Интенсивность этого окрашивания измеряли на спектрофотометре после охлаждения проб. Для этого растворы помещали в кюветы с длиной оптического пути 1 см и на спектрофотометре Cary 50 (Varian Agilent Technologies, Австралия) измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 535 нм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Величину ОАА рассчитывали по следующей формуле:

$$ОАА = \frac{E_k - E_o}{E_k} \times 100, \quad (5)$$

где ОАА – общая антиоксидантная активность в процентах;

$E_k$  – экстинкция контрольной пробы;

$E_o$  – экстинкция опытной пробы.

#### 2.3.4.4 Определение активности супероксиддисмутазы

Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) использовалась методика, основанная на измерении выраженности подавления образования нитроформаза. Нитроформазан представляет собой окрашенный продукт окисления нитротетразолия супероксидными радикалами, которые образуются при взаимодействии феназинметасульфата и никотинамиддинуклеотида (НАДН) [50].

Для приготовления опытных проб брали 1 мл надосадочной жидкости, полученной в ходе центрифугирования гомогената желудка, добавляли к нему абсолютного спирта – 0,5 мл, хлороформа – 0,25 мл и калия дигидрофосфата – 300 мг. После перемешивания центрифугировали 30 минут при 5000 об/мин. К 0,1 мл полученной надосадочной жидкости добавляли инкубационной смеси – 1,5 мл,

раствора НАДН – 0,05 мл. Растворы оставляли на 10 минут при комнатной температуре.

Для приготовления контрольной пробы смешивали следующие вещества: инкубационную смесь – 1,5 мл, раствор НАДН – 0,05 мл и воду очищенную – 0,1 мл. Смесь также инкубировали 10 минут при комнатной температуре.

Затем полученные растворы помещали в кюветы с длиной оптического пути 1 см и на спектрофотометре Cary 50 (Varian Agilent Technologies, Австралия) измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Активность СОД рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{СОД} = \frac{D_{\text{к}} - D_{\text{о}}}{D_{\text{к}}} \times 100, \quad (6)$$

где СОД – активность супероксиддисмутазы в процентах;

$D_{\text{к}}$  – экстинкция контрольной пробы;

$D_{\text{о}}$  – экстинкция опытной пробы.

#### 2.3.4.5 Определение активности каталазы

Для определения активности каталазы (КАТ) использовалась методика, основанная на измерении выраженности подавления ферментом окисления молибдата натрия перекисью водорода [50].

Опытные образцы готовились следующим образом: в пробирки помещали надосадочной жидкости, полученной в ходе центрифугирования гомогената желудка – 5 мкл и раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$  в концентрации 0,3% – 1 мл.

Для приготовления контрольной пробы 1 мл 0,3% раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$  добавляли к 5 мкл воды очищенной. После перемешивания, пробы оставляли на 10 мин при комнатной температуре, после чего переливали в кювету (длина оптического пути 1 см) для измерения оптической плотности, в которую добавляли 4% раствор

молибдата натрия, с которым происходила реакция с образованием окрашенного желтого продукта. Тотчас измеряли оптическую плотность полученного раствора при 410 нм с помощью спектрофотометра Cary 50 (Varian Agilent Technologies, Австралия). В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Концентрацию КАТ рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{КАТ}(\%) = \frac{D_{\text{к}} - D_{\text{о}}}{D_{\text{к}}} \times 100, \quad (7)$$

где: КАТ – активность каталазы в процентах;

$D_{\text{к}}$  – экстинкция контрольной пробы;

$D_{\text{о}}$  – экстинкция опытной пробы.

#### 2.3.4.6 Определение активности глутатионпероксидазы

Для определения активности глутатионпероксидазы (ГПО) использовали методику, основанную на измерении концентрации восстановленного глутатиона после образования окрашенного продукта в цветной реакции с реактивом Элмана [50].

Контрольную и опытные пробы приготавливали следующим образом: в контрольную пробирку помещали раствор восстанавливающего глутатиона – 800 мкл, в опытные образцы вносили раствор восстанавливающего глутатиона – 830 мкл и надосадочной жидкости, образованной в ходе центрифугирования гомогената желудка – 100 мкл. Пробы инкубировали при температуре 37°C в течение 10 минут. После этого ко всем образцам добавляли раствор гидроперекиси трет-бутила – по 70 мкл и снова инкубировали при 37°C в течение 5 минут. Далее вносили по 200 мкл раствора трихлоруксусной кислоты концентрации 20%. После этого к контрольному образцу также добавляли 100 мкл надосадочной жидкости и центрифугировали образцы при 2500 об/мин в течение 15 минут. В другие пробирки перенесли 50 мкл полученного в ходе центрифугирования супернатанта, добавили 0,1М раствора трис-НСl-буфер

(рН=8,5) –5 мл и реактива Элмана – 50 мкл. Пробирки оставляли при комнатной температуре на 5 минут, после чего растворы помещали в кюветы с длиной оптического пути 1 см и на спектрофотометре Cary 50 (Varian Agilent Technologies, Австралия) измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 412 нм. В качестве раствора сравнения использовалась вода очищенная.

Концентрацию ГПО рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{ГПО} = \frac{D_{\text{к}} - D_{\text{о}}}{D_{\text{к}}} \times 100, \quad (8)$$

где ГПО – активность глутатионпероксидазы в процентах;

$D_{\text{к}}$  – экстинкция контрольной пробы;

$D_{\text{о}}$  – экстинкция опытной пробы.

### **2.3.5 Анализ аминокислотного состава пептидного комплекса из тканей свиных почек**

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

Ход пробоподготовки: брали навеску пептидного комплекса из тканей почек свиньи – 100 мг и помещали в вials для гидролиза, к ней добавляли 10 мл 6М соляной кислоты. При нагревании до 110°C в течение 16 часов проводился гидролиз белков и пептидов до аминокислот. После гидролиза пробу охлаждали при комнатной температуре и профильтровали через мембранный фильтр (диаметр пор 0,22 мкм). 50 мкл полученного гидролизата отбирали и помещали в стеклянный бюкс вместимостью 10-15 мл, чтобы выпарить досуха в струе теплого воздуха. В бюкс к полученному осадку вносили 0,1М раствора натрия карбоната – 150 мкл и фенилизотионционата в изопропиловом спирте – 300 мкл. Данную смесь инкубировали в течение 35 минут при комнатной температуре. Затем раствор

снова выпаривали досуха, а остаток растворяли в 0,5 мл дистиллированной воды. Раствор центрифугировали при 7000 об/мин в течение 1 минуты, и отбирали надосадочную жидкость для проведения электрофореза.

Проведение электрофореза: использовали капилляр с характеристиками  $L_{эфф}/L_{общ}=65/75$  см,  $ID=50$  мкм. Температуре капилляра  $30C^{\circ}$ , напряжении +25 кВ, скорость ввода пробы 300 мбар/сек. Детектировали при длине волны 200 нм. Расчет проводили методом абсолютной градуировки с использованием стандартных растворов аминокислот различной концентрации.

## 2.4 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).

## **ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **3.1 Влияние пептидного комплекса тканей свиных почек на течение экспериментальной индометацин-индуцированной гастропатии**

Как уже было отмечено ранее, исходным объектом для разработки нового фармакологического средства для коррекции индометацин-индуцированной гастропатии нами был выбран пептидный комплекс из тканей свиных почек. Теоретическими предпосылками для выбора данного объекта стали выявленные ранее антилитогенные свойства пептидного комплекса из тканей свиных почек [10, 16], а также определенная степень схожести некоторых патологических процессов, протекающих при мочекаменной болезни и при язвенной болезни желудка [63, 86, 193, 157, 176, 178].

В этой связи первоначально было необходимо проверить наличие гастропротекторных свойств у пептидного комплекса из тканей свиных почек.

#### **3.1.1 Макро- и микроскопическая оценка состояния слизистой оболочки желудка крыс при применении пептидного комплекса из тканей свиных почек на фоне экспериментальной «индометациновой» гастропатии**

Результаты проведенного морфологического исследования показали, что в данной серии экспериментов у животных контрольной группы в СОЖ индометацин вызывал явления выраженного эрозивного гастрита. При макроскопическом исследовании поверхность СОЖ имела бугристый вид. В СОЖ были отчетливо видны деструктивные изменения в виде глубоких полосовидных и поверхностных точечных эрозий (Рисунок 1).

На этом фоне у крыс подопытной группы фиксировали признаки восстановления структуры СОЖ. При макроскопическом исследовании у данных животных рельеф СОЖ был ровный. Хотя деструктивные изменения в СОЖ были

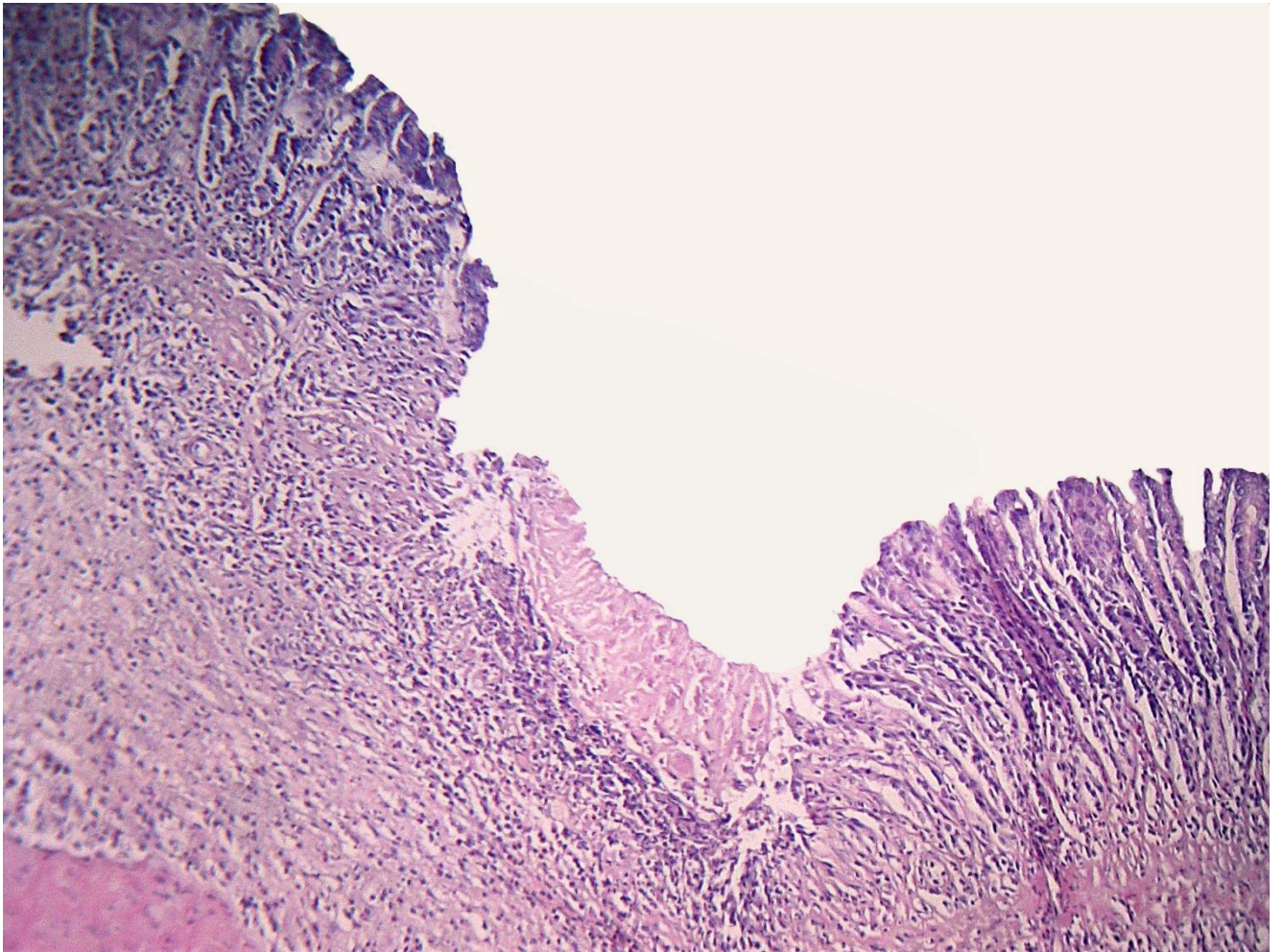


Рисунок 1 – Глубокая полосовидная эрозия в слизистой оболочке желудка крыс контрольной группы

Примечание: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 100.

выявлены у всех крыс, однако они были представлены в основном неглубокими полосовидными и поверхностными точечными эрозиями (Рисунок 2). Число полосовидных эрозий относительно контрольной группы снизилось на 54% ( $p=0,05$ ), а их глубина – на 46% ( $p=0,00002$ ). Индекс Паулса для полосовидных эрозий в подопытной группе был меньше, чем в контроле на 54% (Таблица 4).

При микроскопическом исследовании СОЖ у крыс контрольной группы выглядела атрофичной, покровно-ямочный эпителий находился в состоянии дистрофии. При гистохимическом исследовании по методу ШИК столбчатый эпителий поверхностных отделов СОЖ крыс контрольной группы давал слабую реакцию на нейтральные мукополисахариды. Кислые мукополисахариды были слабо выражены в клетках глубоких отделах желудочных ямок. Некротические изменения в язвенных дефектах достигали мышечного слоя. Во многих эрозиях отмечались массивные отложения солянокислого гематина. Воспалительный инфильтрат был выражен слабо и состоял из лимфоцитов, плазматических клеток и макрофагов. В мышечном слое фиксировались явления отека и умеренно выраженного воспаления. Сосуды СОЖ были полнокровны.

На этом фоне у крыс подопытной группы при гистохимическом исследовании СОЖ по методу ШИК столбчатый эпителий поверхностных отделов СОЖ давал интенсивную реакцию на нейтральные мукополисахариды. Кислые мукополисахариды определялись умеренно в клетках глубоких отделах желудочных ямок. В подслизистом слое определялись явления умеренно выраженного воспаления, воспалительный инфильтрат составляли лимфоциты, плазматические клетки и нейтрофилы. Сосуды были в состоянии умеренно выраженного полнокровия.

Таким образом, проведенные эксперименты показали наличие гастропротекторных свойств у пептидного комплекса из тканей свиных почек при «индометациновой» гастропатии, что проявилось в двукратном снижении количества полосовидных эрозий, уменьшении средней глубины эрозий в 1,9 раза, увеличении толщины слизистой оболочки желудка в 1,2 раза.



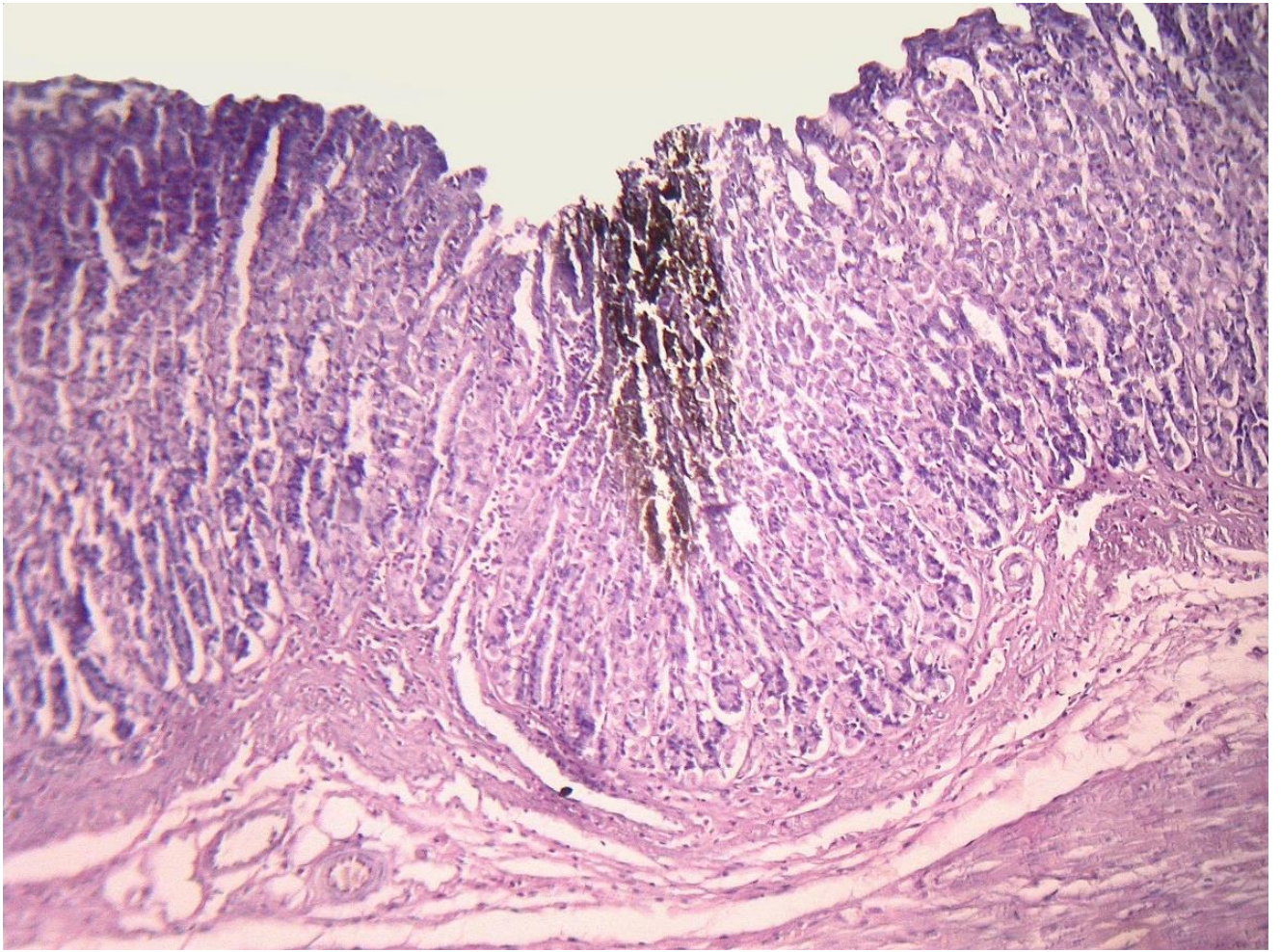


Рисунок 2 – Поверхностная точечная эрозия с большим количеством солянокислого гематина в СОЖ у крыс подопытной группы

Примечание: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 100.

Таблица 4– 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.

На следующем этапе работы предстояло изучить возможные механизмы выявленного эффекта пептидного комплекса из тканей свиных почек при индометацин-индуцированной гастропатии. Учитывая, что аминокислоты и олигопептиды обладают способностью опосредованно регулировать синтез белка в клетках, влияя на генетический аппарат клетки, мы решили проверить, обладает ли изучаемый пептидный комплекс прямым репарационным действием на поврежденные ткани желудка. Для этого было исследовано его влияние на активность ядрышковых организаторов клетки как маркеров биосинтетической активности клеток.

### **3.1.2 Влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек на морфофункциональную активность ядрышковых организаторов в слизистой оболочке желудка при экспериментальной «индометациновой» гастропатии**

Оценка морфофункциональной активности ЯО в клетках шеечных отделов СОЖ контрольной группы крыс показала, что число ядрышек составило  $2,9 \pm 0,30$  на 1 ядро. Площадь AgNORs на 1 ядро в среднем составила  $4,5 \pm 0,40$  мкм<sup>2</sup>. Средняя площадь ядра составила –  $34,9 \pm 2,50$  мкм<sup>2</sup>. Соотношение Ядр/Яд составило –  $0,18 \pm 0,04$  отн.ед. (Рисунок 3). При оценке морфофункциональной активности ЯО в клетках шеечных отделов СОЖ подопытной группы животных выявлено, что число ядрышек составило  $1,2 \pm 0,10$  на 1 ядро. Площадь AgNORs составила  $1,7 \pm 0,10$  мкм<sup>2</sup> на 1 ядро. Средняя площадь ядра составила  $17,2 \pm 0,90$  мкм<sup>2</sup>. Ядр/Яд соотношение составило  $0,10 \pm 0,005$  отн.ед. (Рисунок 4). При сравнении полученных результатов отмечалось, что все показатели морфофункциональной активности ядрышковых организаторов в клетках СОЖ крыс подопытной группы были значительно меньше соответствующих показателей в контрольной группе: число ядрышек на 1 ядро меньше в 2,4 раза ( $p=0,001$ ), площадь AgNORs – меньше в 2,6 раза ( $p=0,000003$ ), площадь ядра – в 2 раза ( $p=0,000004$ ).

Результаты проведенного исследования показали, что при индометациновом повреждении СОЖ крыс контрольной группы в клетках шейчных отделов СОЖ

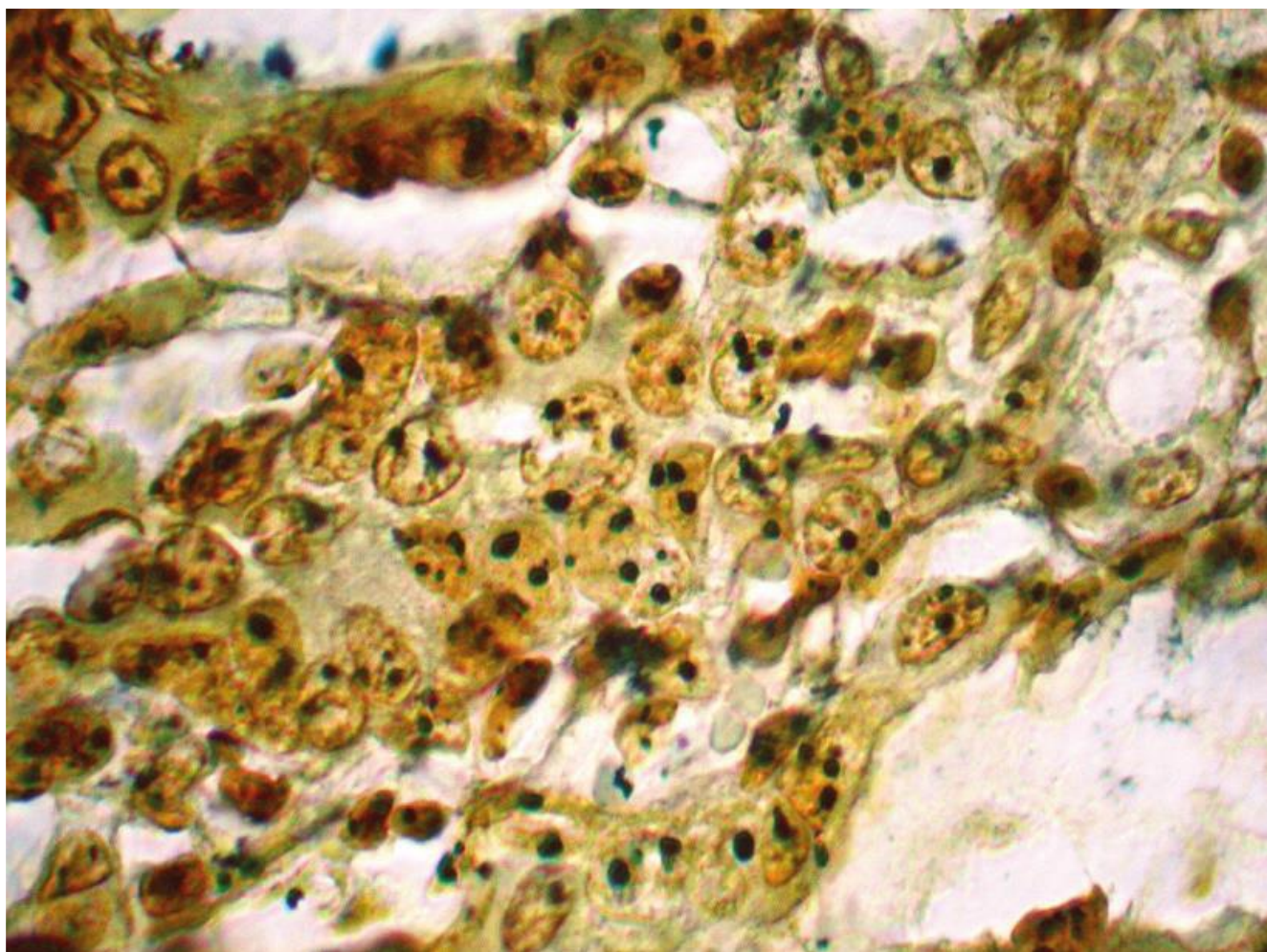


Рисунок 3 – Высокая активность ядрышковых организаторов в клетках шейчных отделах СОЖ крыс контрольной группы

Примечание: Серебрение по Боброву И.П.

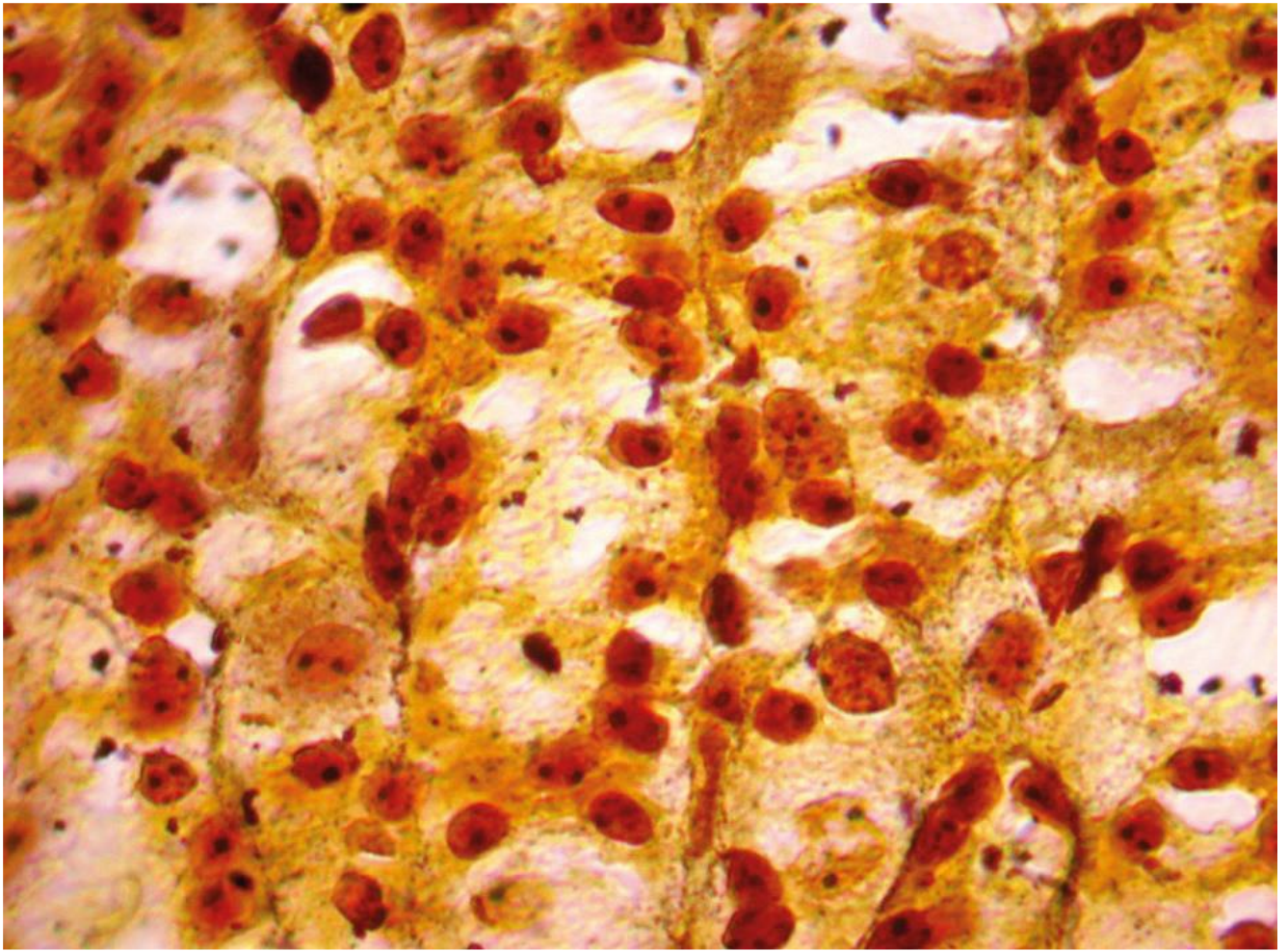


Рисунок 4 – Невысокая активность ядрышковых организаторов в клетках шеечных отделах СОЖ крыс подопытной группы

Примечание: Серебрение по Боброву И.П.

отмечалась высокая площадь ядра и высокие показатели морфофункциональной активности ядрышковых организаторов, что может свидетельствовать о значительной активности и скорости пролиферативных процессов в шеечных областях. Как известно, при эрозировании СОЖ в зоне повреждения значительно изменяются процессы пролиферации. Формирование дефекта обусловлено гибелью эпителиоцитов в СОЖ в следствие деструктивных процессов и апоптоза. Соответственно, компенсаторно в эпителии СОЖ возникают процессы гиперрегенерации [1].

В подопытной группе в клетках шеечных отделов СОЖ площадь ядра была небольшая, а параметры морфофункциональной активности ЯО невысокие, что может свидетельствовать о небольшой активности и скорости пролиферативных процессов в СОЖ. Учитывая низкую активность биосинтетических процессов в клетках СОЖ в подопытной группе по сравнению с контролем, можно предположить, что механизм антиульцерогенного действия пептидного комплекса не связан напрямую со стимуляцией регенерации ткани. Не исключено, что задействуются иные механизмы, препятствующие изъязвлению слизистой под влиянием индометацина.

Учитывая, что в основе ульцерогенного 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 крыс.

### 3.1.3 Влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек на уровень экспрессии ЦОГ-1,2 в слизистой оболочке желудка при экспериментальной «индометациновой» гастропатии

В результате проведенных экспериментов установлено, что концентрация ЦОГ-1 в плазме крови животных контрольной группы равнялась  $1,0 \pm 0,11$  нг/мл (Рисунок 5). В подопытной группе величина описываемого показателя оказалась идентичной и составила  $1,0 \pm 0,11$  нг/мл. Концентрация ЦОГ-1 в гомогенате желудков крыс контрольной группы равнялась  $5,4 \pm 0,26$  нг/мл, а в подопытной группе –  $5,6 \pm 0,27$  нг/мл. Статистически значимых различий между группами не наблюдалось.

Концентрация ЦОГ-2 в плазме крови крыс контрольной группы и подопытной группы значительно не различалась и составила  $0,75 \pm 0,02$  и  $0,74 \pm 0,02$  соответственно. В то же время, в гомогенате желудков крыс величина данного показателя между группами существенно различалась (Рисунок 6). Оказалось, что у интактных животных концентрация ЦОГ-2 в СОЖ находилась на уровне  $3,1 \pm 0,17$  нг/мл. При этом в контроле заболевания 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 ( $p=0,000004$ ).

Суммируя вышеизложенное, отметим, что введение пептидного комплекса из тканей свиных почек никак не повлияло на уровень экспрессии ЦОГ-1 ни в плазме крови, ни в желудке. Этот результат вполне объясним и согласуется с данными литературы. Стоит в очередной раз заметить, что ЦОГ-1, являясь конститутивным ферментом, отвечает за выработку ПГ, которые важны для гомеостатических функций, таких как поддержание целостности слизистой оболочки желудка, обеспечение нормальной функции тромбоцитов, регуляция почечного кровотока. В базальных условиях экспрессия ЦОГ-1 всегда активна

[83, 108, 170]. Экспериментальные данные, полученные другими учеными, показывают, что при подавлении ЦОГ-1 в желудке скоординировано повышается экспрессия м-РНК ЦОГ-2, при этом экспрессия м-РНК ЦОГ-1 остается неизменной. Данный эффект наблюдался как при введении селективного ингибитора ЦОГ-1, так и при введении неселективного индометацина. [217]. Так как уровень ЦОГ-1 в нашем эксперименте не определялся для интактных крыс, нельзя проверить изменение активности этого фермента для контрольной группы относительно здоровых животных. Стабильность же активности данного фермента в условиях введения пептидного комплекса не удивительна и объясняется базальной экспрессией его м-РНК.

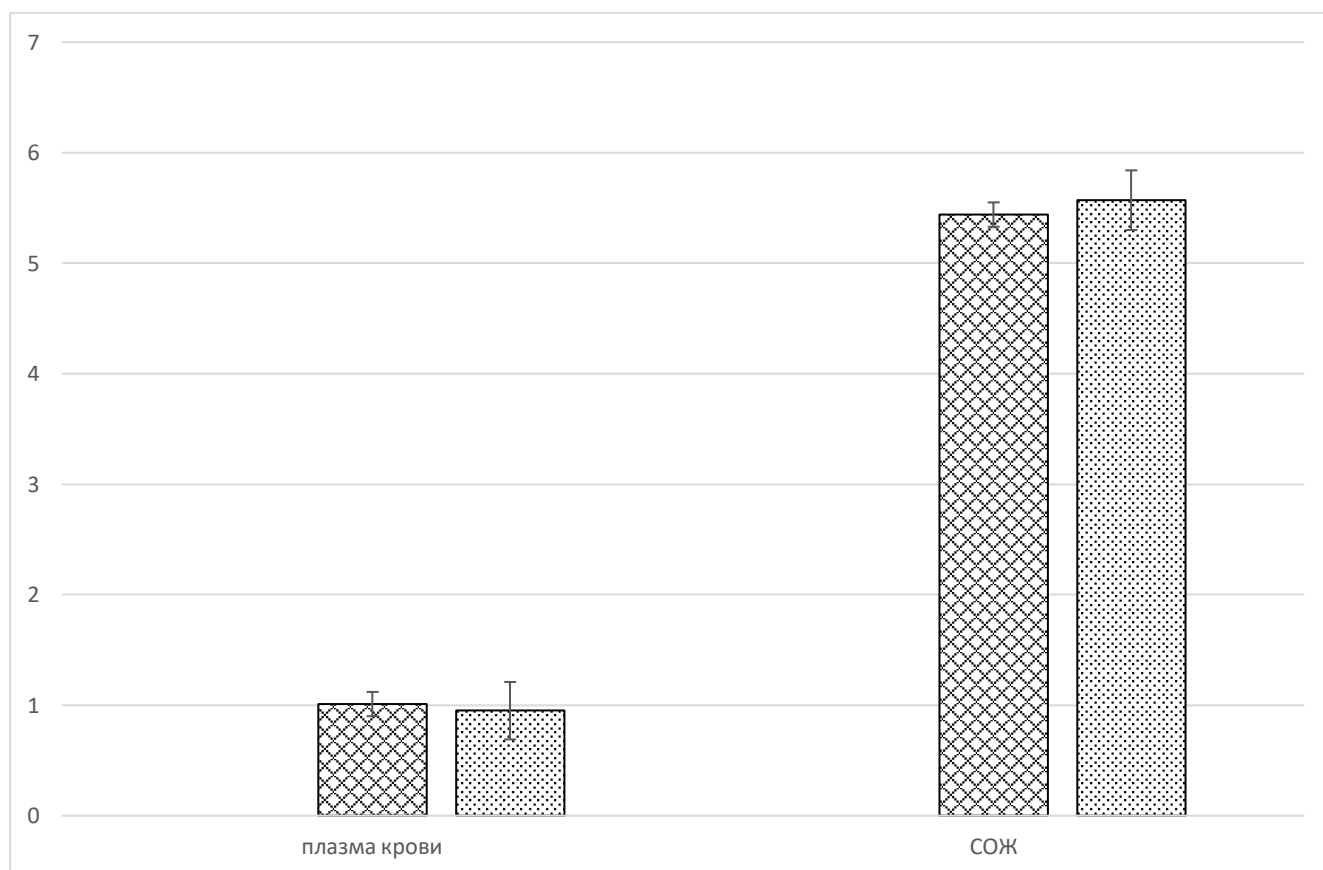




Рисунок 5 – Показатели концентрации ЦОГ-1 в плазме крови и гомогенате желудков крыс контрольной группы и подопытной группы

Примечание: По горизонтальной оси – название биологического материала, в котором измерялась концентрация ЦОГ-1. По вертикальной оси – значение показателя концентрации ЦОГ-1 в нг/мл.  – контрольная группа,  – подопытная группа.

Значения представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего.



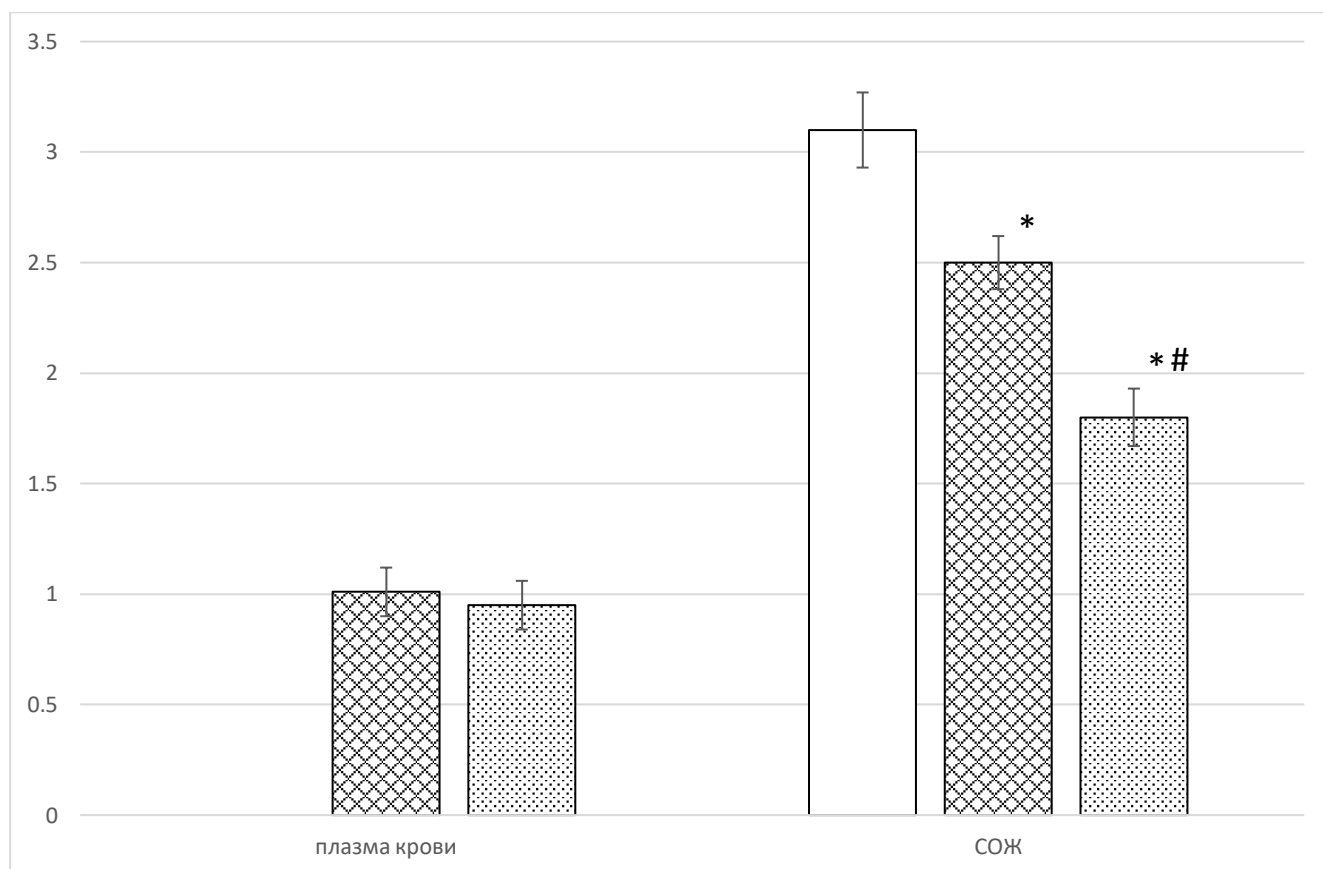


Рисунок 6 – Показатели концентрации ЦОГ-2 в плазме крови и гомогенате желудков интактных крыс, крыс контрольной группы и подопытной группы

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.

В то же время, наблюдались весьма примечательные изменения в уровне экспрессии ЦОГ-2 в желудках крыс. Оказалось, что в контрольной группе величина данного показателя существенно снижалась по сравнению со здоровыми животными. В данном случае, несмотря на повышение экспрессии м-РНК ЦОГ-2, которое ожидается в случае применения индометацина, активность фермента снижена. Объяснить этот эффект можно следующим образом. Полученные данные не опровергают повышенной экспрессии м-РНК, так как использованный нами метод ИФА, основанный на принципе «двойного сэндвича» детектирует молекулу фермента напрямую. Причем предварительно покрывающее микропланшет антитело представляет собой моноклональное антитело к ЦОГ-2 крысы. Моноклональные антитела связываются только с одной антигенной детерминантой (эпитопом) [105]. Детектирующее же антитело в наборе представляет собой поликлональное антитело, меченное биотином. Поликлональные антитела могут связываться с несколькими антигенными детерминантами, которые представлены в молекуле ЦОГ-2. Учитывая этот факт, неочевидно, что детектирующее антитело в равной степени связалось со всем молекулами, адгезированными к поверхности планшета. Наличие прямой ингибирующей активности индометацина в отношении молекулы фермента могло стать препятствием для связывания антител с эпитопом, находящимся в активном центре фермента. Поэтому даже при наличии большей концентрации фермента, если таковая имела место, усложнение детекции неактивной ЦОГ-2 могла привести к менее интенсивной окраске раствора контрольной группы относительно интактных крыс.

При этом в подопытной группе, где вводился объект исследования, наблюдалось еще более выраженное снижение экспрессии ЦОГ-2 даже по сравнению с контролем заболевания. Согласно литературным источникам, ЦОГ-2 является продуктом непосредственного раннего гена (ген первичного ответа), который очень быстро индуцируется и жестко регулируется. В базальных условиях экспрессия ЦОГ-2 сильно ограничена, однако м-РНК ЦОГ-2 резко повышается во время воспаления под действием провоспалительных цитокинов

[78, 83, 108, 170]. На наш взгляд, это указывает на ослабление воспалительных процессов, протекающих в слизистой оболочке желудка на фоне «индометациновой» гастропатии. Принимая во внимание тот факт, что ослабление воспаления на фоне индометацина не может быть объяснено уменьшением синтеза простагландинов, возникло предположение, что в основе данного эффекта лежат иные причины, которые предстояло изучить.

### **3.1.4 Влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек на активность процесса свободнорадикального окисления в слизистой оболочке желудка при экспериментальной «индометациновой» гастропатии**

Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице 5. Оказалось, что концентрация ТБРП в гомогенате желудков крыс контрольной группы была несколько выше, чем у интактных животных. На этом фоне в подопытной группе, где вводился пептидный комплекс из тканей свиных почек, величина данного показателя уменьшилась по сравнению с контролем заболевания в 2,3 раза ( $p=0,000002$ ) и была даже 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.

Таблица 5 – 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>интг</sub> =0,009 +74%	65,9±2,74* p <sub>интг</sub> =0,0001 +41%	35,3±0,99
Подопытная группа	4,5±0,29* p <sub>к</sub> =0,000002 -56% p <sub>интг</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>интг</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.

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 существенно не различались.

Таким образом, установлено, что при применении пептидного комплекса из тканей свиных почек на фоне экспериментальной «индометациновой» гастропатии происходит существенное ослабление оксидативного стресса, возникающего в СОЖ при патологии. Об этом свидетельствовали значительное снижение концентрации ТБРП и нормализация активности антиоксидантных ферментов СОД и ГПО. Выявленный антиоксидантный эффект может рассматриваться как возможный механизм гастропротекторного действия пептидного комплекса из тканей свиных почек.

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 репарационным действием на ткани желудка пептидный комплекс не обладает. Совокупность выявленных эффектов обосновывает перспективу разработки на основе данного биоматериала новых гастропротекторных средств пептидной природы.

### 3.2 Определение аминокислотного состава пептидного комплекса тканей свиных почек и драг-дизайн химических структур индивидуальных олигопептидов

После гидролиза пептидного комплекса соляной кислотой для идентификации входящих в его состав аминокислот был проведен капиллярный электрофорез пробы. Электрофореграмма пептидного комплекса представлена на рис. 7.

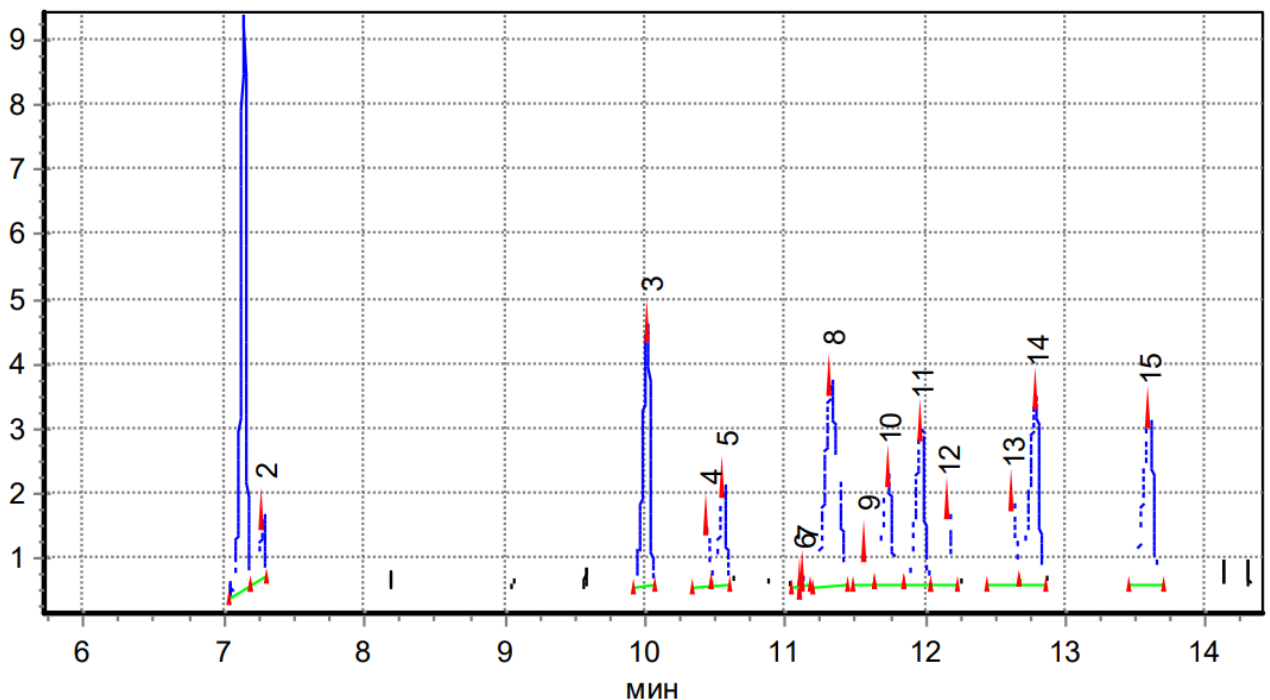


Рисунок 7 – Электрофореграмма пептидного комплекса из тканей свиных почек

Результаты определения аминокислотного состава пептидного комплекса из тканей свиных почек свидетельствуют о том, что в его состав вошли аминокислоты аргинин ( $t_{уд}=7,277$  мин), лизин ( $t_{уд}=10,018$  мин), тирозин ( $t_{уд}=10,432$  мин), фенилаланин ( $t_{уд}=10,562$  мин), гистидин ( $t_{уд}=11,110$  мин), лейцин и изолейцин – двоянный пик ( $t_{уд}=11,327$ ), метионин ( $t_{уд}=11,575$  мин), валин ( $t_{уд}=11,732$ ), пролин ( $t_{уд}=11,968$  мин), треонин ( $t_{уд}=12,153$  мин), серин ( $t_{уд}=12,613$  мин), аланин ( $t_{уд}=12,785$  мин), глицин ( $t_{уд}=13,595$  мин).

Всего было идентифицировано 14 аминокислот с суммарной массовой долей 49,867%. Оставшиеся 50,133% компонентов состава, по-видимому, имели не пептидную или аминокислотную природу.

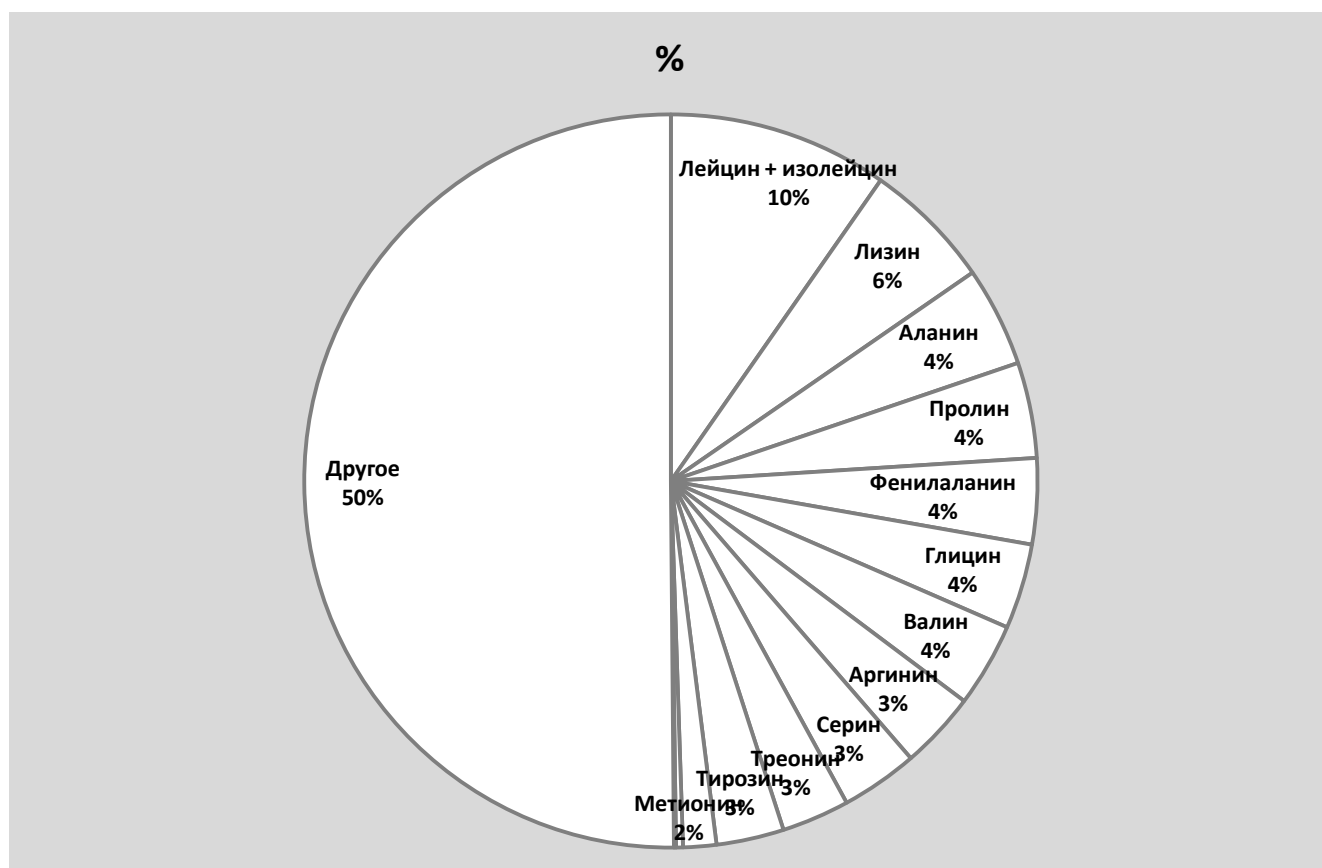


Рисунок 8 – Массовые доли аминокислот, идентифицированных в составе пептидного комплекса из тканей свиных почек

Примечание: Идентифицированные аминокислоты гистидин и триптофан имели массовую долю менее 1% и на рисунке не представлены

Методика определения дизайна олигопептидов основана на литературных данных по работам других ученых, которые применяли подобный метод в своих исследованиях. Согласно методу, аминокислотные последовательности определяются на основе исследования рангового порядка аминокислот в составе комплексных пептидных препаратов. Для этого определяется процентная доля аминокислоты в препарате, и в порядке ее уменьшения наращивается аминокислотная цепь [21, 39, 40].

В качестве «ядра» молекулы были выбраны 2 аминокислоты с наибольшей массовой долей. Затем последовательно присоединялись аминокислоты по мере убывания их массовой доли. Длина аминокислотной цепи в пептиде ограничивалась 9-ю аминокислотами. Таким образом, был осуществлен драг-

дизайн 7-и молекул олигопептидов, которые в дальнейшем являлись основными объектами исследования.

«Ядро» молекулы

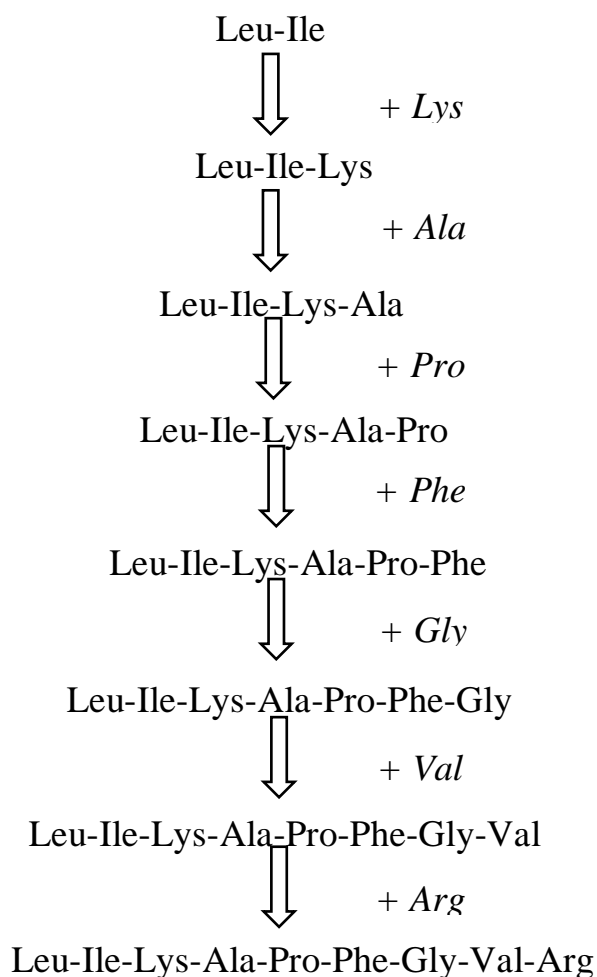


Рисунок 9 – Схема моделирования химических структур индивидуальных олигопептидов с потенциальной гастропротекторной активностью

### 3.3 Скрининг гастропротекторной активности олигопептидов в условиях экспериментальной индометацин-индуцированной гастропатии

Результаты скрининга гастропротекторной активности олигопептидных соединений представлены в таблицах 7-13. В качестве препаратов сравнения были выбраны омепразол, ранитидин и мизопростол.



Как следует из представленных таблиц, гастропротекторную активность проявили 3 из 7-и изучаемых пептидов, а именно трипептид Leu-Ile-Lys, тетрапептид Leu-Ile-Lys-Ala и гексапептид Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe. При этом наиболее выраженное терапевтическое действие проявил трипептид Leu-Ile-Lys, эффекты которого были сопоставимы с таковыми у препарата сравнения омепразол.

Оказалось, что у крыс, получавших трипептид Leu-Ile-Lys, макроскопически СОЖ выглядела ровной, атрофических изменений обнаружено не было. Деструктивные изменения имели невыраженный характер, они проявлялись лишь в виде мелких точечных эрозий (Рисунок 10). 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% (Таблица 6).

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

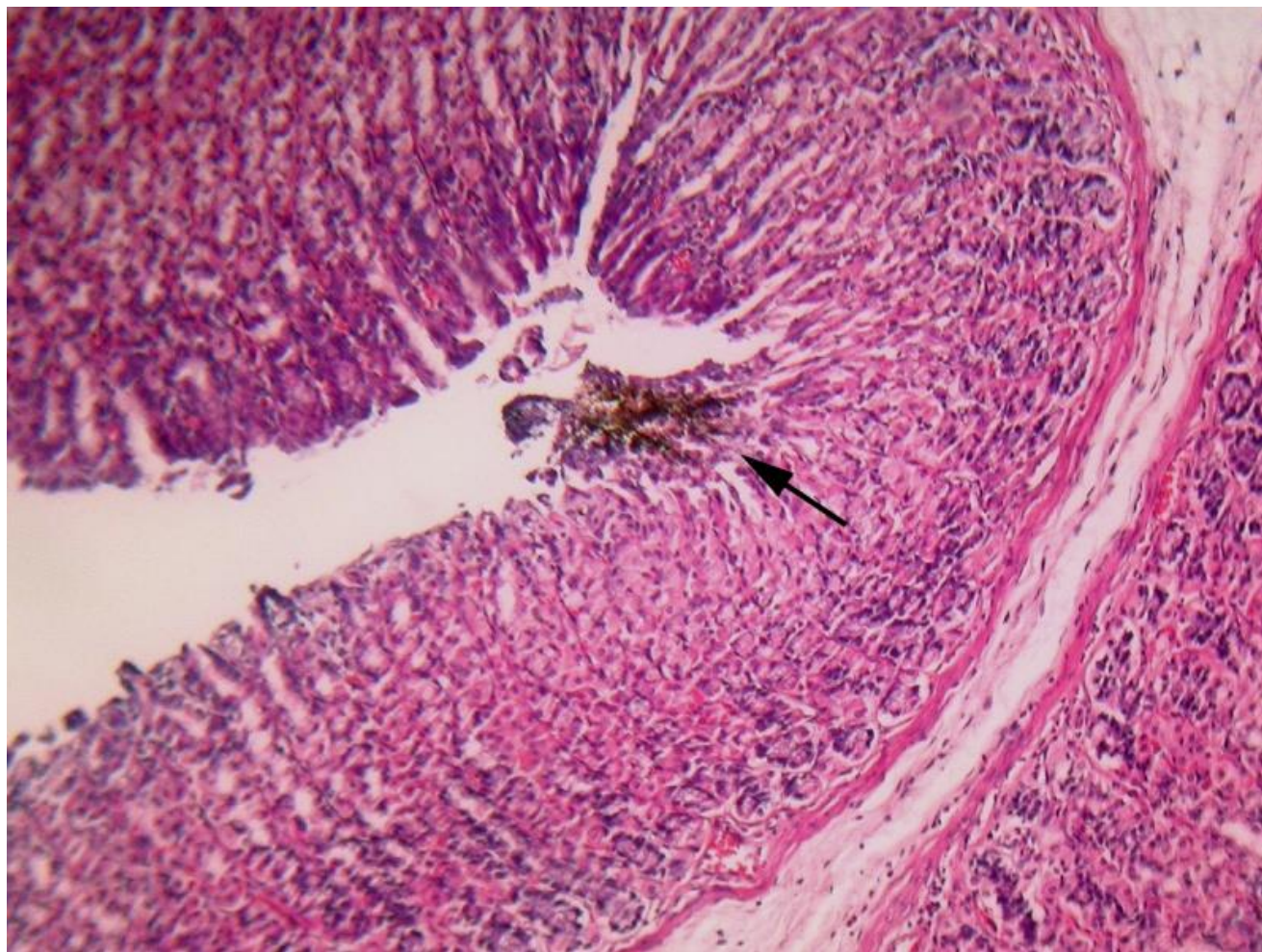


Рисунок 10 – Точечная эрозия с небольшим отложением солянокислого гематина в слизистой оболочке желудка у крыс группы трипептида Leu-Ile-Lys (показана стрелкой)

Примечание: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 100.

Таблица 6 – Макро- и микроскопические показатели структуры слизистой оболочки желудка у крыс при применении трипептида Leu-Phe-Lys в условиях экспериментальной индометациновой гастропатии

	Контрольная группа	Группа трипептида Leu-Phe-Lys	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 6

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

Примечание:  $p_k$  – уровень статистической значимости различия соответствующего показателя по сравнению с контрольной группой.  $p_n$  – уровень статистической значимости различия соответствующего показателя по сравнению с группой трипептида Leu-Ile-Lys.

У экспериментальных животных группы тетрапептида Leu-Ile-Lys-Ala при макроскопическом исследовании рельеф СОЖ был в основном ровный, определялись единичные бугристые участки (Рисунок 11). 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. 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 ( $p=0,00001$ ) (Таблица 7).

В группе пентапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro при макроскопическом исследовании рельеф СОЖ был бугристый, неровный, складки были утолщены. Отмечали атрофические изменения СОЖ (Рисунок 12). Повреждения были представлены длинными не глубокими и глубокими полосовидными эрозиями, достигающими до середины толщины слизистой оболочки, и точечными эрозиями. Количество эрозий в среднем достоверно не отличалось от значений контрольной группы, однако на 72% меньше оказалась глубина обнаруженных эрозий ( $p<0,000001$ ), на 34% снизилась плотность воспалительного инфильтрата ( $p=0,001$ ) (Таблица 8).

У крыс группы гексапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe 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 (Рисунок 13). 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 Leu-Ile-Lys-Ala-Pro статистически значимо не отличалось от показателя группы омепразола. Средняя глубина эрозий оказалась достоверно меньше, чем при применении омепразола (Таблица 9).

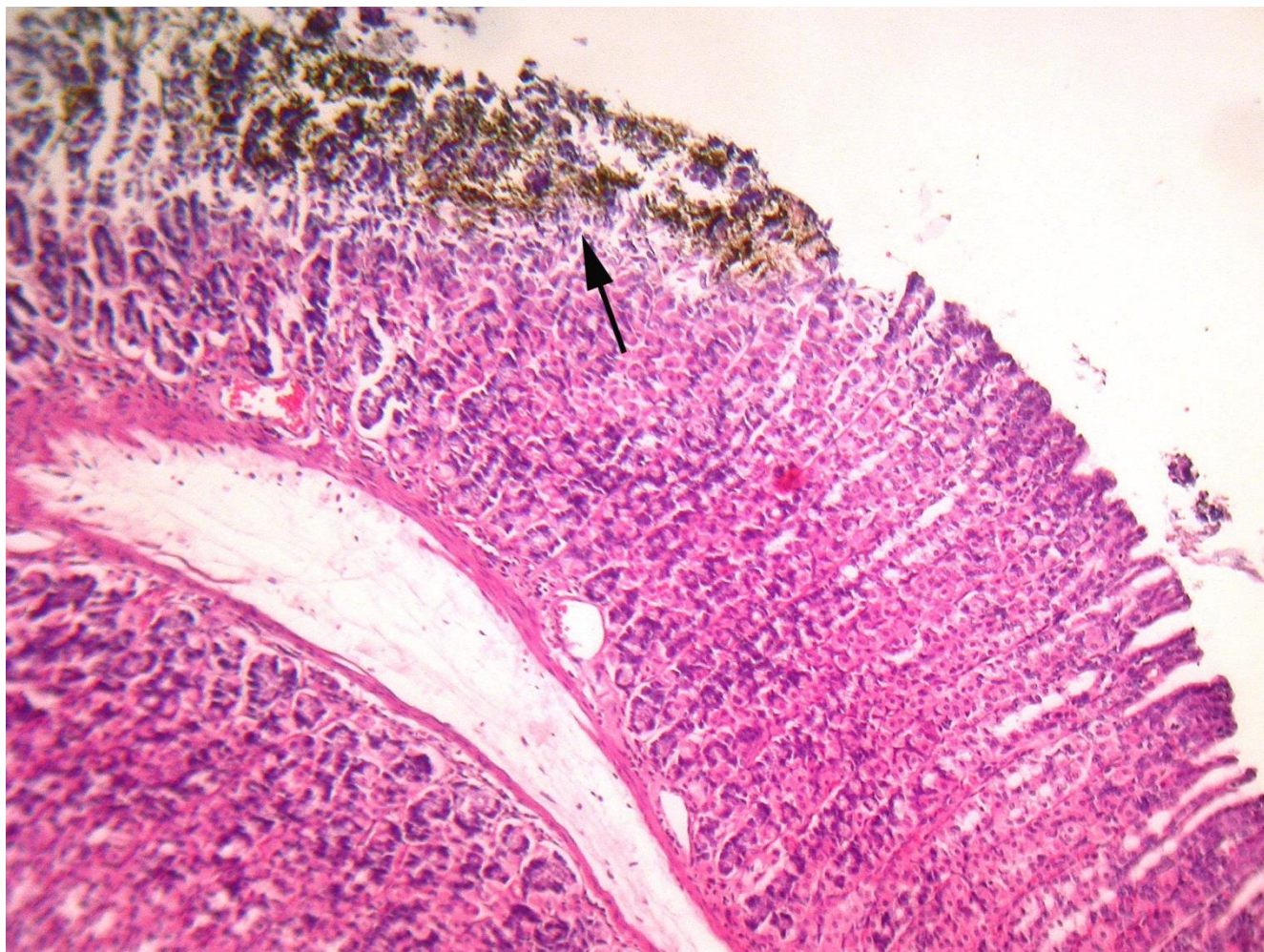


Рисунок 11 – Точечная поверхностная эрозия в слизистой оболочке желудка у крыс группы тетрапептида Leu-Phe-Lys-Ala (показана стрелкой)

Примечание: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 100.

Таблица 7 – Макро- и микроскопические показатели структуры оболочки желудка у крыс при применении тетрапептида Leu-Ile-Lys-Ala в условиях экспериментальной индометациновой гастропатии

	Контрольная группа	Группа тетрапептида Leu-Ile-Lys-Ala	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 7

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 $p_k < 0,000001$ +65%	609,7±13,70 $p_k < 0,000001$ +82% $p_n = 0,03$ +10%	496,1±25,20 $p_k = 0,000007$ +48%	391,5±10,70 $p_k = 0,0005$ +17% $p_n = 0,0000002$ -29%
Средняя глубина эрозий (мкм)	385,8±23,70	78,5±150 $p_k < 0,000001$ -80%	115,8±5,20 $p_k < 0,000001$ -70% $p_n = 0,03$ +47.5%	283,9±17,00 $p_k = 0,0004$ -26.4% $p_n < 0,0000001$ +262%	321,9±20,60 $p_k < 0,000001$ +310%
Средняя плотность воспалительного инфильтрата в 1 мм <sup>2</sup> СОЖ	1333,3±70,50	800±46,20 $p_k = 0,00001$ -40%	1040,0±211,70	1520,0±122,20 $p_n = 0,000005$ +90%	2106,7±70,50 $p_k = 0,0000003$ +58% $p_n < 0,0000001$ +163%

Примечание:  $p_k$  – уровень статистической значимости различия соответствующего показателя по сравнению с контрольной группой.  $p_n$  – уровень статистической значимости различия соответствующего показателя по сравнению с группой тетрапептида Leu-Phe-Lys-Ala



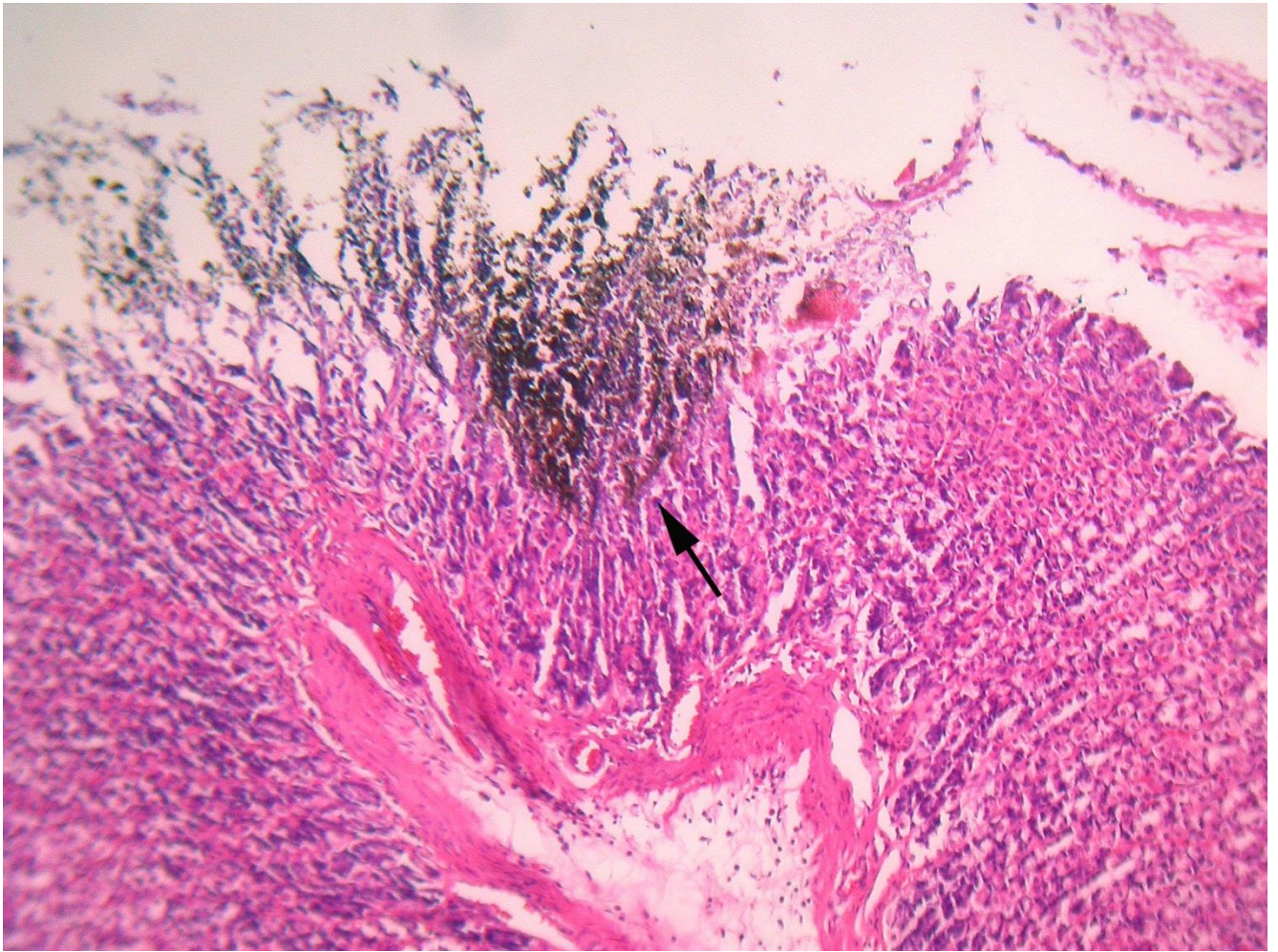


Рисунок 12 – Глубокая полосовидная эрозия в слизистой оболочке желудка у крыс группы пентапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro (показана стрелкой)

Примечание: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 100.

Таблица 8 – Макро- и микроскопические показатели структуры слизистой оболочки желудка у крыс при применении пентапептида Leu-Phe-Lys-Ala-Prov условиях экспериментальной индометациновой гастропатии

	Контрольная группа	Группа пентапептида Leu-Phe-Lys-Ala-Pro	Группа омега-3	Группа ранидина	Группа мизопростол
Среднее число поврежденных СОЖ	9,6±1,70	8,0±2,70	1,4±0,40 p <sub>к</sub> =0,0003 -85% p <sub>п</sub> =0,03 -83%	11,4±2,80	14,6±2,80
Среднее число полосовидных эрозий	4,8±0,90	3,75±2,25	0 p <sub>к</sub> =0,0001 -100%	6,5±2,20	8,0±2,10
Процент поражения полосовидными эрозиями (%)	100	50	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	8 -17%	1,4 -85%	11,4 +19%	14,6 +52%

Продолжение Таблицы 8

Индекс Паулса полосовидных эрозий	4,8	1,9 0%	0 -100%	5,2 -78%	6,4 -73%
Индекс Паулса для точечных эрозий	4,6	4,25 %	1,4 -92%	6,2 -63	9,2 -45%
Средняя толщина СОЖ (мкм)	335,6±12,40	387,3±16,30 p <sub>к</sub> =0,02 +15%	609,7±13,70 p <sub>к</sub> <0,000001 +82% p <sub>п</sub> <0,000001 +57%	496,1±25,20 p <sub>к</sub> =0,00007 +48% p <sub>п</sub> =0,002 +28%	391,5±10,70 p <sub>к</sub> =0,005 +17%
Средняя глубина эрозий (мкм)	385,8±23,70	107,9±9,50 p <sub>к</sub> <0,000001 -72%	115,8±5,20 p <sub>к</sub> <0,000001 -70%	283,9±17,00 p <sub>к</sub> =0,004 -26,4% p <sub>п</sub> <0,000001 +163%	321,9±20,60 p <sub>к</sub> <0,000001 +198%
Средняя плотность воспалительного инфильтрата в 1 мм <sup>2</sup> СОЖ	1333,3±70,50	880±92,30 p <sub>к</sub> =0,001 -34%	1040,0±211,70	1520,0±122,20 p <sub>к</sub> =0,0008 +73%	2106,7±70,50 p <sub>к</sub> =0,000003 +58% p <sub>п</sub> <0,000001 +139%

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 пентапептида Leu-Phe-Lys-Ala-Pro

В группах пептидов Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly, Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val, Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val-Arg сколь-нибудь значимого гастропротекторного действия выявлено не было, либо вовсе наблюдалось усугубление протекания экспериментальной патологии (Таблицы 10-12). При макроскопическом исследовании рельеф СОЖ был бугристый, неровный, складки были выражены. Отмечали атрофические изменения СОЖ. Повреждения были представлены длинными глубокими полосовидными эрозиями, доходящими до нижней трети СОЖ и точечными эрозиями. В подслизистом слое были видны явления умеренно выраженного воспаления, сосуды были расширены, полнокровны (Рисунки 14-16).

Таким образом, суммируя вышеизложенное, отметим, что в ходе проведенного скрининга индивидуальных олигопептидов было установлено, что пептиды Leu-Ile-Lys, Leu-Ile-Lys-Ala, Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe проявляют гастропротекторную активность ( $ПА_{\text{Leu-Ile-Lys}}=5,3$ ;  $ПА_{\text{Leu-Ile-Lys-Ala}}=2,1$ ;  $ПА_{\text{Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe}}=4,3$ ), причём активность трипептида Leu-Ile-Lys по результатам макро- и микроскопического исследования была наиболее близка к эффекту препарата сравнения омепразола.

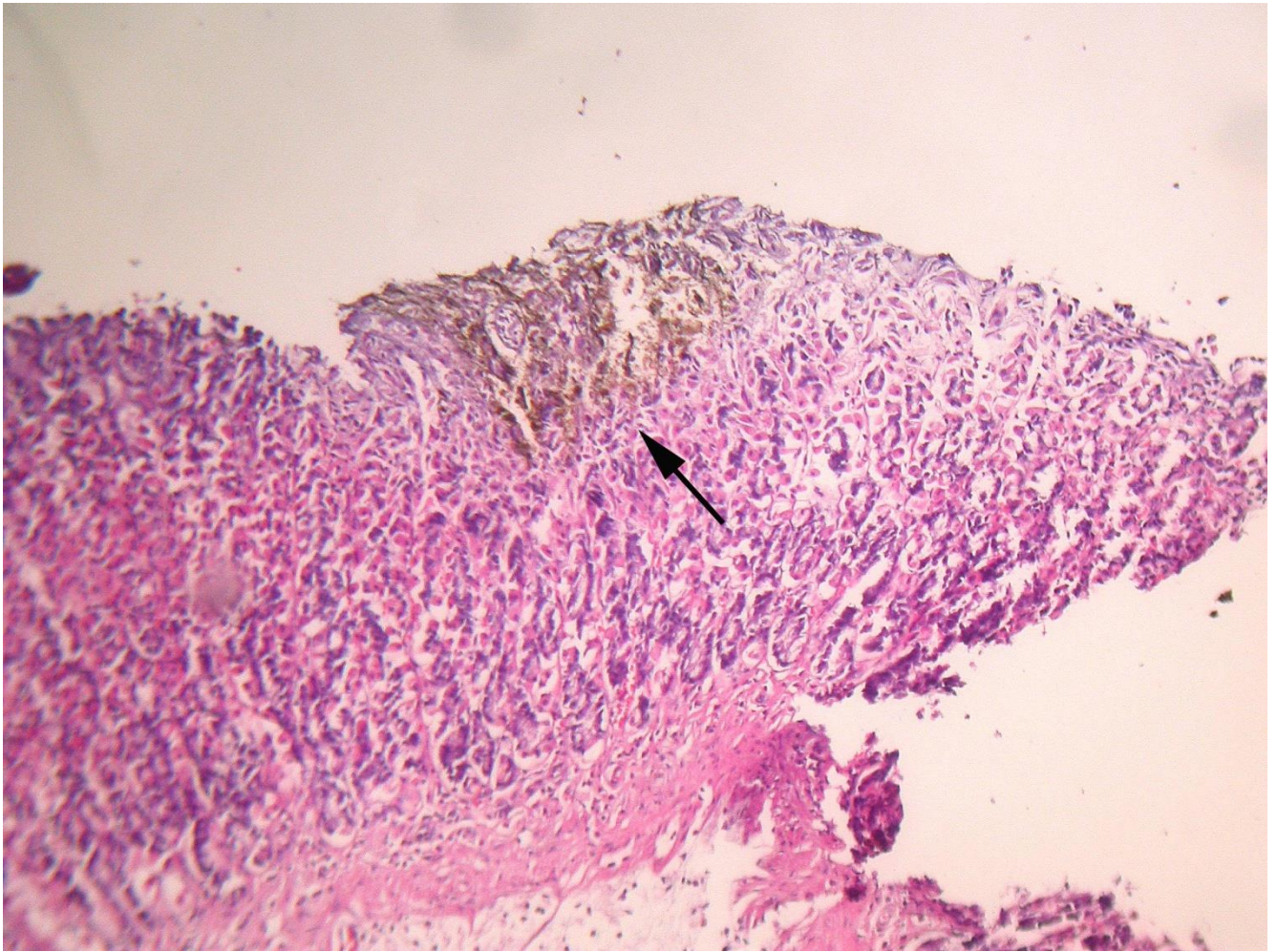


Рисунок 13 – Точечная поверхностная эрозия со слабым отложением солянокислого гематина в слизистой оболочке желудка у крыс группы гексапептида Leu-Phe-Lys-Ala-Pro-Phe (показана стрелкой)

Примечание: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 100.

Таблица 9 – Макро- и микроскопические показатели структуры оболочки желудка у крыс при применении гексапептида Leu-Phe-Lys-Ala-Pro-Phe в условиях экспериментальной индометациновой гастропатии

	Контрольная группа	Группа гексапептида Leu-Phe-Lys-Ala-Pro-Phe	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 9

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 $p_k < 0,000001$ +34%	609,7±13,70 $p_k < 0,000001$ +82% $p_n = 0,000001$ +28%	496,1±25,20 $p_k = 0,00007$ +48%	391,5±10,70 $p_k = 0,0005$ +17% $p_n = 0,000003$ -18%
Средняя глубина эрозий (мкм)	385,8±23,70	94,8±5,60 $p_k < 0,000001$ -75%	115,8±5,20 $p_k < 0,000001$ -70% 720±46,20 $p_n = 0,000003$ -46%	283,9±17,00 $p_k = 0,004$ -26% $p_n < 0,000001$ +199%	321,9±20,60 $p_k < 0,000001$ +240%
Средняя плотность воспалительного инфильтрата в 1 мм <sup>2</sup> СОЖ	1333,3±70,50	720±46,20 $p_k = 0,000003$ -46%	1040,0±211,70	1520,0±122,20 $p_n = 0,00002$ +111%	2106,7±70,50 $p_k = 0,000003$ +58% $p_n < 0,000001$ +193%

Примечание:  $p_k$  – уровень статистической значимости различия соответствующего показателя по сравнению с контрольной группой.  $p_n$  – уровень статистической значимости различия соответствующего показателя по сравнению с группой гексапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe

Таблица 10 – Макро- и микроскопические показатели структуры слизистой оболочки желудка у крыс при применении гептапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Glyв условиях экспериментальной индометациновой гастропатии

	Контрольная группа	Группа гептапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly	Группа омега-3	Группа ранидина	Группа мизопростол
Среднее число поврежденных СОЖ	9,6±1,70	13,0±2,0	1,4±0,40 p <sub>к</sub> =0,0003 -85% p <sub>п</sub> =0,00004 -89%	11,4±2,80	14,6±2,80
Среднее число полосовидных эрозий	4,8±0,90	6,75±1,65	0 p <sub>к</sub> =0,0001 -100% p <sub>п</sub> =0,001 -100%	6,5±2,20	8,0±2,10
Процент поражения полосовидными эрозиями (%)	100	100	0	45,6	42,5
Среднее число точечных эрозий	4,6±1,40	6,25±0,85	1,4±0,40 p <sub>к</sub> =0,04 -70% p <sub>п</sub> =0,0001 -78%	6,2±1,60	9,2±1,70
Процент поражения точечными эрозиями(%)	100	100	100	54,4	57,5
Общий индекс Паулса	9,6	13 +35%	1,4 -85%	11,4 +19%	14,6 +52%



Продолжение Таблицы 10

Индекс Паулса полосовидных эрозий	4,8	6,75 +41%	0 -100%	5,2 -78%	6,4 -73%
Индекс Паулса для точечных эрозий	4,6	6,25 +36%	1,4 -92%	6,2 -63%	9,2 -45%
Средняя толщина СОЖ (мкм)	335,6±12,40	338,5±11,8	609,7±13,70 p <sub>к</sub> <0,000001 +82% p <sub>п</sub> <0,000001 +80%	496,1±25,20 p <sub>к</sub> =0,00007 +48% p <sub>п</sub> =0,000045 +47%	391,5±10,70 p <sub>к</sub> =0,0005 +17% p <sub>п</sub> =0,000005 +83%
Средняя глубина эрозий (мкм)	385,8±23,70	176,1±4,1 p <sub>к</sub> <0,000001 -54%	115,8±5,20 p <sub>к</sub> <0,000001 -70% p <sub>п</sub> <0,000001 -34%	283,9±17,00 p <sub>к</sub> =0,0004 -26% p <sub>п</sub> =0,000002 +61%	321,9±20,60 p <sub>к</sub> =0,000005 +83%
Средняя плотность воспалительного инфильтрата в 1 мм <sup>2</sup> СОЖ	1333,3±70,50	1546,7±141,1	1040,0±211,70	1520,0±122,20	2106,7±70,50 p <sub>к</sub> =0,000003 +58% 0,003 +36%

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 гептапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly

Таблица 11 – Макро- и микроскопические показатели структуры слизистой оболочки желудка у крыс при применении октапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val в условиях экспериментальной индометациновой гастропатии

	Контрольная группа	Группа октапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val	Группа омегапрозола	Группа ранитина	Группа мизопростол
Среднее число поврежденных СОЖ	9,6±1,70	9,5±2,90	1,4±0,40 p <sub>к</sub> =0,0003 -85% p <sub>п</sub> =0,01 -85%	11,4±2,80	14,6±2,80
Среднее число полосовидных эрозий	4,8±0,90	2,5±1,50	0 p <sub>к</sub> =0,0001 -100%	6,5±2,20	8,0±2,10
Процент поражения полосовидными эрозиями (%)	100	50	0	45,6	42,5
Среднее число точечных эрозий	4,6±1,40	7,0±2,90	1,4±0,40 p <sub>к</sub> =0,04 -70%	6,2±1,60	9,2±1,70
Процент поражения точечными эрозиями(%)	100	100	100	54,4	57,5
Общий индекс Паулса	9,6	9,5 -1%	1,4 -85%	11,4 +19%	14,6 +52%

Продолжение Таблицы 11

Индекс Паулса полосовидных эрозий	4,8	1,25 -74%	0 -100%	5,2 -78%	6,4 -73%
Индекс Паулса для точечных эрозий	4,6	7 +52%	1,4 -92%	6,2 -63%	9,2 -45%
Средняя толщина СОЖ (мкм)	335,6±12,40	376,7±11,80 p <sub>к</sub> =0,02 +12%	609,7±13,70 p <sub>к</sub> <0,000001 +82% p <sub>п</sub> <0,000001 +62%	496,1±25,20 p <sub>к</sub> =0,00007 +48% p <sub>п</sub> =0,00006 +32%	391,5±10,70 p <sub>к</sub> =0,0005 +17%
Средняя глубина эрозий (мкм)	385,8±23,70	163,3±8,60 p <sub>к</sub> <0,000001 -58%	115,8±5,20 p <sub>к</sub> <0,000001 -70% p <sub>п</sub> =0,00003 -29%	283,9±17,00 p <sub>к</sub> =0,0004 -26% p <sub>п</sub> =0,00001 +74%	321,9±20,60 p <sub>к</sub> =0,000004 +97%
Средняя плотность воспалительного инфильтрата в 1 мм <sup>2</sup> СОЖ	1333,3±70,50	1253,3±70,50	1040,0±211,70	1520,0±122,20	2106,7±70,50 p <sub>к</sub> =0,0000003 +58% p <sub>п</sub> <0,0000001 +68%

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 октапептида Leu-Phe-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val

Таблица 12 – Макро- и микроскопические показатели структуры слизистой оболочки желудка у крыс при применении нонапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val-Argв условиях экспериментальной индометациновой гастропатии

	Контрольная группа	Группа нонапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val-Arg	Группа омега-3	Группа ранитина	Группа мизопростол
Среднее число поврежденных СОЖ	9,6±1,70	14,5±4,00	1,4±0,40 p <sub>к</sub> =0,0003 -85% p <sub>п</sub> =0,005 -90%	11,4±2,80	14,6±2,80
Среднее число полосовидных эрозий	4,8±0,90	9,0±3,30	0 p <sub>к</sub> =0,0001 -100% p <sub>п</sub> =0,01 -100%	6,5±2,20	8,0±2,10
Процент поражения полосовидными эрозиями (%)	100	75	0	45,6	42,5
Среднее число точечных эрозий	4,6±1,40	5,5±1,00	1,4±0,40 p <sub>к</sub> =0,04 -70% p <sub>п</sub> =0,002 -75%	6,2±1,60	9,2±1,70
Процент поражения точечными эрозиями(%)	100	100	100	54,4	57,5
Общий индекс Паулса	9,6	14,5 +51	1,4 -85%	11,4 +19%	14,6 +52%

Продолжение Таблицы 12

Индекс Паулса полосовидных эрозий	4,8	6,75 -41%	0 -100%	5,2 -78%	6,4 -73%
Индекс Паулса для точечных эрозий	4,6	5,5 +20%	1,4 -92%	6,2 -63%	9,2 -45%
Средняя толщина СОЖ (мкм)	335,6±12,40	328,4±12,60	609,7±13,70 p <sub>к</sub> <0,000001 +82% p <sub>п</sub> <0,000001 +86%	496,1±25,20 p <sub>к</sub> =0,00007 +48% p <sub>п</sub> =0,00003 +51%	391,5±10,70 p <sub>к</sub> =0,0005 +17% p <sub>п</sub> =0,0002 +19%
Средняя глубина эрозий (мкм)	385,8±23,70	190±8,50 p <sub>к</sub> =0,000001 -51%;	115,8±5,20 p <sub>к</sub> <0,000001 -70% p <sub>п</sub> =0,000002 -39%	283,9±17,00 p <sub>к</sub> =0,0004 -26% p <sub>п</sub> =0,00002 +49%	321,9±20,60 p <sub>к</sub> =0,000003 +69%
Средняя плотность воспалительного инфильтрата в 1 мм <sup>2</sup> СОЖ	1333,3±70,50	1466,7±70,50	1040,0±211,70	1520,0±122,20	2106,7±70,50 p <sub>к</sub> =0,0000003 +58% p <sub>п</sub> =0,000001 +44%

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 ноналпептида Leu-Phe-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val-Arg

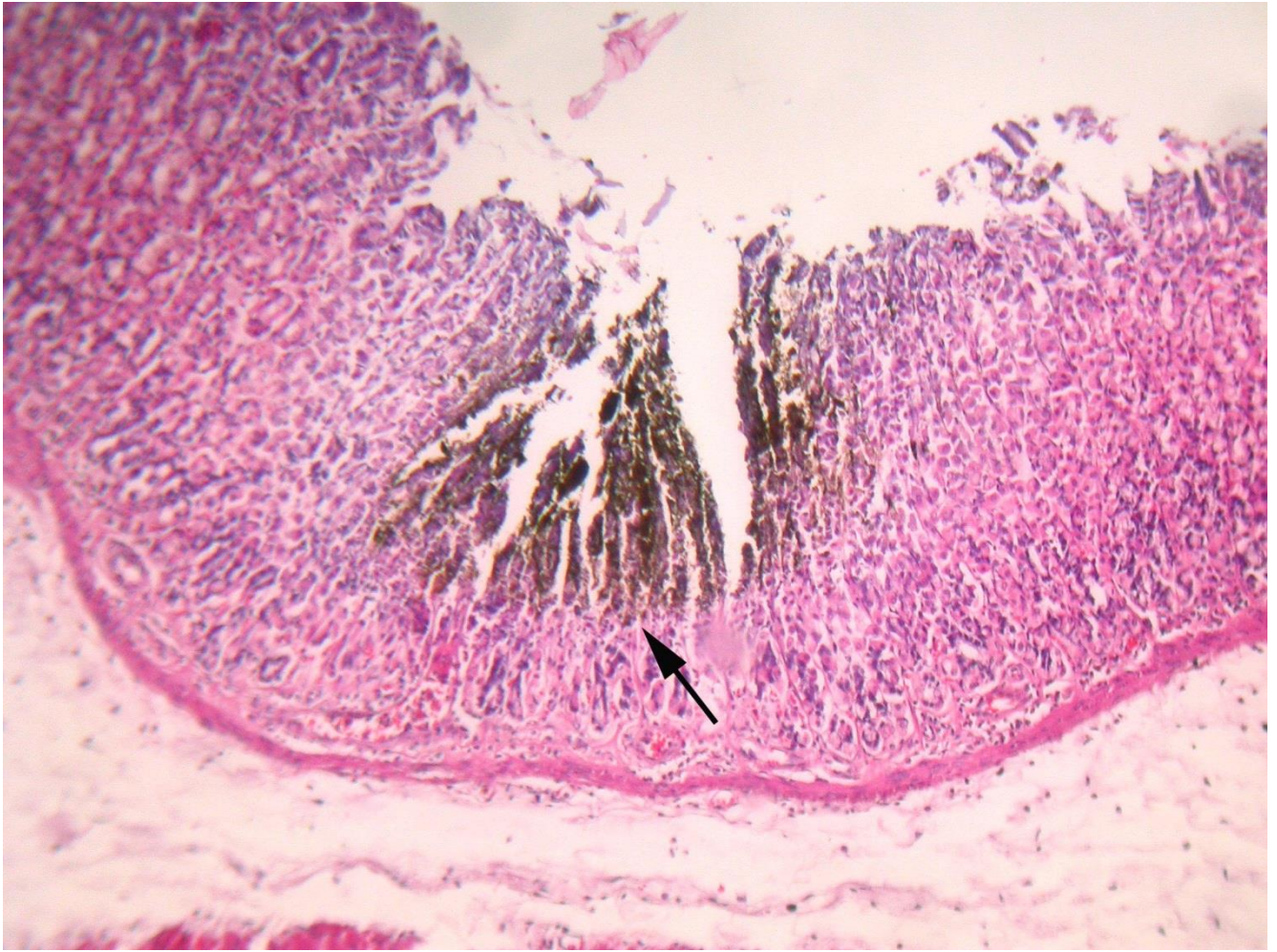


Рисунок 14 – Глубокая полосовидная эрозия с массивным отложением солянокислого гематина в слизистой оболочке желудка у крыс группы гептапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly (показана стрелкой)

Примечание: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 100.

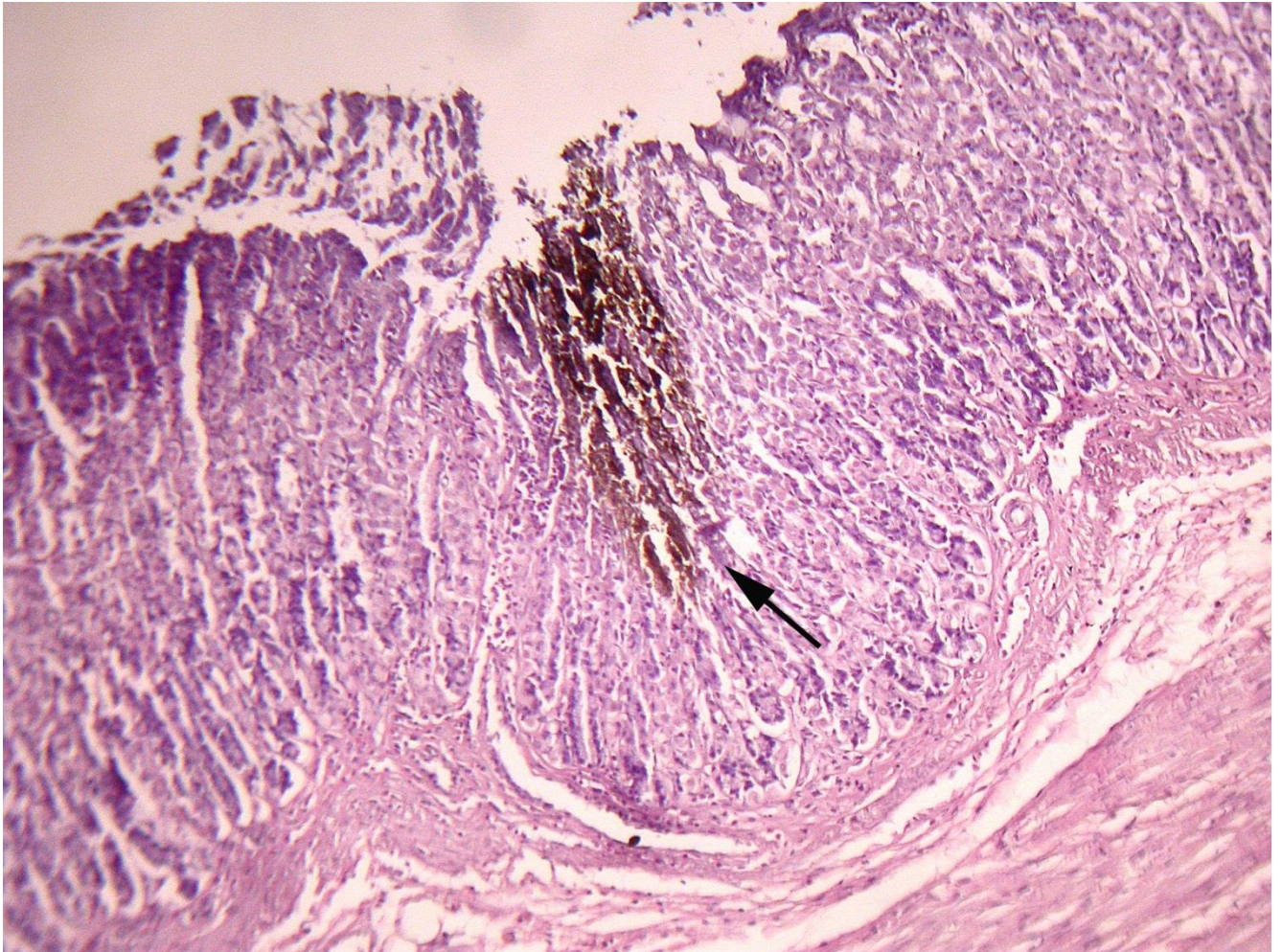


Рисунок 15 – Глубокая полосовидная эрозия в слизистой оболочке желудка у крыс группы октаптапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val (показана стрелкой)

Примечание: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 100.

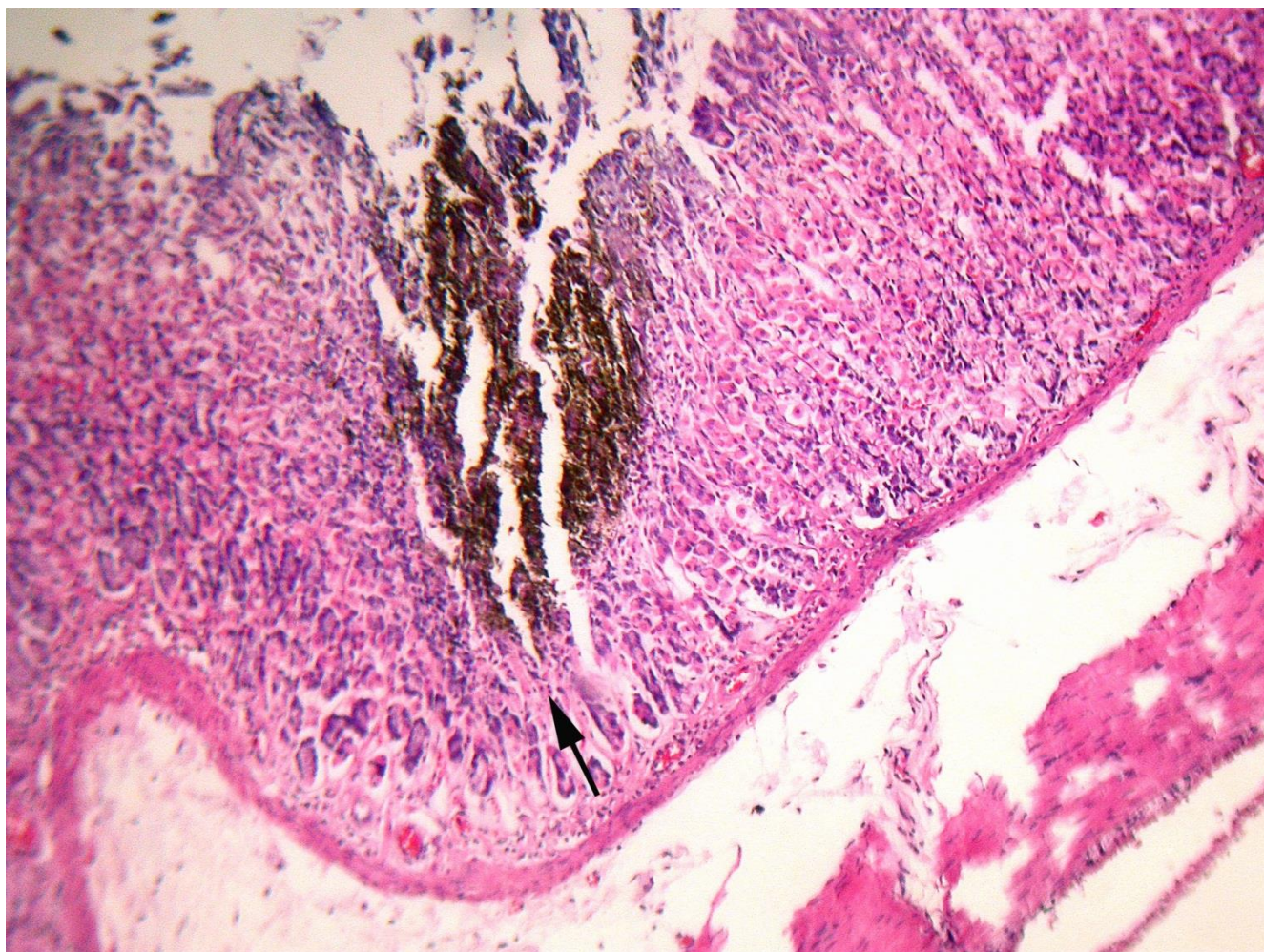


Рисунок 16 – Глубокая полосовидная эрозия с массивным отложением солянокислого гематина в слизистой оболочке желудка у крыс группы нонапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe-Gly-Val-Arg (показана стрелкой)

Примечание: Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 100.



Учитывая, что по результатам оценки механизмов противоязвенного действия пептидного комплекса из тканей свиных почек одним из вероятных механизмов его действия может являться его антиоксидантная активность, в следующем разделе нашей работы мы решили изучить влияние трех соединений-лидеров на активность процессов свободнорадикального окисления в СОЖ крыс при экспериментальной «индометациновой» гастропатии.

### **3.4 Влияние пептидов Leu-Phe-Lys, Leu-Phe-Lys-Ala, Leu-Phe-Lys-Ala-Pro-Phe на активность процесса свободнорадикального окисления в слизистой оболочке желудка при экспериментальной «индометациновой» гастропатии**

В результате проведенных экспериментов было установлено, что трипептид Leu-Phe-Lys обладает выраженной антиоксидантной активностью.

Как следует из рисунка 17, в контрольной группе данной серии экспериментов концентрация ТБРП увеличилась относительно уровня интактных крыс в 2 раза: с 5,2 (4,0; 8,4) мкмоль/мг до 10,2 (9,4; 11,3) мкмоль/мг ( $p=0,001$ ). При этом на фоне профилактического введения трипептида Leu-Phe-Lys величина описываемого показателя составила 7,1 (6,4; 8,2) мкмоль/мг, что было в 1,4 раза меньше, чем в контроле ( $p=0,0001$ ) и не отличалось от уровня интактных крыс. Измерение концентрации ТБРП в гомогенате желудков крыс, получавших препарат сравнения  $\alpha$ -токоферола ацетат, показало, что она равнялась 4,8 (3,6; 5,6) мкмоль/мг, уступая уровню контрольной группы в 2,1 раза ( $p=0,0002$ ) и не отличаясь от уровня интактных животных.

Параллельно было зафиксировано, что ОПА на фоне применения трипептида Leu-Phe-Lys равнялась 74,5 (69,6; 77,9)%, тогда как в контрольной группе – 64,7 (61,6; 68,5)%, у интактных крыс – 89,2 (76,7; 92,4)%, а после введения  $\alpha$ -токоферола ацетата – 46,3 (40,5; 56,5)% (Рисунок 17).

Результаты изучения показателей антиоксидантного статуса в СОЖ экспериментальных животных, представленные на рисунке 18, показали, что ОАА в контрольной группе снижалась по сравнению с интактными крысами в 2,7 раза:

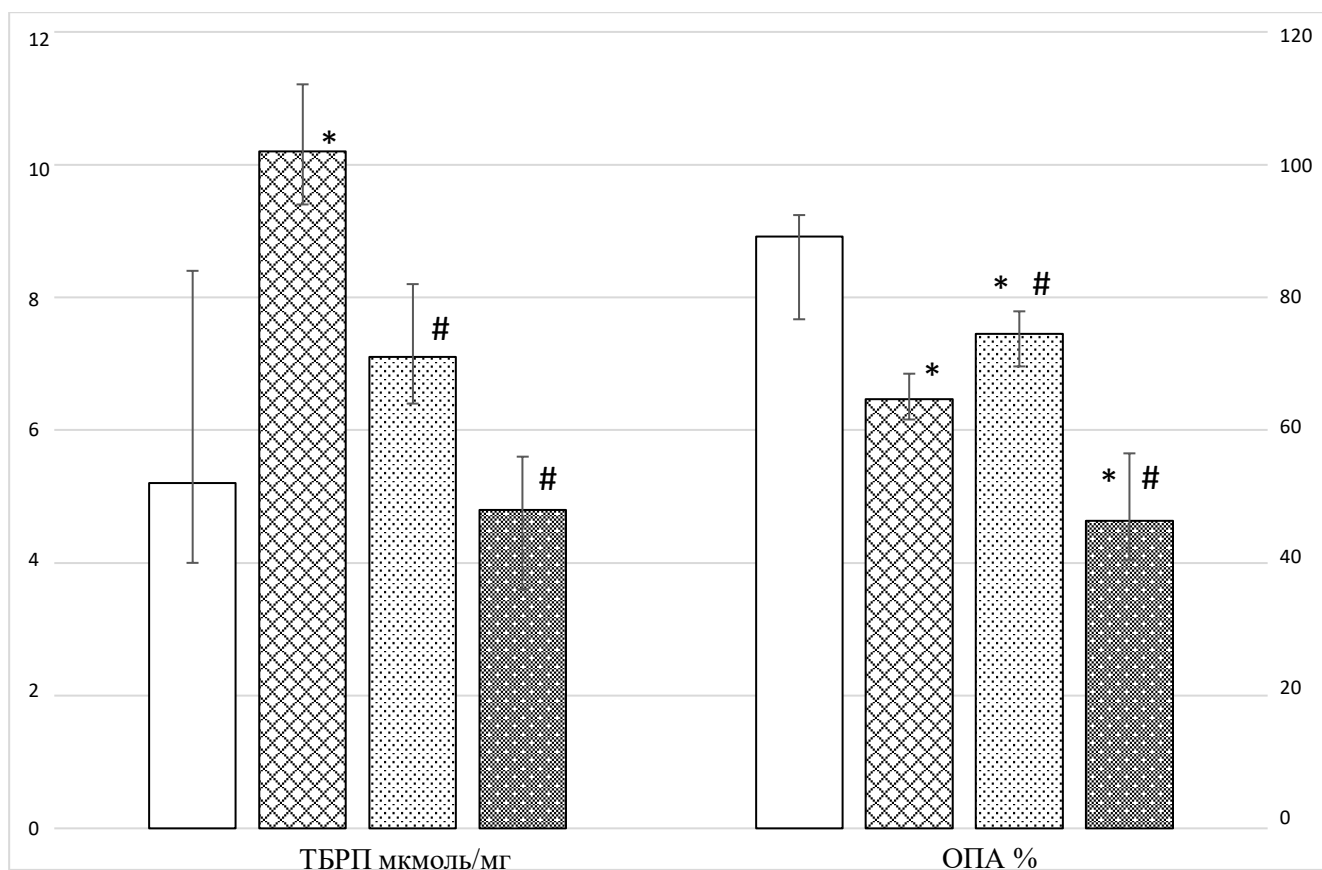


Рисунок 17 – Показатели прооксидантного статуса в слизистой оболочке желудка интактных крыс, крыс контрольной группы, крыс группы трипептида Leu-Phe-Lys и группы  $\alpha$ -токоферола ацетата

Примечание: По горизонтальной оси – название показателя и единицы измерения. По вертикальной оси – значение показателя (по шкале слева – для ТБРП, по шкале справа – для ОПА). □ – интактные крысы, ▨ – контрольная группа, ▩ – группа трипептида Leu-Phe-Lys, ▪ – группа  $\alpha$ -токоферола ацетата.

Значения представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (25%;75%). Звездочкой обозначены статистически значимые различия в контрольной группе по сравнению с интактными крысами. Знаком # обозначены статистически значимые различия в группе трипептида Leu-Phe-Lys и группе  $\alpha$ -токоферола ацетата по сравнению с контрольной группой.

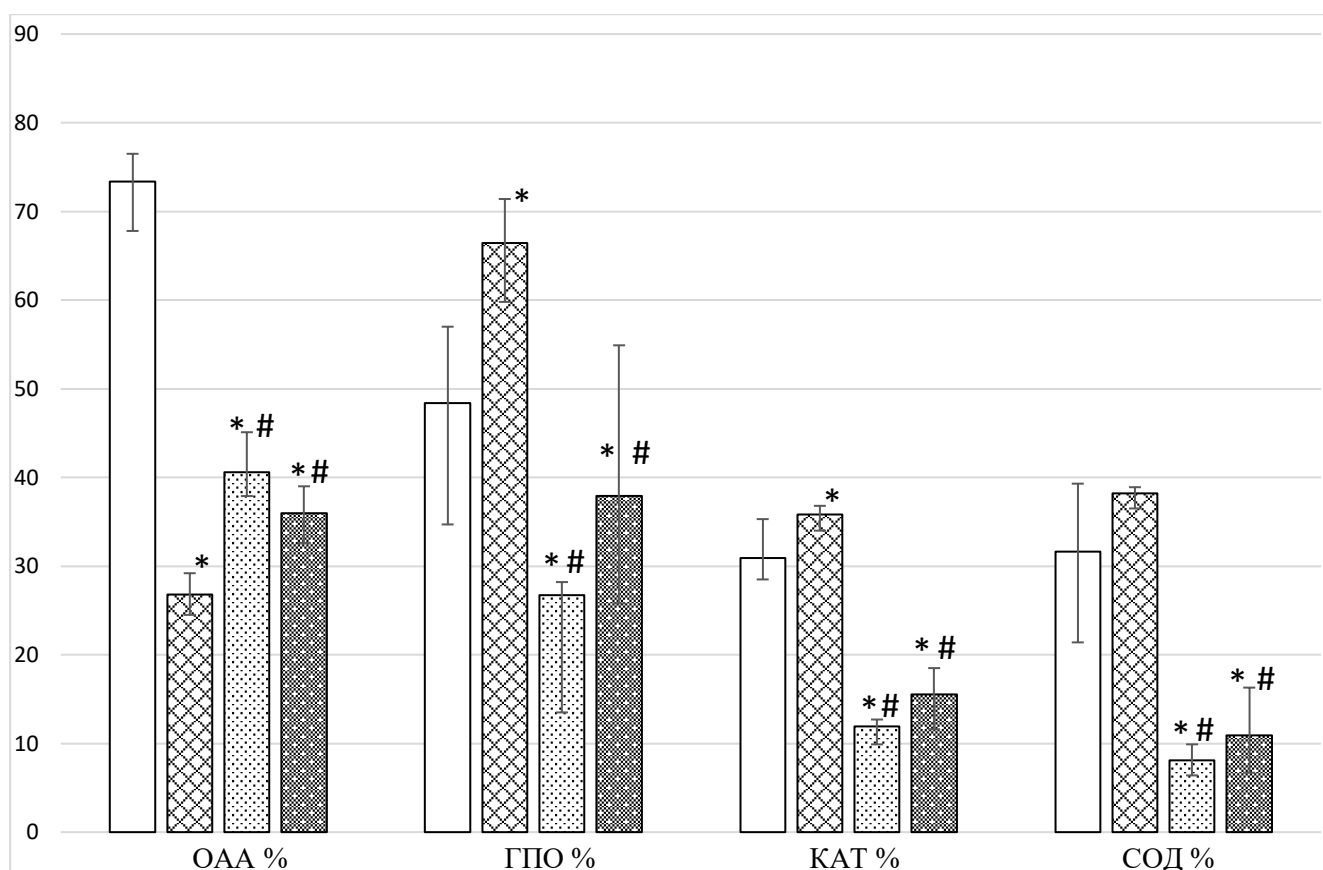


Рисунок 18 – Показатели антиоксидантного статуса в слизистой оболочке желудка интактных крыс, крыс контрольной группы, крыс группы трипептида Leu-Phe-Lys и группы α-токоферола ацетата

Примечание: По горизонтальной оси – название показателя и единицы измерения. По вертикальной оси – значение показателя. □ – интактные крысы, ▨ – контрольная группа, ▤ – группа трипептида Leu-Phe-Lys, ▩ – группа α-токоферола ацетата.

Значения представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (25%;75%). Звездочкой обозначены статистически значимые различия в контрольной группе по сравнению с интактными крысами. Знаком # обозначены статистически значимые различия в группе трипептида Leu-Phe-Lys и группе α-токоферола ацетата по сравнению с контрольной группой.

с 73,4 (67,8; 76,5)% до 26,8 (24,5; 29,2)% ( $p < 0,00001$ ). В то же время, у подопытных крыс, получавших трипептид Leu-Phe-Lys, ОАА составила 40,6 (37,9; 45,1)%, что было в 1,5 раза больше, чем в контроле ( $p = 0,00002$ ). В группе  $\alpha$ -токоферола ацетата ОАА равнялась 36,0 (32,6; 39,0), превышая уровень контрольной группы в 1,3 раза ( $p = 0,000001$ ) и не отличаясь от уровня крыс группы трипептида Leu-Phe-Lys.

Измерение активности антиоксидантных ферментов в СОЖ крыс экспериментальных групп показало (Рисунок 18), что активность ГПО в контроле заболевания возросла относительно уровня интактных животных в 1,4 раза: с 48,4 (34,7; 57,0)% до 66,4 (59,8; 71,4)% ( $p = 0,00002$ ), что, по-видимому, носило компенсаторный характер в ответ на развивающийся оксидативный стресс в тканях. При этом на фоне профилактического применения трипептида Leu-Phe-Lys величина описываемого показателя составила 26,7 (13,5; 22,2)%, что было в 2,5 раза меньше, чем в контроле ( $p = 0,00002$ ), и уступало даже уровню интактных крыс в 1,8 раза ( $p = 0,00004$ ). Активность ГПО в группе  $\alpha$ -токоферола ацетата равнялась 37,9 (25,8; 54,9)%, что было меньше, чем в контроле заболевания в 1,8 раза ( $p = 0,000001$ ), а уровня интактных крыс – в 1,3 раза. При этом она превышала уровень группы трипептида Leu-Phe-Lys в 1,4 раза ( $p = 0,002$ ).

Аналогичная в целом сравнительная картина характеризовала активность двух других антиоксидантных ферментов – КАТ и СОД. Как следует из рисунка 18, активность КАТ в контрольной группе увеличилась по сравнению с интактными крысами в 1,2 раза: с 30,9 (28,5; 35,3)% до 35,8 (34,0; 36,8)% ( $p = 0,005$ ). В группе трипептида Leu-Phe-Lys она равнялась 11,9 (9,9; 12,7)%, а в группе  $\alpha$ -токоферола ацетата – 15,5 (11,6; 18,5)%, что было меньше, чем в контроле заболевания, в 3,0 раза ( $p = 0,00002$ ) и в 2,3 раза ( $p < 0,0000001$ ) соответственно.

Активность СОД, которая у интактных крыс составляла 31,6 (21,4; 39,3)%, в контрольной группе увеличилась до 38,2 (36,5; 38,9)%. При этом после применения трипептида Leu-Phe-Lys величина описываемого показателя равнялась 8,1 (6,4; 9,9)%, уступая уровню контрольной группы в 4,7 раза ( $p = 0,00005$ ), а

после применения  $\alpha$ -токоферола ацетата она равнялась 10,9 (6,7; 16,5) , уступая уровню контрольной группы 3,5 раза ( $p < 0,000001$ ).

Таким образом, применение трипептида Leu-Phe-Lys в условиях экспериментальной «индометациновой» гастропатии сопровождалось выраженной антиоксидантной активностью. Об этом свидетельствовали следующие признаки. Во-первых, происходила нормализация концентрации ТБРП, повышенная в контроле заболевания, что свидетельствует о нивелировании оксидативного повреждения мембранных фосфолипидов. Во-вторых, произошло выраженное увеличение ОАА и снижение активности всех трех антиоксидантных ферментов в сравнении с контрольной группой. Это указывает на усиление неферментной антиоксидантной активности в СОЖ. Следует также отметить, что аналогичные изменения показателей про- и антиоксидантного статусов в СОЖ подопытных крыс наблюдались при применении прямого антиоксиданта  $\alpha$ -токоферола ацетата. В совокупности полученная информация позволяет предположить наличие у трипептида Leu-Phe-Lys прямой антиоксидантной активности или же какого-либо иного механизма повышения неферментативной антиоксидантной защиты СОЖ. В любом случае снижение окислительного стресса в СОЖ, наблюдаемое в эксперименте, может вносить существенный вклад в гастропротекторное действие изучаемого вещества.

На этом фоне при применении тетрапептида Leu-Phe-Lys-Ala и гексапептида Leu-Phe-Lys-Ala-Pro-Phe наблюдалась иная картина активности процессов СРО. Как представлено на рисунке 19, концентрация ТБРП в группе тетрапептида Leu-Phe-Lys-Ala существенно возросла как по сравнению с интактными животными (в 3,2 раза,  $p < 0,0000001$ ), так и относительно контрольной группы (в 1,6 раза,  $p = 0,00002$ ), составив 16,6 (15,2; 18,2) мкмоль/мг. При этом величина описываемого показателя превышала уровень группы  $\alpha$ -токоферола ацетата в 3,5 раза ( $p < 0,000001$ ). ОПА равнялась 68,8 (65,5; 70,6)% и не отличалась от уровня контрольной группы.

Изучение показателей антиоксидантного статуса в СОЖ крыс группы тетрапептида Leu-Phe-Lys-Ala позволило установить, что, как следует из рисунка

20, ОАА составила 21,6 (17,3; 24,6)%, что было в 3,4 раза меньше, чем у интактных животных ( $p < 0,000001$ ), и не имело статистически значимых различий по сравнению с контролем заболевания.

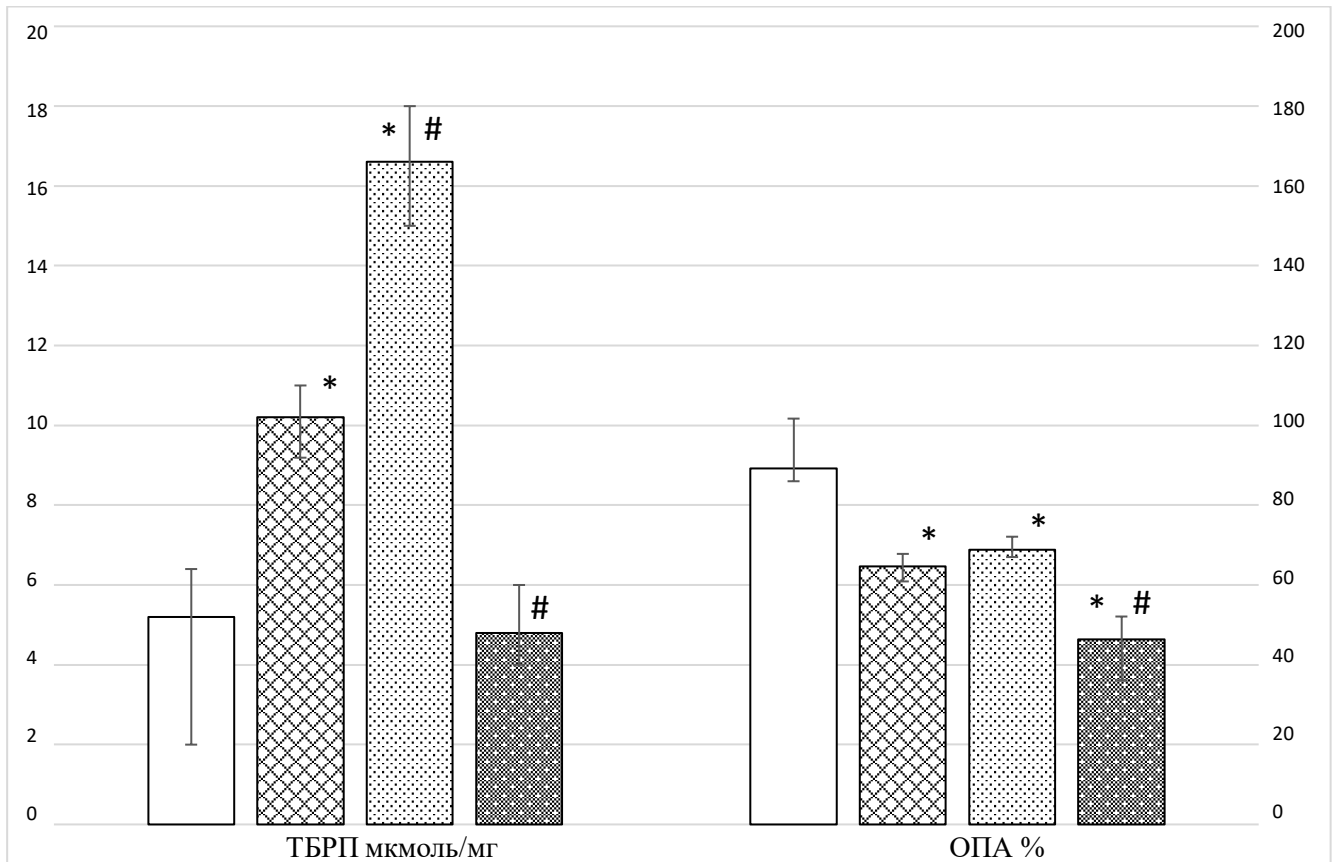


Рисунок 19 – Показатели прооксидантного статуса в слизистой оболочке желудка интактных крыс, крыс контрольной группы, крыс группы тетрапептида Leu-Phe-Lys-Ala и группы α-токоферола ацетата

Примечание: По горизонтальной оси – название показателя и единицы измерения. По вертикальной оси – значение показателя (по шкале слева – для ТБРП, по шкале справа – для ОПА). □ – интактные крысы, ▨ – контрольная группа, ▩ – группа тетрапептида Leu-Phe-Lys-Ala, ▧ – группа α-токоферола ацетата.

Значения представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (25%;75%). Звездочкой обозначены статистически значимые различия в контрольной группе по сравнению с интактными крысами. Знаком # обозначены статистически значимые различия в группе тетрапептида Leu-Phe-Lys-Ala и группе α-токоферола ацетата по сравнению с контрольной группой.

В этих условиях активность всех трех антиоксидантных ферментов в группе тетрапептида Leu-Ile-Lys-Ala значительно уступала показателям интактных крыс и контрольной группы (Рисунок 20).

Активность ГПО равнялась 19,8 (13,5; 22,2)%, активность КАТ – 10,7 (8,4; 12,2)%, активность СОД – 2,7 (1,7; 3,4)%, что соответственно для каждого фермента было ниже уровня интактных крыс в 2,4 раза ( $p=0,0002$ ), в 2,9 раза ( $p=0,0002$ ) и в 11,7 раза ( $p<0,0000001$ ), а также ниже уровня контрольной группы в 3,4 раза ( $p=0,00002$ ), в 3,3 раза ( $p=0,00002$ ) и в 14,1 раза ( $p<0,000001$ ).

Показатели про- и антиоксидантного статусов в СОЖ крыс группы гексапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe представлены на рисунках 21 и 22. Оказалось, что концентрация ТБРП в данной группе составила 20,6 (19,2; 23,1) мкмоль/мг, превысив уровень интактных крыс в 4 раза ( $p<0,000001$ ), а уровень контрольной группы – в 2 раза ( $p=0,00002$ ). ОПА при этом превышала показатели контрольной группы в 1,3 раза и равнялась 83,6 (82,2; 86,6)%, ( $p=0,00002$ ).

Общая антиоксидантная активность в СОЖ крыс группы гексапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe составила 20,5 (19,0; 25,6)%, что было меньше, чем у интактных животных, в 3,6 раза ( $p=0,003$ ) и не отличалось от показателя контрольной группы (Рисунок 22).

Активность ГПО в группе гексапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe составила 17,1 (15,7; 21,4)%, уступая уровню интактных крыс в 2,8 раза ( $p=0,00002$ ) и уровню контрольной группы в 3,9 раза ( $p<0,000001$ ). Активность КАТ равнялась 7,9 (7,5; 13,4)%, уступая уровню интактных крыс в 3,9 раза ( $p=0,00002$ ) и уровню контрольной группы в 4,5 раза ( $p=0,00005$ ). Активность СОД равнялась 12,6 (10,3; 14,7)%, уступая уровню интактных крыс в 2,5 раза ( $p=0,0002$ ) и уровню контрольной группы в 3 раза ( $p=0,0001$ ).

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что в характере влияния пептидов Leu-Ile-Lys-Ala и Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe 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.

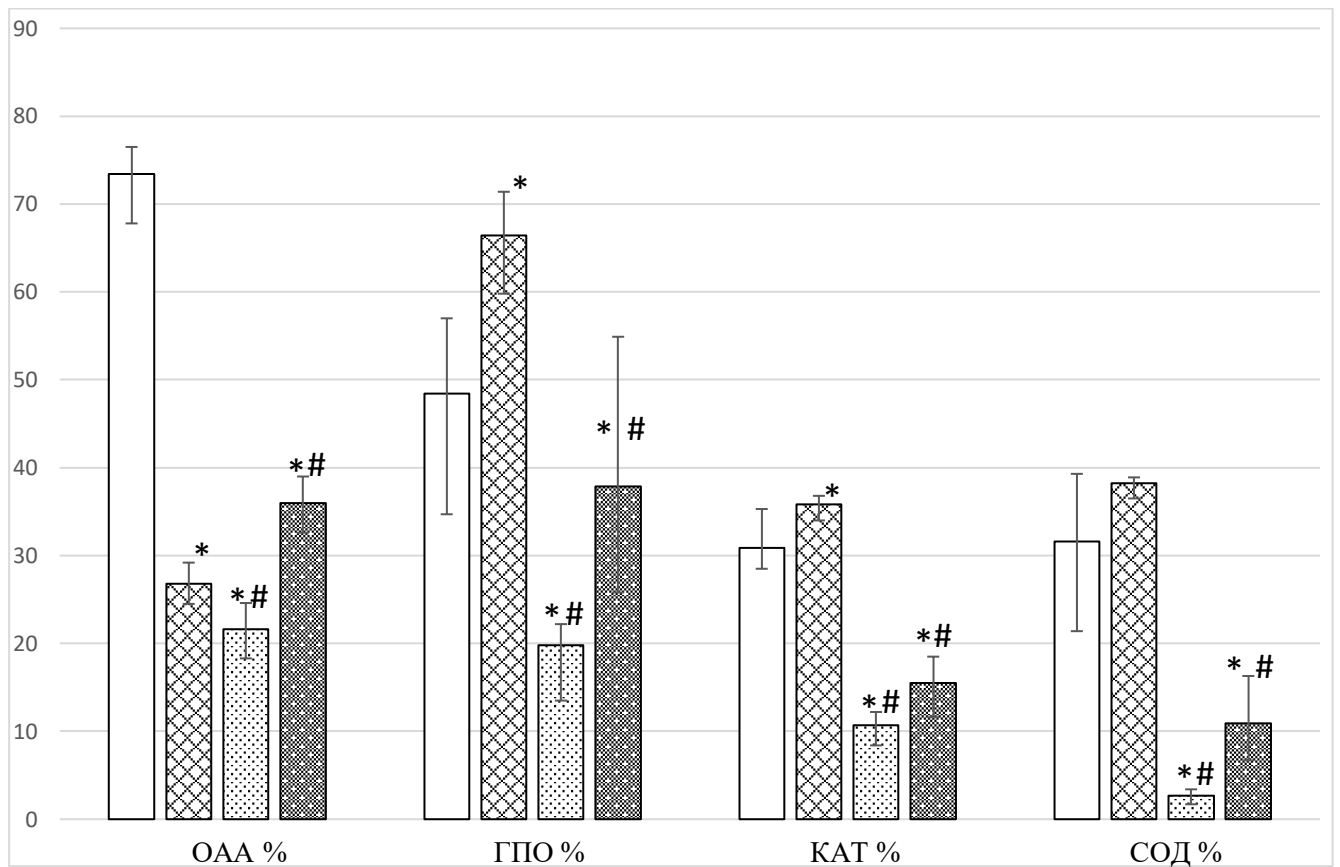


Рисунок 20 – Показатели антиоксидантного статуса в слизистой оболочке желудка интактных крыс, крыс контрольной группы, крыс группы тетрапептида Leu-Phe-Lys-Ala и группы α-токоферола ацетата

Примечание: По горизонтальной оси – название показателя и единицы измерения. По вертикальной оси – значение показателя. □ – интактные крысы, ▣ – контрольная группа, ▤ – группа тетрапептида Leu-Phe-Lys-Ala, ▥ – группа α-токоферола ацетата.

Значения представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (25%;75%). Звездочкой обозначены статистически значимые различия в контрольной группе по сравнению с интактными крысами. Знаком # обозначены статистически значимые различия в группе тетрапептида Leu-Phe-Lys-Ala и группе α-токоферола ацетата по сравнению с контрольной группой.



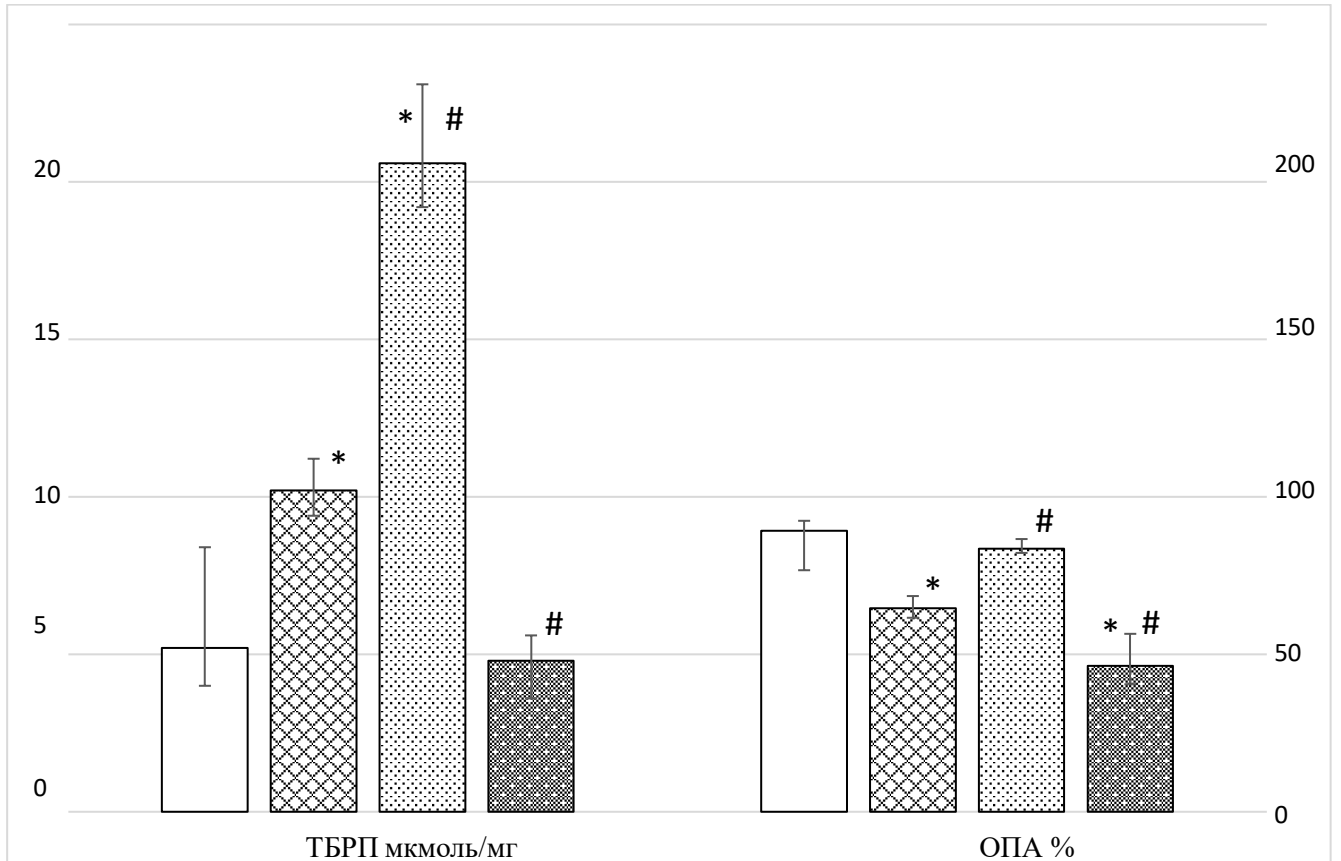


Рисунок 21 – Показатели прооксидантного статуса в слизистой оболочке желудка интактных крыс, крыс контрольной группы, крыс группы гексапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe и группы  $\alpha$ -токоферола ацетата

Примечание: По горизонтальной оси – название показателя и единицы измерения. По вертикальной оси – значение показателя (по шкале слева – для ТБПІ, по шкале справа – для ОПА). □ – интактные крысы, ▨ – контрольная группа, ▩ – группа гексапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe, ▪ – группа  $\alpha$ -токоферола ацетата.

Значения представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (25%;75%). Звездочкой обозначены статистически значимые различия в контрольной группе по сравнению с интактными крысами. Знаком # обозначены статистически значимые различия в группе гексапептида Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe и группе  $\alpha$ -токоферола ацетата по сравнению с контрольной группой.

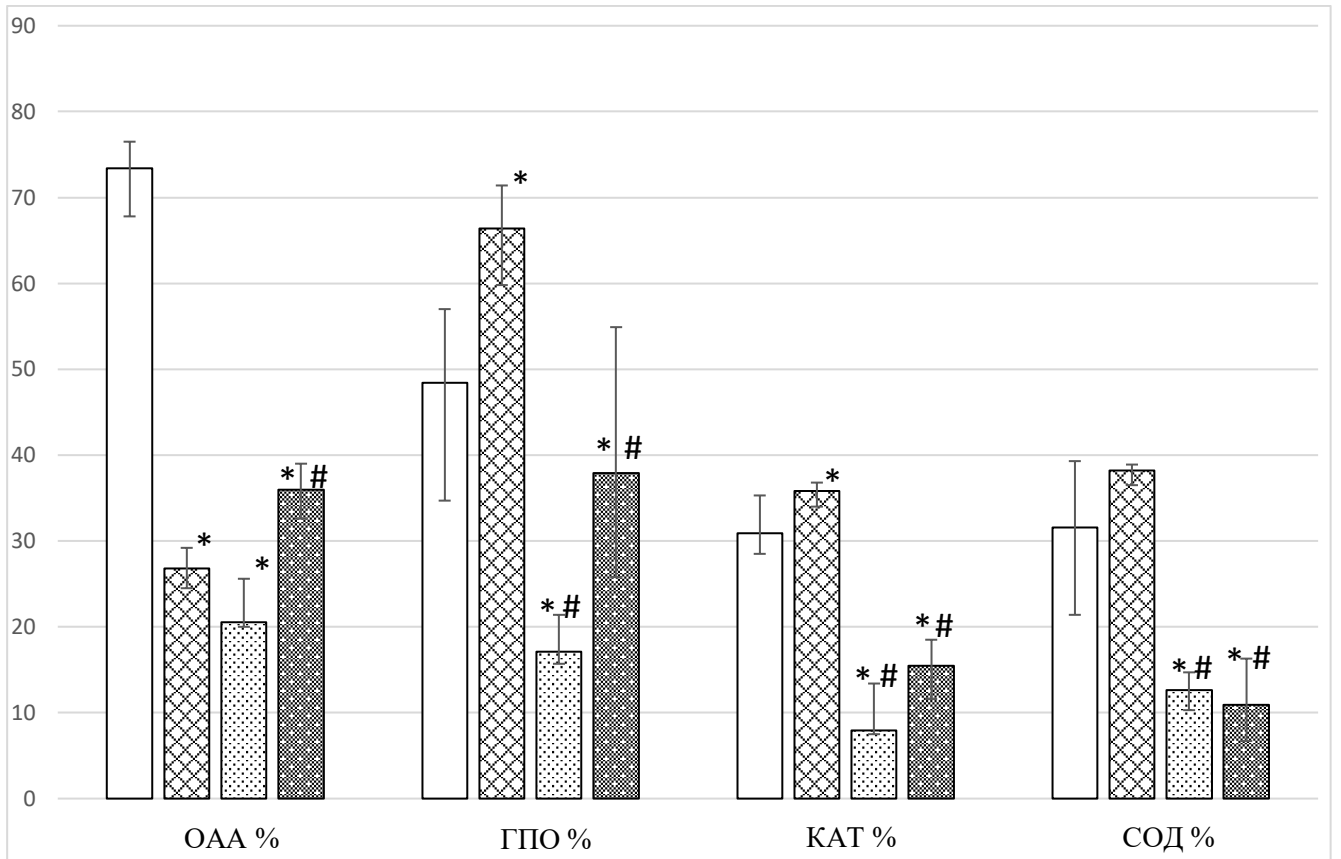


Рисунок 22 – Показатели антиоксидантного статуса в слизистой оболочке желудка интактных крыс, крыс контрольной группы, крыс группы гексапептида Leu-Phe-Lys-Ala-Pro-Phe и группы α-токоферола ацетата

Примечание: По горизонтальной оси – название показателя и единицы измерения. По вертикальной оси – значение показателя. □ – интактные крысы, ▣ – контрольная группа, ▤ – группа гексапептида Leu-Phe-lys-Ala-Pro-Phe, ▥ – группа α-токоферола ацетата.

Значения представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (25%;75%). Звездочкой обозначены статистически значимые различия в контрольной группе по сравнению с интактными крысами. Знаком # обозначены статистически значимые различия в группе гексапептида Leu-Phe-lys-Ala-Pro-Phe и группе α-токоферола ацетата по сравнению с контрольной группой.

В совокупности это указывает на то, что, данные пептиды, вероятнее всего, подавляют неферментный компонент антиоксидантной защиты клеток желудка, усиливая генерацию активных форм кислорода, которые вызывают выраженное окисление мембранных фосфолипидов.

Учитывая, что трипептид Leu-Phe-Lys проявил выраженные антиоксидантные свойства, а также гастропротекторную активность, сопоставимую с омепразолом, представляло интерес сравнить характер его влияния на активность процесса СРО с омепразолом. Результаты этого сравнения представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Сравнительная оценка влияния трипептида Leu-Phe-Lys и омепразола на показатели про- и антиоксидантного статусов в СОЖ крыс при экспериментальной «индометациновой гастропатии»

Показатель	Контроль	Трипептид Leu-Phe-Lys	Омепразол
ТБРП (мкмоль/мг)	10,2 (9,4;11,3)	7,1 (6,4;8,2) $p_k=0,001$	2,8 (2,1;3,3) $p_k=0,000001$ $p_n=0,0007$
ОПА %	64,7 (61,6;68,5)	74,5 (69,6;77,9) $p_k=0,026$	84,6 (82,0;88,1) $p_k=0,001$ $p_n=0,0002$
ОАА %	26,8 (24,5;29,2)	40,6 (37,9;45,1) $p_k=0,00002$	46,4 (40,9;49,0) $p_k<0,000001$
ГПО %	66,4 (59,8;71,4)	26,7 (13,5;22,2) $p_k=0,00002$	11,6 (6,5;11,3) $p_k<0,000001$
КАТ %	35,8 (34,0;36,8)	11,9 (9,9;12,7) $p_k=0,00002$	7,4 (4,9;10,8) $p_k<0,000001$ $p_n=0,031$
СОД %	38,2 (36,5;38,9)	8,1 (6,4;9,9) $p_k=0,00005$	15,3 (13,0;16,1) $p_k<0,000001$ $p_n=0,0002$

Примечание:  $p_k$  – уровень статистической значимости по сравнению с контролем заболевания,  $p_n$  – уровень статистической значимости в группе омепразола по сравнению с группой трипептида Leu-Phe-Lys.

Результаты проведенных экспериментов показали, что влияние трипептида Leu-Phe-Lys и омепразола на картину свободнорадикального окисления в СОЖ подопытных крыс в целом носит идентичный характер. Основными проявлениями стали снижение концентрации ТБРП, рост ОАА и ослабление активности всех трех антиоксидантных ферментов. Следует отметить, что омепразол снижал концентрацию ТБРП в 2,5 раза сильнее, нежели трипептид Leu-Phe-Lys, что, вероятно, можно объяснить его способностью подавлять секрецию соляной кислоты, нивелируя тем самым мощный повреждающий фактор.

Таким образом, суммируя вышеизложенное в настоящем разделе, отметим, что, согласно полученным результатам, применение трипептида Leu-Phe-Lys в условиях индометацинового повреждения СОЖ сопровождалось выраженным антиоксидантным действием, сопоставимым с таковым у препаратов сравнения  $\alpha$ -токоферола ацетата и омепразола. При этом пептиды Leu-Phe-Lys-Ala и Leu-Phe-Lys-Ala-Pro-Phe в большей степени проявили свойства прооксидантов.

Обсуждая возможные механизмы антиоксидантного действия коротких пептидов в целом и разработанного нами трипептида Leu-Phe-Lys в частности, обратимся к данным литературы. Антиоксидантные свойства пептидов и аминокислот подтверждены как *in vitro*, так и *in vivo* в целом ряде экспериментов.

Так, например, в качестве механизмов антиоксидантной активности разными исследователями предлагалось наличие способности захватывать свободные радикалы (гидроксильный радикал, 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил-радикал, супероксидный радикал,  $\alpha,\alpha$ -дифенил- $\beta$ -пикрилгидразил), ингибирование автоокисления линолевой кислоты, восстановительная способность [144, 182, 233], хелатирующая активность в отношении ионов металлов (в частности  $Fe^{2+}$ , принимающего участие в реакции Фентона,



в ходе которой происходит генерация высокореактивного гидроксильного радикала) [98, 182].

В данном случае для нас важно, что согласно преобладающей сегодня точке зрения, кислотные и/или основные аминокислоты играют важную роль в хелатировании ионов металлов карбоксильными и аминогруппами в их боковых цепях [197]. В частности, аминокислота лизин, являющаяся концевой аминокислотой трипептида Leu-Phe-Lys, имеет аминогруппу в боковой цепи, которая является положительно заряженной при нейтральных значениях pH, делая карбоксильную группу заряженной отрицательно, что создает физико-химические условия для хелатирования ионов двухвалентных металлов.

В обсуждаемом аспекте весьма важно сослаться на результаты исследований, проведенных недавно в нашей лаборатории, в которых было обнаружено, что длительное применение трипептида Leu-Phe-Lys на фоне 16-недельного оксалатного нефролитиаза приводило к значительному снижению концентрации ионов кальция в моче – в 4,4 раза относительно контрольной группы [17]. Полученные данные, хоть и косвенно, но могут подтверждать наличие хелатирующей активности у трипептида Leu-Phe-Lys.

Относительно лизина многими российскими и зарубежными учеными проведены исследования, демонстрирующие роль этого аминокислотного остатка в антиоксидантной активности пептидов, а также его собственную антиоксидантную активность. Доказано наличие такой активности на штамме *E. coli* MG 1655 при воздействии как перекисью водорода, так и УФ 311 нм. Что интересно в рамках этого исследования, эффект наблюдался как для чистого лизина, так и для олигопептидов (от 2 до 4 аминокислот), при этом выраженность ДНК-протекторной активности олигопептидов, которая могла также вторично снижать окислительный стресс, а также защита клеток от перекиси водорода имела прямую корреляцию с массовой долей лизина в составе пептида. [47]. Для лизина и его производных (напр. нацистилин) разными авторами продемонстрирована способность захватывать пероксид водорода, супероксид-анион [109, 59]. И. В. Корниенко и др. при помощи квантово-химических расчетов *ab initio* подтвердили, что лизин имеет способность связывать супероксидный радикал. При атаке протонированного по свободной аминогруппе лизина

происходит межионный перенос протона с образованием сверхпрочного электронейтрального комплекса с высокой энергией стабилизации. Благодаря этому происходит уменьшение энергии, необходимой для восстановления супероксид-радикала до перекиси водорода [32].

Сообщалось, что пептиды с повышенной гидрофобностью, полученные из многих источников белка, обладают антиоксидантными свойствами [78]. Поэтому можно предположить, что гидрофобные аминокислоты, а это Leu и Ile, присутствующие в последовательности пептида, благоприятствуют его антирадикальным свойствам. Эти гидрофобные аминокислоты могут способствовать ингибированию перекисного окисления, увеличивая растворимость пептида в липиде и тем самым способствуя лучшему взаимодействию с различными радикалами. Кроме того, важно сделать акцент на том, что не столько наличие определенных аминокислот, сколько именно аминокислотная последовательность и правильное позиционирование этой последовательности в молекуле любого пептида является определяющей для его антиоксидантной активности [197]. Именно структурные свойства целостной молекулы олигопептида могут быть ответственными за проявления хелатирующей активности или же захватывание свободных радикалов.

Еще одним механизмом, обеспечивающим антиоксидантное действие пептидов, может являться способность модифицировать надмолекулярную структуру липопротеиновых комплексов в мембранах клеток, защищая их от Fe-индуцированного окисления, участие в регуляции процессов апоптоза/некроза [3, 31].

В совокупности вышеизложенное позволяет полагать, что эффект ослабления выраженности окислительного стресса в тканях желудка может вносить существенный вклад в гастропротекторный эффект трипептида Leu-Ile-Lys. Учитывая перечисленные выше свойства аминокислот, входящих в состав исследуемого трипептида, мы предполагаем, что снижение окислительного стресса достигается за счет нескольких механизмов:

1. Связывание свободных радикалов за счет наличия концевых лизина
2. Хелатирование ионов металлов, имеющих потенциальную повреждающую активность за счет аминокислотной группы концевых лизина
3. Усиление этих свойств в липидной мембране клеток за счет гидрофобных свойств лейцина и изолейцина

Кроме того, нельзя исключать, что структурная организация целостной молекулы трипептида также может способствовать вторичному снижению окислительного стресса за счет влияния на иные звенья патогенеза гастропатии.

### **3.5 Влияние трипептида Leu-Phe-Lys на активность ЦОГ-1,2 в слизистой оболочке желудка крыс**

На заключительном этапе нашего исследования мы решили изучить влияние трипептида Leu-Phe-Lys, 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 23). Оказалось, что концентрация ЦОГ-1 в гомогенате желудков крыс не имела статистически значимых различий между контрольной группой и группой трипептида Leu-Phe-Lys:  $5,4 \pm 0,26$  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 Leu-Phe-Lys 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 ( $p < 0,00001$ ).

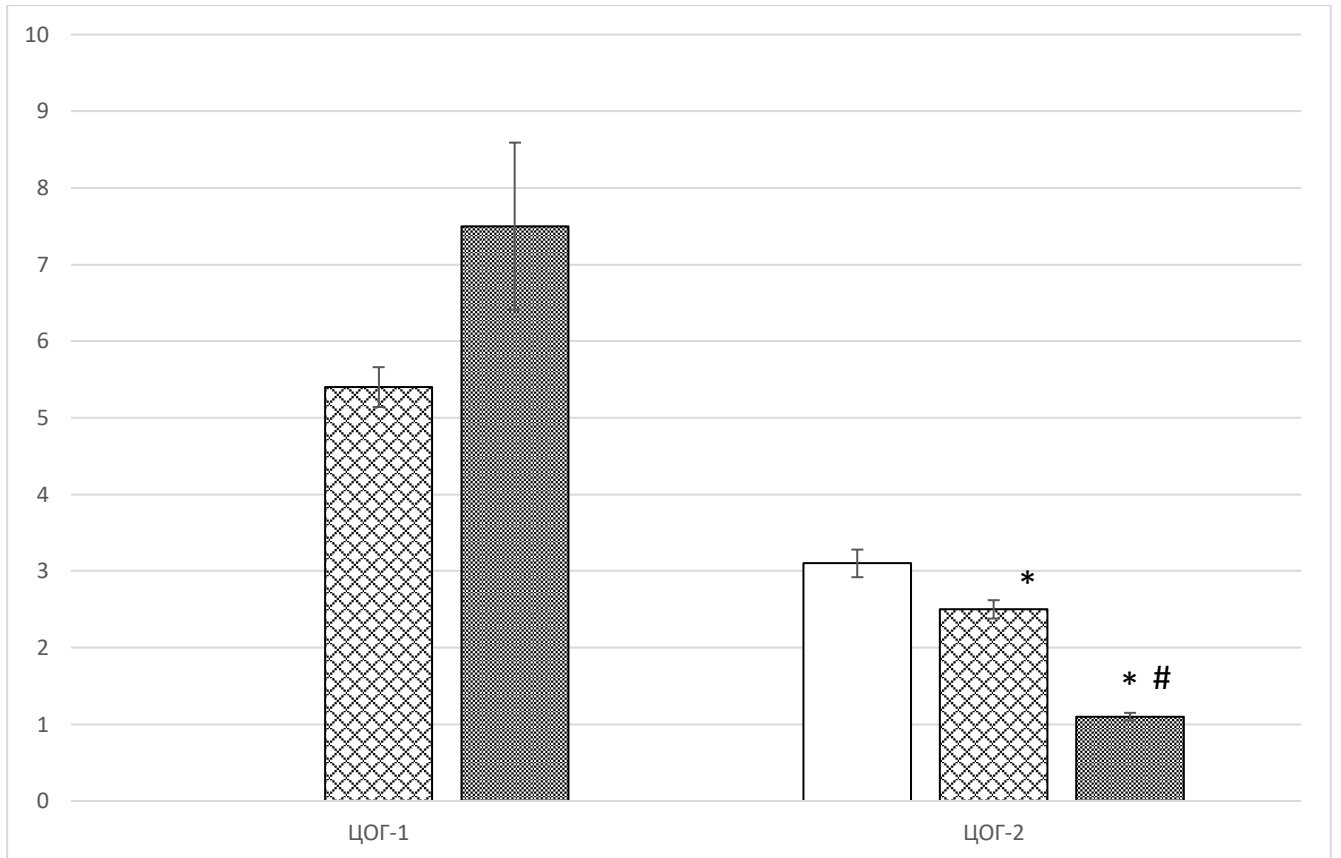





Рисунок 23 – Показатели концентрации ЦОГ-1,2 в гомогенате желудков интактных крыс, крыс контрольной группы и группы трипептида Leu-Phe-Lys

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 Leu-Phe-Lys.

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 Leu-Phe-Lys по сравнению с контрольной группой.



Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что под влиянием трипептида Leu-Phe-Lys происходит ослабление ЦОГ-2-ассоциированных воспалительных процессов в желудках крыс с экспериментальной «индометациновой» гастропатией, что, по-видимому, могло объясняться выявленной ранее антиоксидантной активностью трипептида. Это действие вносит существенный вклад в выраженные гастропротекторные свойства разработанного нами нового фармакологического средства трипептида Leu-Phe-Lys для коррекции НПВП-индуцированных гастропатий.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании нами первоначально были получены данные о наличии гастропротекторной активности пептидного комплекса, экстрагированного из тканей свиных почек, в условиях экспериментальной «индометациновой» гастропатии у крыс.

Предпосылками для такого исследования стали результаты ранее проведенных экспериментов, в которых мы обнаружили антилитогенную активность пептидного комплекса, полученного из тканей свиных почек [16]. По современным представлениям, некоторые патогенетические процессы, имеющие место при мочекаменной болезни, схожи с таковыми при возникновении гастропатий. Например, это развитие окисидативного стресса в клетках органа, увеличение апоптотической активности, повышение активности ряда маркерных ферментов повреждения тканей и др. [63, 86, 139, 157, 176, 178].

Поэтому возникло предположение о возможности разработки новых гастропротекторных средств пептидной природы на основе пептидного комплекса из тканей свиных почек, чему и была посвящена данная работа.

На первом этапе была проведена макро- и микроскопическая оценка влияния пептидного комплекса на состояние слизистой оболочки желудка крыс с «индометациновой» гастропатией. Оказалось, что под влиянием изучаемого объекта в сравнении с контролем заболевания происходило значительное уменьшение количества глубоких полосовидных эрозий, которые являются наиболее деструктивным нарушением целостности СОЖ, а также увеличение толщины слизистой и уменьшение общей глубины повреждений.

Обсуждая возможные причины наблюдаемого эффекта, мы первоначально предположили, что в его основе могло лежать прямое репарационное действие пептидного комплекса, поскольку аминокислоты и олигопептиды обладают способностью опосредованно регулировать синтез белка в клетках, влияя на генетический аппарат клетки [55]. Поэтому было проведено экспериментальное

исследование влияния пептидного комплекса из тканей свиных почек на активность ядрышковых организаторов в СОЖ крыс.

Как известно, ядрышковые организаторы – это специфические участки хромосом, содержащие множество генов, кодирующих р-РНК. Вокруг ядрышковых организаторов формируются ядрышки – органоиды ядер, отвечающие за синтез р-РНК и биогенез рибосом [6, 13, 23]. Активность и количество ядрышковых организаторов в ядре клетки напрямую связано с выраженностью биосинтетических и пролиферативных процессов в клетке [1, 77, 193].

Результаты проведенного нами исследования показали, что при индометациновой гастропатии у крыс контрольной группы в клетках шейных отделов СОЖ отмечались более высокие показатели морфофункциональной активности ядрышковых организаторов, чем в СОЖ крыс, получавших пептидный комплекс. Вероятно, это можно объяснить тем, что при действии ulcerогенных факторов в СОЖ происходило формирование язвенного дефекта, которое обусловлено гибелью эпителиоцитов вследствие деструктивных процессов и апоптоза. Соответственно на этапе рубцевания эрозии в эпителии СОЖ отмечались процессы гиперрегенерации, которые сопровождались повышением скорости пролиферации эпителия [1]. Таким образом, увеличенная активность биосинтетических процессов при введении ulcerогенного агента закономерно указывает на развитие компенсаторных процессов в СОЖ, направленных на сдерживание развития патологии. На этом фоне снижение биосинтетической активности при применении пептидного комплекса могло свидетельствовать о том, что в механизме его гастропротекторного действия отсутствует компонент прямой стимуляции регенерации ткани. Кроме того, ослабление пролиферации в области повреждения может быть следствием меньшей выраженности этого повреждения по сравнению с контролем, а значит, может являться индикатором благоприятного влияния пептидного комплекса из тканей свиных почек на течение гастропатии.

Учитывая отсутствие прямой репаративной активности у пептидного комплекса из тканей свиных почек, было логично предположить наличие у него влияния на патофизиологические механизмы действия индометацина и процессы образования эрозий при повреждении СОЖ.

Основным механизмом повреждающего воздействия индометацина на СОЖ является ингибирование ЦОГ, что приводит к снижению синтеза защитных простагландинов, и, как следствие, к повреждению слизистой агрессивными факторами [22, 28, 84, 136, 185-187, 210]. Поэтому было решено изучить влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек на активность ЦОГ в слизистой оболочке желудка, что могло бы прямо или косвенно указать на механизм гастропротекторного действия пептидного комплекса.

По результатам проведенного эксперимента было установлено, что введение пептидного комплекса не повлияло на активность ЦОГ-1 в слизистой оболочке желудка и плазме крови, а также на активность ЦОГ-2 в плазме крови. Однако при этом значительно снижалась активность ЦОГ-2 в слизистой оболочке желудка.

Циклооксигеназа-1 является конститутивным ферментом клеток слизистой оболочки желудка и участвует в синтезе гастропротекторных простагландинов [28, 34, 170, 210]. Индометацин – мощный ингибитор активности данного фермента, поэтому одинаковый уровень ЦОГ-1 у крыс контрольной и подопытной групп вполне логично свидетельствовал о том, что гастропротекторное действие пептидного комплекса не было 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 [34, 44]. Поэтому факт снижения продукции ЦОГ-2 в слизистой оболочке желудка крыс на фоне применения пептидного комплекса указывает на ослабление воспалительных процессов, обусловленных иными причинами, не связанными с циклооксигеназным путем продукции воспаления.

В этой связи мы предположили, что гастропротекторное действие пептидов, экстрагированных из тканей свиных почек, может быть обусловлено их влиянием на процессы свободнорадикального окисления в слизистой оболочке желудка. Достаточно давно существует мнение, что развитие воспалительных процессов, маркером которых является уровень экспрессии провоспалительного фермента ЦОГ-2 при гастропатии, тесно сопряжено с оксидативным повреждением СОЖ [107, 223]. Оксидативный стресс – это явление, сопровождающее процессы повреждения слизистой ulcerогенными факторами [22, 57, 68, 88, 112, 178, 211, 224]. В его основе повреждение тканей и клеток активными формами кислорода, которые в избыточном количестве накапливаются в пораженной ткани, антиоксидантная система которой оказывается не в состоянии эффективно их нейтрализовать и элиминировать [64, 65, 87, 143, 157, 162, 176, 224].

Рассматривая влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек на показатели прооксидантного и антиоксидантного статуса эпителиоцитов желудка подопытных крыс, мы получили следующую картину: происходило снижение накопления продуктов перекисного окисления липидов ткани, повышалась общая антиоксидантная активность, одновременно снижалась активность антиоксидантных ферментов. В сравнении с контрольной группой такие изменения свидетельствовали об ослаблении оксидативного стресса в ткани слизистой, что и могло являться причиной снижения воспаления, и, соответственно, одним из возможных механизмов действия пептидного комплекса.

Таким образом, в ходе проведенных экспериментов было выявлено выраженное гастропротекторное действие пептидного комплекса из тканей свиных почек, в основе которого – ослабление воспалительных процессов в слизистой оболочке желудка посредством ингибирования оксидативного стресса.

На следующем этапе работы было проведено исследование аминокислотного состава пептидного комплекса из тканей свиных почек. Было установлено, что этот состав включал аминокислоты с суммарной массовой долей около 50%, среди которых лейцин, изолейцин, лизин, аланин, пролин,

фенилаланин и др. На основе полученных данных посредством драг-дизайна были смоделированы химические структуры 7 индивидуальных олигопептидов и проведен скрининг их гастропротекторной активности в условиях экспериментальной индометациновой гастропатии в сравнении с препаратами базовой терапии язвенной болезни желудка – омепразолом, ранитидином и мизопростолом [14, 25, 181, 188, 218, 219].

Оказалось, что гастропротекторная активность была обнаружена у трех олигопептидов: Leu-Ile-Lys, Leu-Ile-Lys-Ala и Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe. По результатам макро- и микроскопического исследования было установлено, что трипептид Leu-Ile-Lys обладал гастропротекторным эффектом, максимально близким по своим характеристикам к эффекту омепразола – одного из наиболее эффективных противоязвенных препаратов на сегодняшний день [68, 135, 148, 153, 177, 201, 235]. Пептиды Leu-Ile-Lys-Ala и Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe были менее активны.

На следующем этапе работы, принимая во внимание выявленный ранее антиоксидантный эффект у пептидного комплекса из тканей свиных почек, мы решили изучить влияние трех вышеуказанных пептидов на активность процессов свободнорадикального окисления в СОЖ крыс при экспериментальной индометациновой гастропатии в сравнении с классическим прямым антиоксидантом  $\alpha$ -токоферола ацетатом.

По результатам проведенного исследования было установлено, что трипептид Leu-Ile-Lys обладал выраженным антиоксидантным эффектом, сопоставимым по своим основным признакам с препаратом сравнения. Оба вещества снижали продукцию ТБРП, активность всех трех антиоксидантных ферментов, увеличивая при этом общую антиоксидантную активность относительно контроля заболевания. Это позволяет предположить, что трипептид Leu-Ile-Lys подобно  $\alpha$ -токоферола ацетату может обладать свойствами прямого антиоксиданта (за счет способности захватывать свободные радикалы благодаря концевой аминокислоте лизину), но не исключает других механизмов повышения

неферментной антиоксидантной защиты (например, за счет способности хелатировать ионы металлов) [32, 47, 59, 109, 197].

На этом фоне применение пептидов Leu-Ile-Lys-Ala и Leu-Ile-Lys-Ala-Pro-Phe сопровождалось значительным ростом концентрации ТБРП и снижением ОАА, что в большей степени свидетельствовало об их прооксидантной активности.

Таким образом, в ходе проведенных экспериментов было показано, что среди трех изученных олигопептидов при индометациновой гастропатии выраженной антиоксидантной активностью обладает только трипептид Leu-Ile-Lys. Это хорошо согласуется с результатами морфологического исследования, в которых была установлена наибольшая по силе гастропротекторная активность указанного трипептида.

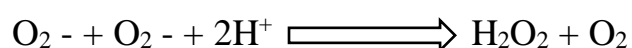
Для более объективной оценки характера антиоксидантного влияния трипептида Leu-Ile-Lys на СОЖ крыс при индометациновой гастропатии было также изучено влияние препарата сравнения омепразола на активность процесса свободнорадикального окисления в СОЖ. Оказалось, что при введении омепразола общая картина про- и антиоксидантного статусов клеток была схожа с таковой для трипептида Leu-Ile-Lys и  $\alpha$ -токоферола ацетата. Эти наблюдения хорошо согласуются с данными литературы, которые указывают на наличие антиоксидантных свойств у омепразола [68, 147].

Обсуждая роль свободнорадикального окисления в развитии НПВП-индуцированных гастропатий и терапевтическое значение антиоксидантных свойств у трипептида Leu-Ile-Lys, отметим, что, согласно современным представлениям, НПВП могут выступать в качестве ингибирующего разобщителя в митохондриях человека [136]. Индометацин действует как прооксидантный катализатор и инициирует липопероксидацию, продуцирующую активные формы кислорода [157]. Таким образом, препарат вмешивается в функционирование эндогенной про- и антиоксидантной системы слизистой оболочки и вызывает воспалительную реакцию. В частности, препарат взаимодействует с комплексом I цепи переноса электронов и приводит к утечке электронов, что, в свою очередь,

приводит к образованию супероксидного анион-радикала ( $O_2^-$ ) [91]. Новые реакции могут приводить к лавинообразному протеканию процесса и вызывать патологические изменения в структуре клеток, чем приводить к их гибели.

В ходе исследования было обнаружено, что при профилактическом применении трипептида Leu-Ile-Lys концентрация ТБРП была значительно снижена по сравнению с контролем и приближена к значению, отмечавшемуся у интактных крыс. Данное наблюдение свидетельствует о снижении интенсивности перекисного окисления липидов. Накопление токсичных продуктов ослаблялось, что могло являться причиной меньшей выраженности эрозивного повреждения при макроскопической оценке.

При определении активности антиоксидантной системы в СОЖ на фоне применения трипептида Leu-Ile-Lys мы получили характерные изменения, которые могут быть логически объяснены с учетом знаний о функциях ферментов этой защиты. Дисмутация митохондриального  $O_2^-$  с помощью супероксиддисмутазы приводит к образованию пероксида водорода ( $H_2O_2$ ), а избыток  $H_2O_2$ , продолжая взаимодействовать с  $O_2^-$ , генерирует высокореактивный гидроксильный радикал ( $\bullet OH$ ) через реакцию Хабера-Вейсса: [158, 221, 222]. Радикал  $O_2^-$ , если его избыток не дисмутируется, вызывает токсическое поражение за счет окислительного повреждения митохондрий с участием связанных форм и свободного железа [95, 158]. Супероксиддисмутаза – это семейство металлопротеинов, снижающих токсичность супероксидных радикалов по реакции [124]:

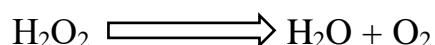


Концентрация супероксидных радикалов повышается в патологически измененных тканях, где усилено образование свободных радикалов и медиаторы оксидативного стресса вызывают повышенную экспрессию генов этих ферментов [100, 221, 222].



В наших экспериментах уровень СОД был повышен в группе контроля индометацин-индуцированной гастропатии, что хорошо согласуется с данными о функциях этой группы ферментов [162, 230, 234]. При профилактическом введении трипептида Leu-Phe-Lys происходило выраженное снижение уровня СОД. Это может свидетельствовать о том, что оксидативное повреждение ткани было значительно снижено под влиянием трипептида, что нивелировало условия для субстратной стимуляции активности СОД.

Введение исследуемого пептида аналогичным образом отразилось на активности каталазы и глутатионпероксидазы. Функция данных ферментов заключается в инактивации  $H_2O_2$ , которая, выполняя в норме сигнальную функцию, может оказывать токсический эффект при избыточном содержании в ткани, в частности, при взаимодействии с ионами металлов и образуя высокореактивный гидроксил-радикал. Каталаза катализирует реакцию разложения образовавшейся перекиси на воду и молекулярный кислород:



Глутатионпероксидаза завершает цикл глутатион-опосредованного восстановления перекиси до воды [130, 159, 230].

В нашем эксперименте на фоне профилактического введения трипептида Leu-Phe-Lys активность данных ферментов снижалась по сравнению с контрольной группой вплоть до уровня интактных крыс. Это вполне может являться логическим продолжением снижения активности СОД в тканях, так как продукт реакции с участием СОД является субстратом для КАТ и ГПО, соответственно, субстратная стимуляция этих ферментов была снижена.

На завершающем этапе работы мы решили изучить влияние трипептида Leu-Phe-Lys на активность циклооксигеназ в СОЖ крыс при индометациновой гастропатии. Это было необходимо для проверки наличия каскада фармакологических эффектов: антиоксидантное действие – снижение воспалительных процессов – ослабление повреждения слизистой оболочки

желудка, который был выявлен ранее в отношении пептидного комплекса из тканей свиных почек.

Оказалось, что профилактическое применение трипептида Leu-Phe-Lys привело к двукратному снижению активности провоспалительного фермента ЦОГ-2 относительно контроля заболевания. Данное наблюдение подтвердило снижение воспалительного повреждения СОЖ, что может быть объяснено снижением окислительного стресса в ткани. Таким образом, с определенной долей уверенности можно полагать, что в основе механизма установленного гастропротекторного действия трипептида Leu-Phe-Lys лежит его прямая или косвенная снижающая оксидативный стресс активность. Учитывая свойства аминокислот, входящих в состав исследуемого трипептида, снижение окислительного стресса может достигаться за счет механизмов: связывание свободных радикалов (наличие концевого лизина), хелатирования ионов металлов, имеющих потенциальную повреждающую активность за счет аминогруппы концевого лизина, усиления этих свойств в липидной мембране клеток за счет гидрофобных свойств лейцина и изолейцина. Ослабление оксидативного стресса в ткани, в свою очередь, снижает ЦОГ-2-ассоциированные воспалительные процессы в слизистой оболочке желудка.

Суммируя вышеизложенное, отметим, что в результате проведенного исследования было идентифицировано соединение-лидер – трипептид Leu-Phe-Lys, который обладает выраженными гастропротекторными свойствами, сопоставимыми с препаратом сравнения омепразолом. Это создает весомые предпосылки для дальнейших доклинических и клинических исследований, направленных на создание и внедрение в практику нового лекарственного средства пептидной природы для профилактики и лечения индометацин-индуцированной гастропатии.

## 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 репарационным 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 противоязвенной 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.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты выполненных исследований рекомендуется использовать для расширенных доклинических исследований трипептида Leu-Phe-Lys как потенциального лекарственного средства для лечения и профилактики заболеваний, сопровождающихся эрозивным повреждением желудка с целью будущего расширения спектра фармакологических средств, используемых в области гастроэнтерологии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеева, Т. А. Патоморфологическая характеристика процессов клеточного обновления в слизистой оболочке желудка при язвенной болезни / Т. А. Агеева, Ю. Г. Мальцева, Л. Н. Чернова. // Вестник НГУ. – 2011. – Т. 9, № 3 – С. 6–12.
2. Акопян, В. А. Изучение роли кальцитонин ген-родственного пептида (КГРП) и его фрагментов в регуляции микроциркуляции : специальность : 03.00.13 «Физиология» : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук / Акопян Виолетта Андрониковна ; Ин-т эволюцион. физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова. – Санкт-Петербург, 1998. – 17 с. – Текст : непосредственный.
3. Анискина, А. И. Влияние аминокислот на клеточную пролиферацию и апоптоз в органотипической культуре тканей молодых и старых крыс / А. И. Анискина, Н. И. Чалисова, А. Н. Закуцкий, и др. // Успехи геронтологии. – 2006. – №. 19. – С. 55-59.
4. Ашмарин, И. П. Глипролины в составе регуляторных трипептидов / И. П. Ашмарин. // Нейрохимия. – 2007. – Т. 24, №. 1. – С. 5–7.
5. Байкова, Э. Р. Особенности состояния системы гемостаза у больных язвенной болезнью желудка / Э. Р. Байкова, М. М. Фазлыев, Р. М. Фазлыева. // Медицинский вестник Башкортостана. – 2011. – № 6. – С. 25–28.
6. Бобров, И. П. Прогностическое значение количественного анализа аргирофильных белков области ядрышкового организатора (AgNOR) при почечно-клеточном раке / И. П. Бобров, Т. М. Черданцева, В. М. Брюханов. // Российский онкологический журнал. – 2013. – № 1. – С. 19–24.
7. Бобров, И. П. Модификация гистохимического метода выявления ядрышковых организаторов на гистологических срезах / И.П. Бобров А.М. Авдалян, В.В. Климачев и др. // Архив патологии. – 2010. – Т. 72, № 3. – С. 35-37.
8. Бобров, И. П. Модифицированный метод выявления аргирофильных белков области ядрышкового организатора на парафиновых срезах / И.П. Бобров,

А.М. Авдалян, Т.М. Черданцева и др. // Морфология. – 2010. – Т. 138, № 5. – С. 65-67.

9. Болоняева, Н. А. Применение даларгина для профилактики и лечения НПВП гастропатий / Н. А. Болоняева, Е. Ю. Животова, М. Ю. Флейшман и др. // Дальневосточный медицинский журнал. – 2005. – № 2. – С. 62–66.

10. Брюханов, В. М. Опыт применения сырья из свиных почек для фармакологической коррекции экспериментального нефролитиаза / В.М. Брюханов, А.Ю. Жариков, Я.Ф. Зверев // Бюллетень сибирского отделения российской академии медицинских наук. – 2011. – Т. 31, № 3. – С. 97-103

11. Винник, Ю. С. Микроциркуляция слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки при язвенной болезни, ассоциированной с *Helicobacter pilory* / Ю. С. Винник, С. И. Картель, Д. В. Черданцев и др. // Методология флоуметрии. – 1998. – №. 2. – С. 83.

12. Гельфанд, Б. Р. Острые кровотечения из верхних отделов желудочно-кишечного тракта: от эпидемиологии до формирования концепции консервативной терапии / Б. Р. Гельфанд, Д. Н. Проценко, А. В. Бабаяну и др. // Инфекции в хирургии. – 2013. – № 4. – С. 11–17.

13. Долгатов, А. Ю. Экспрессия аргирофильных белков, ассоциированных с областью ядрышкового организатора (AgNOR), при раке почки: клинимоρφологические параллели / А. Ю. Долгатов, В. Я. Гервальд, И. П. Бобров. // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – Прил. № 1.– С. 45.

14. Дугина, Ю. Л. Противоязвенные свойства сверхмалых доз антител к гистамину : специальность : 14.00.25, 14.00.16 «Фармакология, клиническая фармакология», «Патологическая физиология» : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук / Дугина Ю.Л. ; [НИИ фармакологии Том. науч. центра СО РАМН]. – Томск, 2003. – 22 с. – Текст : непосредственный.

15. Евсеев, М. А. НПВП-индуцированные гастродуоденальные язвы, осложненные кровотечением / М. А. Евсеев. // Русский медицинский журнал. – 2006. – № 15. – С. 1099–1107.

16. Жариков, А. Ю. Морфологическая оценка влияния пептидного комплекса из тканей свиных почек на течение экспериментальной мочекаменной болезни / А. Ю. Жариков, В. И. Киселев, И. П. Салдан и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – № 164 (8). – С. 237–240.

17. Жариков, А. Ю. Опыт применения трипептида Leu-Phe-Lys для экспериментальной терапии хронического 16-недельного оксалатного нефролитиаза у крыс / А. Ю. Жариков, Н. Н. Якушев, О. Н. Мазко и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 169. – №. 2. – С. 197-202.

18. Жарикова, Г. В. Влияние пептидного комплекса из тканей свиных почек на показатели свободнорадикального окисления при экспериментальной мочекаменной болезни / Г. В. Жарикова, А. Ю. Жариков, В. И. Киселев и др. // Сибирский научный медицинский журнал. – 2017. – № 37 (2). – С. 17–21.

19. Жернакова, Н. И. Мелатонин и другие сигнальные молекулы в развитии соматической патологии у пожилых / Н. И. Жернакова, Д. С. Медведев, К. А. Иванова и др. // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2010. – № 22 (93). – С. 75–77.

20. Животова, Е. Ю. Гастропротективный эффект даларгина при гастропатии, вызванной приемом нестероидных противовоспалительных средств / Е. Ю. Животова, М. Ю. Флейшман, Е. Н. Сазонова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 147, № 4. – С. 420–423.

21. Закуцкий, А. Н. Тканеспецифическое влияние синтетических биорегуляторных пептидов в органотипической культуре тканей молодых и старых крыс / А. Н. Закуцкий, Н. И., Чалисова, Г. А. Рыжак, [и др]. / Успехи геронтологии. – 2006. – №. 19. – С. 93-96

22. Зборовская, И. А. Гастропатии, индуцированные нестероидными противовоспалительными препаратами : Клиническое значение, лечение, профилактика. Методическое пособие для практических врачей / И. А. Зборовская. – Волгоград, 2005. – 41 с. – Текст : непосредственный.



23. Зенит-Журавлева, Е. Г. Нуклеофозмин и нуклеолин: кодирующие гены и экспрессия в различных тканях животных и человека / Е. Г. Зенит-Журавлева, Е. М. Полковниченко, А. А. Лушникова и др. // Молекулярная медицина. – 2012. – № 4. – С. 25–33.

24. Золотарев, В. А. Капсаицин-чувствительные афференты блуждающего нерва / В. А. Золотарев, А. Д. Ноздрачев. // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2001. – № 87 (2). – С. 182–204.

25. Ивянская, Е. В. Исследование антиульцерогенного действия деанола ацеглумата, мексидола и их комбинации с омепразолом, мизопростолом и ранитидином на фоне аллоксанового диабета : специальность 14.03.06 «Фармакология, клиническая фармакология» : дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук / Ивянская Елена Валерьевна ; Московский государственный медико-стоматологический университет. – Старая Купавна, 2010. – 213 с.

26. Калягин, А. Н. Поражения кишечника, вызванные применением нестероидных противовоспалительных препаратов / А. Н. Калягин. // Медицинские новости. – 2003. – № 7. – С. 71–74.

27. Каратеев, А. Е. Коморбидная патология пищеварительной системы у больных ревматическими заболеваниями: не только НПВП-гастропатия / А. Е. Каратаев, Н. В. Гонтаренко, А. В. Цурган. // Научно-практическая ревматология. – 2016. – Т. 54 (4). – С. 382–389.

28. Ким, В. А. НПВП-гастропатия и роль простагландинов в ее возникновении, профилактике и лечении / В. А. Ким. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2008. – № 8. – С. 84–91.

29. Кияйкина, О. М. Исследование антиульцерогенного действия деанола ацеглумата в условиях индуцирования язвенного поражения желудочно-кишечного тракта индометацином и бутадионом : специальность 14.03.06 «Фармакология, клиническая фармакология» : дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук / Кияйкина Оксана Михайловна ; Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева – Ст. Купавна, 2009.

30. Клаан, Н. К. Ядерный фактор каппа в (NF-kB) в качестве мишени для действия природных противоопухолевых соединений / Н. К. Клаан, Т. А. Пронина, Л. П. Акиншина и др // Российский биотерапевтический журнал. – Текст : непосредственный. – 2013. – № 13 (1). – С. 3–8.

31. Козина, Л. С. и др. Изучение антиоксидантных и мембранопротекторных свойств коротких пептидов в модельных экспериментах / Л. С. Козина, С. Л. Стволинский, Т. Н. Федорова, и др. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2008. – №. 6. – С. 31-36.

32. Корниенко, И. В. и др. Механизм антиоксидантного действия полипептидов: экспериментальное и теоретическое изучение / И. В. Корниенко, М. Б. Клецкий, Л. П. Олехнович. // Биотехнология. – 2001. – №. 2. – С. 83.

33. Куняева, Т. А. Исследование антиульцерогенного действия производного оксиникотиновой кислоты лбк-149 в эксперименте : специальность 14.00.25 «Фармакология, клиническая фармакология» : автореферат дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук / Куняева Татьяна Александровна ; Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева – Саранск, 2005.

34. Курсов, С. В. Циклооксигеназа: физиологические эффекты, действие ингибиторов и перспективы дальнейшего использования парацетамола (аналитический обзор) / С. В. Курсов, В. В. Никонов. // Медицина неотложных состояний. – 2016. – Т. 76, № 5. – С. 27–35.

35. Литвицкий, П. Ф. Воспаление / П. Ф. Литвицкий. // Вопросы современной педиатрии. – 2006. – Т. 5, №. 4. – С. 60–63.

36. Литовский, И. А. Гастродуоденальные язвы и хронический гастрит (гастродуоденит). Дискуссионные вопросы патогенеза, диагностики, лечения / И. А. Литовский, А. В. Гордиенко. – Санкт-Петербург : СпецЛит, 2017. – 302 с. – Текст : непосредственный.

37. Маев, И. В. Лечение язвенных кровотечений и профилактика их рецидивов: взгляд терапевта / И. В. Маев, А. Ю. Гончаренко, Д. Т. Дичева и др. // Медицинский совет. – 2013. – № 10. – С. 22–26.

38. Маев, И. В. Терапевтические аспекты лечения язвенных кровотечений / И. В. Маев, В. В. Цуканов, О. В. Третьякова и др. // Фарматека. – 2012. – № 2. – С. 56–59.
39. Морозов, В. Г. Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем-цитомедины / В. Г. Морозов, В. Х. Хавинсон. // Успехи современной биологии. – 1983. – Т. 96. – №. 3. – С. 339-339.
40. Морозов, В. Г. Пептидные тимомиметики / В. Г. Морозов, В. Х. Хавинсон, В. В. Малинин. – СПб.: Наука, 2000.—158 с.
41. Мотина Н. Благоприятное воздействие антиоксидантной терапии на структурную перестройку почки в условиях экспериментального оксалатного нефролитиаза / Н. В. Мотина, В. М. Брюханов, Я. Ф. Зверев и др. // Нефрология. – 2011. – Т. 15, № 2. – С. 57–61.
42. Насонов, Е. Л. Рациональное использование нестероидных противовоспалительных препаратов: клинические рекомендации / Е. Л. Насонов, В. Т. Ивашкин, Н. Н. Яхно и др. – Текст: электронный // Научно-практическая ревматология. – 2018. – Т. 56. – С. 1–29. – URL: <https://rsp.ima-press.net/rsp/article/view/2536/1691.pdf>. (дата обращения: 07.04.2019).
43. Никонова, Л. В. Грелин: физиологические аспекты действия / Л. В. Никонова, Э. В. Давыдчик. // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2013. – № 3 (43). – С. 23–25.
44. Новиков, В. Е. НПВН-индуцированные гастропатии и их профилактика / В. Е. Новиков, Н. О. Крюкова, А. В. Крикова. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2008. – Т. 6, № 1. – С. 26–30.
45. Пахомова, И. Г. Новые возможности в минимизации риска НПВП-индуцированных гастропатий / И. Г. Пахомова. // Русский Медицинский Журнал (РМЖ). – 2014. – № 10. – С. 772.
46. Поленов, С. А. Вазомоторные эффекты нейропептидов / С. А. Поленов, Д. П. Дворецкий, Г. В. Чернявская. // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 1995. – № 81 (6). – С. 29–47.

47. Празднова, Е. В. Роль остатка лизина в антиоксидантной и днк-протекторной активности олигопептидов / Е. В. Празднова, М. С. Мазанко, П. В. Золотухин // Успехи геронтологии. – 2016. – Т. 29. – №. 5. – С. 776-783.

48. Ройтберг, Г. Е. Лекарственные поражения гастродуоденальной зоны / Г. Е. Ройтберг, Т. Е. Полунина. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2002. – № 3. – С. 9–15.

49. Саватеева-Любимова, Т. Н. Гастропротекторная активность аналогов дипептида глутамил-триптофана и мелатонина / Т. Н. Саватеева-Любимова, К. В. Сивак, В. В. Малинин. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – № 2. – С. 17–21.

50. Степанов, Ю. М. Динамика содержания ЦОГ-2 в слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки на фоне медикаментозной коррекции НПВП-гастропатий / Ю. М. Степанов, Ю. С. Бреславец // Гастроэнтерология. – 2013. – Т. 4, № 1. – С. 36–42.

51. Талалаева, О.С. Коррекция с помощью диуретиков нарушений свободно-радикального окисления в условиях экспериментальной ишемии почек : дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук / Талалаева Ольга Сергеевна ; Алтайский государственный медицинский университет. – Барнаул, 2006. – 143 с. – Текст : непосредственный.

52. Толстенок, И. В. Влияние глипролина (Pgp) и его аргинисодержащего аналога (RGP) на процессы язвообразования в слизистой оболочке желудка белых мышей на модели НПВП-гастропатии / И. В. Толстенок, В. В. Брагина, М. Ю. Флейшман. // Дальневосточный медицинский журнал. – 2016. – № 4. – С. 74–77.

53. Толстенок, И. В. Е.В. Влияние глипролинов на процессы язвообразования в эксперименте / И. В. Толстенок, М. Ю. Флейшман, Е. В. Слободенюк. // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2016. – № 4 (66). – С. 14–15.

54. Федеральная служба государственной статистики : официальный сайт. – Москва. –URL: <https://www.gks.ru> (дата обращения: 05.04.2019). – Текст : электронный.

55. Хавинсон, В.Х. Пептиды тканеспецифически стимулируют дифференцировку клеток при их старении / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, В.О. Полякова и др. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. – № 1. – С. 34–37.

56. Хуцишвили, М. Ш. Региональные особенности фармакоэпидемиологии нестероидных противовоспалительных препаратов и возможности оптимизации их потребления: на примере Правобережного района Республики Северная Осетия-Алания : специальность : 14.00.25 «Фармакология, клиническая фармакология» : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук / Хуцишвили Марина Шалвовна ; Кубанский государственный медицинский университет. – Волгоград, 2007. – 22 с. – Текст : непосредственный.

57. Циммерман, Я. С. Нерешенные и спорные проблемы современной гастроэнтерологии / Я. С. Циммерман. – Москва : МЕДпресс-информ, 2013. – 224 с. – Текст : непосредственный.

58. Чернооков, А. И. Эпидемиология сочетанных осложнений язвенной болезни желудка III типа и двенадцатиперстной кишки / А. И. Чернооков, А. В. Яковченко, Б. А. Наумов. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2008. – № 5, прил. № 32. – С. 42.

59. Чистяков, В. А. Неспецифические механизмы защиты от деструктивного действия активных форм кислорода / В. А. Чистяков. // Успехи соврем. биол. – 2008. – Т. 128. № 3. – С. 301–308.

60. Шалыгин, Л. Д. Современные представления о механизмах регуляции артериального давления / Л. Д. Шалыгин. // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н. И. Пирогова. – 2015. – Т. 10, №. 2. – С. 109–117.

61. Ширинская, Н. В. Язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки в Российской Федерации. Заболеваемость и смертность / Н. В. Ширинская. // Дальневосточный медицинский журнал. – 2016. – № 3. – С. 105–109.

62. Шостак, Н. А. Желудочно-кишечное кровотечение как осложнение гастропатий, связанных с приемом нестероидных противовоспалительных

препаратов / Н. А. Шостак, А. А. Рябкова, В. С. Савельев и др. // Терапевтический архив. – 2003. – № 5. – С. 70–74.

63. Alelign, T. Kidney Stone Disease: An Update on Current Concepts / T. Alelign, B. Petros. // *Advances in Urology*. – 2018. – Article ID 3068365. (дата обращения: 10.05.2019)

64. Bandyopadhyay D. Gastric toxicity and mucosal ulceration induced by oxygen-derived reactive species: protection by melatonin / D. Bandyopadhyay, K. Biswas, R. J. Reiter, et al. // *Current molecular medicine*. – 2001. – Vol. 1. – №. 4. – P. 501-513.

65. Bhattacharjee M. Critical role of an endogenous gastric peroxidase in controlling oxidative damage in *H. pylori*-mediated and nonmediated gastric ulcer / M. Bhattacharjee, S Bhattacharjee, A. Gupta, et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2002. – Vol. 32. – №. 8. – P. 731-743

66. Bindu, S. Nonsteroidal anti-inflammatory drug induces proinflammatory damage in gastric mucosa through NF- $\kappa$ B activation and neutrophil infiltration: Anti-inflammatory role of heme oxygenase-1 against nonsteroidal anti-inflammatory drug / S. Bindu, S. Mazumder, S. Dey. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2013. – Vol. 65. – P. 456–467.

67. Binz, C. Uber wirkung der salicylsaure auf die gessermuttery / C. Binz. // *Berliner Klinische Wochenschrift*. – 1893. – Bd. 30. – S. 85–87.

68. Biswas, K. A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical / K. Biswas, U. Bandyopadhyay, I. Chattopadhyay et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – №. 13. – P. 10993–11001.

69. Bjarnason, I. Intestinal permeability in the pathogenesis of NSAID-induced enteropathy / I. Bjarnason, K. J Takeuchi. // *Gastroenterology*. – 2009. – Vol. 44. – Suppl. 19. – P. 23–29.

70. Bjarnason, I. Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans / I. Bjarnason, J. Hayllar, A. J. MacPherson et al. // *Gastroenterology*. – 1993. – Vol. 104. – P. 1832–1847.

71. Bloom, S. R. Adrenal responses to calcitonin gene-related peptide in conscious hypophysectomized calves / S. R. Bloom, A. V. Edwards, C. T. Jones. // *The Journal of Physiology*. – 1989. – Vol. 409. – P. 29–41.

72. Brand, M.D. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins / M. D. Brand, C. Affourtit, T. C. Esteves et al. // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2004. – Vol. 37. – P. 755–767.

73. Brooks, J. Prevention of upper gastrointestinal haemorrhage: current controversies and clinical guidance / J. Brooks, R. Warburton, I. L. Beales. // *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. – 2013. – Vol. 4 (5). – P. 206–222.

74. Brzozowski, T. Prostaglandin/cyclooxygenase pathway in ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury / T. Brzozowski et al. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2006. – Vol. 319, № 1. – P. 477–487.

75. Brzozowski, T. Role of gastric acid secretion in progression of acute gastric erosions induced by ischemia-reperfusion into gastric ulcers / T. Brzozowski, P. C. Konturek, S. J. Konturek et al. // *European Journal of Pharmacology*. – 2000. – Vol. 398. – P. 147–158.

76. Brzozowski, T. Role of nitric oxide and prostaglandins in gastroprotection induced by capsaicin and papaverine / T. Brzozowski, D. Drozdowicz, A. Szlachcic et al. // *Digestion*. – 1993. – Vol. 54 (1). – P. 24–31.

77. Canet, V. Correlation between silver-stained nucleolar organizer region area and cell cycle time / V. Canet, M. P. Montmasson, Y. Usson et al. // *Cytometry*. – 2001. – Vol. 43 (2). – P. 110–116.

78. Chen, H. M. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean  $\beta$ -conglycinin / H. M. Chen, K. Muramoto, F. Yamauchi. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1995. – Vol. 43. – P. 574–578.

79. Chiou, S. K. Sulindac sulfide induces autophagic death in gastric epithelial cells via survivin down-regulation: a mechanism of NSAIDs-induced gastric injury / S. K. Chiou, N. Hoa, A. Hodges. // *Biochemical Pharmacology*. – 2011. – Vol. 81. – P. 1317–1323.

80. Cho, C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders / C. H. Cho. // *Journal of Physiology Paris*. – 2001. – Vol. 95. – P. 253–256.
81. Choi, Y. J. Repeated oral administration of capsaicin increases anxiety-like behaviors with prolonged stress-response in rats / Y. J. Choi, J. Y. Kim, S. B. Yoo et al. // *Journal of Biosciences*. – 2013. – Vol. 38 (3). – P. 561–571.
82. Clementi, G. Gastroprotective effect of adrenomedullin administered subcutaneously in the rat / G. Clementi, A. Caruso, V. M. C. Cutuli et al. // *Peptides*. – 2002. – Vol. 23 (6). – P. 1149–1153.
83. Crofford, L. J. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. / L. J. Crofford. // *J. Rheumatol. Suppl.* – 1997. Vol. 49. – P. 15-19.
84. Cryer, B. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastrointestinal toxicity / B. Cryer. // *Current Opinion in Gastroenterology*. – 2001. – № 17. – P. 503–512.
85. Cryer, B. Peptic ulcer disease / B. Cryer, S. J. Spechler. // *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease* / edit. M. Feldman, L. S. Friedman, L. J. Brandt. – 8th edition. – Philadelphia : Saunders, 2006. – P. 1089–1110.
86. Dardamanis, M. Pathomechanisms of nephrolithiasis / M. Dardamanis. // *Hippokratia*. – 2013. – Vol. 17 (2). – P. 100–107.
87. Das, D. Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration / D. Das, R. K. Banerjee. // *Molecular and cellular biochemistry*. – 1993. – Vol. 125. – №. 2. – P. 115-125.
88. Das, D. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration / D. Das, D. Bandyopadhyay, M. Bhattacharjee, et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1997. – Vol. 23. – №. 1. – P. 8-18.
89. Daskal, Y. Evidence from studies on segregated nucleoli that nucleolar silver staining proteins C23 and B23 are in the fibrillar component / Y. Daskal, K. Smetana, H. Busch. // *Exptl. Cell. Res.* – 1980. – Vol. 127, №2 – P. 285-291.
90. Del Valle, J. Peptic ulcer disease and related disorders / J. Del Valle. // *Harrison's Principles of Internal Medicine* / ed. A. S. Fauci, D. L. Kasper, D. L. Longo et al. – 17th edition. – New York : McGraw-Hill Professional, 2008. – P. 1855–1872.



91. Demaurex, N. Reactive oxygen species are NOXious for neurons / N. Demaurex, L. Scorrano. // *Nature Neuroscience*. – 2009. – Vol. 12 (7). – P. 819–820.
92. Derry, S. Risk of gastrointestinal haemorrhage with long-term use of ASA: meta-analysis / S. Derry. // *The BMJ*. – 2000. – Vol. 7270, № 321. – P. 1183–1187.
93. Douthwaite, A. Gastroscopic observation of effect of aspirin and certain other substances on stomach / A. Douthwaite, G. Lintott. // *Lancet*. – 1938. – Vol. 2. – P. 1222–1225.
94. Evangelista, S. Pharmacological evidence for the involvement of multiple calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors in the antisecretory and antiulcer effect of CGRP in rat stomach / S. Evangelista, M. Tramontana, C. A. Maggi. // *Life Sciences*. – 1991. – Vol. 50. – P. 13–18.
95. Fariss, M. W. Role of mitochondria in toxic oxidative stress / M. W. Fariss, C. B. Chan, M. Patel et al. // *Molecular Interventions*. – 2005. – Vol. 5 (2). – P. 94–111.
96. Ferri, F. F. *Ferri's Clinical Advisor 2015* / F. F. Ferri. – New York : Elsevier, 2015. – 1824 p. – Text : direct.
97. Fiorucci, S. TNFalpha processing enzyme inhibitors prevent aspirin-induced TNFalpha release and protect against gastric mucosal injury in rats / S. Fiorucci, A. Antonelli, G. Migliorati et al. // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. – 1998. – Vol. 12. – P. 1139–1153.
98. Flora, S. J. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure / S. J. Flora. // *Oxid Med Cell Longev*. – 2009/ Vol. 2(4). – P. 191–206.
99. Förstermann, U. Nitric oxide synthases: regulation and function / U. Förstermann, W. C. Sessa. // *European Heart Journal*. – 2012. – Vol. 33. – P. 829–837.
100. Fridovich, I. Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters / I. Fridovich. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 25, № 272 (30). – P. 18515–18517.
101. Fries, J. F. The rise and decline of nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastropathy in rheumatoid arthritis / J. F. Fries, K. N. Murtagh, M. Bennett et al. // *Arthritis & Rheumatology*. – 2004. – Vol. 50 (8). – P. 2433–2440.

102. Fu, Y. Gastroprotective and anti-ulcer effects of oxymatrine against several gastric ulcer models in rats: Possible roles of antioxidant, antiinflammatory, and prosurvival mechanisms / Y. Fu, H. Q. Wu, H.L. Cui [et al.]. // *Phytotherapy Research*. – 2018. Vol. 32 (10). – P. 2047–2058.

103. Fujimori, S. What are the effects of proton pump inhibitors on the small intestine? / S. Fujimori. // *World Journal of Gastroenterology*. – 2015. – Vol. 14, № 21 (22). – P. 6817–6819.

104. Furukawa, O. Effect of ecabet disodium, a novel locally-acting antiulcer drug, on epithelial restitution following injury by hypertonic NaCl in bullfrog stomach in vitro / O. Furukawa, E. Kume, S. Sugamoto et al. // *Digestion*. – 2000. – Vol. 62. – P. 116–125.

105. Galfre, G. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines / G. Galfre, S. C. Howe, C. Milstein, et al. // *Nature*. – 1977. – Vol. 266. – №. 5602. – P. 550-552.

106. García Rodríguez, L. A. Variability in risk of gastrointestinal complications with different nonsteroidal anti-inflammatory drugs / L. A. García Rodríguez. // *The American Journal of Medicine*. – 1998. – Vol. 104, № 3. – P. 30S–34S.

107. Gill, R. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors / R. Gill, A. Tsung, T. Billiar. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2010. – Vol. 48 (9). – P. 1121–1132.

108. Gillian, E. C. Roles of Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in Prostanoid Production by Human Endothelial Cells: Selective Up-Regulation of Prostacyclin Synthesis by COX-2 / E. C. Gillian E., L. G. Cleland, P. S. Penglis, et al. / *The Journal of Immunology*. – 2001. 167 (5). – P. 2831-2838.

109. Gillisen, A. Nacystelyn, a novel lysine salt of N-acetylcysteine, to augment cellular antioxidant defence in vitro / A. Gillissen, M. Jaworska, M. Orth. et al. // *Respir. med.* – 1997. – Vol. 91. № 3. – P. 159–168.

110. Giordano, S. Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease / S. Giordano, V. Darley-USmar, J. Zhang. // *Redox biology*. – 2014. – Vol. 2. – P. 82–90.

111. Griffith, O. W. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism / O. W. Griffith, D. J. Stuehr. // *Annual Review of Physiology*. – 1995. – Vol. 57. – P. 707–736.
112. Gurpinar, E. COX-Independent Mechanisms of Cancer Chemoprevention by Anti-Inflammatory Drugs / E. Gurpinar, W. E. Grizzle, G. A. Piazza Pahl. // *Frontiers in Oncology*. – 2013. – Vol. 3. – Article 181.
113. Guy, E. Endothelial cell metabolism / E. Guy, P. de Zeeuw, L. Treps. // *Physiological Reviews*. – 2018. – Vol. 98 (1). – P. 3–58.
114. Gyires, K. Activation of central opioid receptors may induce gastric mucosal defence in the rat / K. Gyires, K. Müllner, A. Z. Rónai. // *Journal of Physiology-Paris*. – 2001. – Vol. 95, № 1-6. – P. 189–196.
115. Gyires, K. Neuropeptides and gastric mucosal homeostasis / K. Gyires. // *Current topics in medicinal chemistry-hilversum*. – 2004. – Vol. 4. – P. 63–74.
116. Gyires, K. Supraspinal  $\delta$ -and  $\mu$ -opioid receptors mediate gastric mucosal protection in the rat / K. Gyires, A. Z. Ronai. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2001. – Vol. 297. – № 3. – C. 1010–1015.
117. Handa, O. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) production by rat gastric epithelial cells: role of reactive oxygen species and nuclear factor- $\kappa$ B / O. Handa, Y. Naito, T. Takagi. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2004. – Vol. 309. – №. 2. – P. 670–676.
118. Harada, S. Autophagy Deficiency Diminishes Indomethacin-Induced Intestinal Epithelial Cell Damage through Activation of the ERK/Nrf2/HO-1 Pathway / S. Harada et al. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2015. – Vol. 355. – P. 353–361.
119. Harada, S. Autophagy Deficiency Diminishes Indomethacin-Induced Intestinal Epithelial Cell Damage through Activation of the ERK/Nrf2/HO-1 Pathway / S. Harada, T. Nakagawa, S. Yokoe et al. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2015. – Vol. 355 (3). – P. 353–361.

120. Harirforoosh, S. Adverse Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs: An Update of Gastrointestinal, Cardiovascular and Renal Complications / S. Harirforoosh, W. Asghar, F. Jamali. // *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. – 2013. – № 16 (5). – С. 821–847.
121. Hensley, K. Redox regulation of autophagy in healthy brain and neurodegeneration / K. Hensley, M. E. Harris-White. // *Neurobiology of disease*. – 2015. – Vol. 84. – P. 50–59.
122. Hernández, C. Peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori*-infected children: clinical findings and mucosal immune response / C. Hernández, C. Serrano, H. Einisman. // *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. – 2014. – Vol. 59(6). – P. 773-778.
123. Higuchi, K. Present status and strategy of NSAIDs-induced small bowel injury / K. Higuchi, E. Umegaki, T. Watanabe. // *Journal of Gastroenterology*. – 2009. – Vol. 44. – P. 879–888.
124. Hlavaty, J. J. Identification of the metal-binding sites of restriction endonucleases by Fe<sup>2+</sup>-mediated oxidative cleavage / J. J. , Hlavaty, J. S. Benner, L. J. Hornstra, I. Schildkraut. // *Biochemistry*. – 2000. – Vol. 39. № 11. – P. 3097–105.
125. Holzer, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons / P. Holzer. // *Pharmacological Reviews*. – 1991. – Vol. 43 (2). – P. 143–201.
126. Holzer, P. Dissociation of dorsal root ganglion neurons into afferent and efferent-like neurons / P. Holzer, C. A. Maggi. // *Neuroscience*. – 1998. – Vol. 86 (2). – P. 389–398.
127. Holzer, P. Neural emergency system in the stomach / P. Holzer. // *Gastroenterology*. – 1998. – Vol. 114(4). – P. 823–839.
128. Holzer, P. Sensory neurons signal for an increase in rat gastric mucosal blood flow in the face of pending acid injury / P. Holzer, E. H. Livingston, P. H. Guth. // *Gastroenterology*. – 1991. – Vol. 101. – P. 416–423.
129. Holzer, P. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation / P. Holzer, U. Holzer-Petsche. // *Pharmacology & Therapeutics*. – 1997. – Vol. 73. – P. 219–263.

130. Hosseini, M. J. Toxicity of copper on isolated liver mitochondria: impairment at complexes I, II, and IV leads to increased ROS production / M. J. Hosseini et al. // *Cell biochemistry and biophysics*. – 2014. – Vol. 70. – № 1. – С. 367–381.
131. Huang, J. Q. Role of *Helicobacter pylori* infection and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis / J. Q. Huang, S. Sridhar, R. H. Hunt. // *Lancet*. – 2002. – Vol. 359. – P. 14–22.
132. Hudson, N. Famotidine for healing and maintenance in NSAID associated gastroduodenal ulceration / N. Hudson, A. S. Taha, R. I. Russel et al. // *Gastroenterology*. – 1997. – Vol. 112, № 6. – P. 1817–1822.
133. Hudson, N. Famotidine for the prevention of gastric and duodenal ulcers caused by NSAID / N. Hudson, A. S. Taha, C. J. Hawkey et al. // *New England Journal of Medicine*. – 1996. – Vol. 334, № 22. – P. 1435–1439.
134. Indomethacin. // National Center for Biotechnology Information : [website]. – 2019. – URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indomethacin> (дата обращения: 12.05.2019)
135. Jackson, M. A. Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota / M. A. Jackson, J. K. Goodrich, M. E. Maxan et al. // *Gut*. – 2016. – Vol. 65 (5). – P. 749–756.
136. Jacob, M. A study of the effects of indometacin on liver mitochondria from rats, mice and humans / M. Jacob, I. Bjarnason, S. Rafi et al. // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. – 2001. – Vol. 15 (11). – P. 1837–1842.
137. Kargman, S. Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts / S. Kargman, S. Charleson, M. Cartwright et al. // *Gastroenterology*. – 1996. – Vol. 111. – P. 445–454.
138. Kato, K. CGRP antagonists enhance gastric acid secretion in 2-h pylorus-ligated rats / K. Kato, V. Martinez, S. St. Pierre et al. // *Peptides*. – 1995. – Vol. 16. – P. 1257–1262.

139. Khaskhali, M. H. The effect of calcium on calcium oxalate monohydrate crystal-induced renal epithelial injury / M. H. Khaskhali, K. J. Byer, S. R. Khan. // *Urological Research*. – 2009. – Vol. 37 (1). – P. 1–6.
140. Klionsky, D. J. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy / D. J. Klionsky, K. Abdelmohsen, A. Abe et al. // *Autophagy*. – 2016. – Vol. 12 (1). – P. 1–222.
141. Komoike, Y. Prevention by parenteral aspirin of indomethacin-induced gastric lesions in rats: mediation by salicylic acid / Y. Komoike, M. Takeeda, A. Tanaka et al. // *Digestive Diseases and Sciences*. – 2002. – Vol. 47 (7). – P. 1538–1545.
142. Konturek, P.C. Ghrelin-a new gastroprotective factor / P. C. Konturek et al. // *Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2004. – Vol. 55, № 2. – P. 325–336.
143. Kwiecień, S. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury / S. Kwiecień, T. Brzozowski, S. J. Konturek. // *Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2002. – Vol. 53. – P. 39–50.
144. Laakso, S. Inhibition of lipid peroxidation by casein: Evidence of molecular encapsulation of 1,4-pentadiene fatty acids / S. Laakso. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1984. – Vol. 792. – P. 11–15.
145. Laine, L. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside / L. Laine, K. Takeuchi, A. Tarnawski. // *Gastroenterology*. – 2008. – Vol. 135 (1). – P. 41–60.
146. Lambrecht, N. Role of calcitonin gene-related peptide and nitric oxide in the gastroprotective effect of capsaicin in the rat / N. Lambrecht, M. Burchert, M. Respondek. // *Gastroenterology*. – 1993. – Vol. 104. – P. 1371–1380.
147. Lancaster-Smith, M. J. Ranitidine in the treatment of nonsteroidal anti-inflammatory drug associated gastric and duodenal ulcers / M. J. Lancaster-Smith, M. E. Jaderberg, D. A. Jackson. // *Gut*. – 1991. – Vol. – P. 252–255.
148. Lapenna, D. Antioxidant properties of omeprazole / D. Lapenna, S. de Gioia, G. Ciofani et al. // *FEBS letters*. – 1996. – Vol. 382. – №. 1-2. – P. 189–192.

149. Lawson, D.C. Effect of CGRP antagonist,  $\alpha$ -CGRP8–37, on acid secretion in the dog / D. C. Lawson, C. R. Mantyh, T.N. Pappas. // *Digestive Diseases and Sciences*. – 1994. – Vol. 39. – P. 1405–1408.
150. Lee, H. J. Mitigated NSAID-induced apoptotic and autophagic cell death with Smad7 overexpression / H. J. Lee, J. M. Park, K. B. Hahm. // *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. – 2017. – Vol. 60. – P. 55–62.
151. Li, X. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers / X. Li, P. Fang, J. Mai [et al]. // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2013. – Vol. 25. – P. 6–19.
152. Lieberthal, W. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury / W. Lieberthal, J. S. Levine. // *American Journal of Physiology*. – 1996. – Vol. 271 (3 Pt 2). – P. 477–488.
153. Lo, W. K. Proton pump inhibitor use and the risk of small intestinal bacterial overgrowth: a meta-analysis / W. K. Lo, W. W. Chan. // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2013. – Vol. 11 (5). – P. 483–490.
154. Lopez-Belmonte, J. The paradoxical vascular interactions between endothelin-1 and calcitonin gene-related peptide in the rat gastric mucosal microcirculation / J. Lopez-Belmonte, B. J. R. Whittle. // *British Journal of Pharmacology*. – 1993. – Vol. 110. – P. 496–500.
155. Maiden, L. Long-term effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 selective agents on the small bowel: a cross-sectional capsule enteroscopy study / L. Maiden, B. Thjodleifsson, A. Seigal et al. // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2007. – Vol. 5. – P. 1040–1045.
156. Main, I. H. Investigation of the vasodilator and antisecretory role of prostaglandins in the rat gastric mucosa by use of non-steroidal anti-inflammatory drugs / I. H. Main, B. J. Whittle. // *British journal of pharmacology*. – 1975. – Vol. 53, № 2. – P. 217–224.
157. Maity, P. Indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug, develops gastropathy by inducing reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathology and associated apoptosis in gastric mucosa. A novel role of mitochondrial aconitase

oxidation / P. Maity, S. Bindu, S. Dey et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Vol. 284. – P. 3058–3068.

158. Maity, P. Lansoprazole protects and heals gastric mucosa from non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced gastropathy by inhibiting mitochondrial as well as Fas-mediated death pathways with concurrent induction of mucosal cell renewal. / P. Maity, S. Bindu, V. Choubey et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283. – P. 14391–14401.

159. Margis, R. Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview / R. Margis, C. Dunand, F. K. Teixeira, M. M. Pinheiro // *FEBS Journal*. – 2008. – Vol. 275. – P. 3959–3970.

160. Matsui, H. The pathophysiology of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced mucosal injuries in stomach and small intestine / H. Matsui, O. Shimokawa, T. Kaneko et al. // *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. – 2011. – Vol. 48 (2). – P. 107–111.

161. McQuaid, K. R. Systematic review and meta-analysis of adverse events of low-dose aspirin and clopidogrel in randomized controlled trials / K. R. McQuaid, L. Laine. // *The American Journal of Medicine*. – 2006. – Vol. 119. – P. 624–638.

162. Meng, J. The decay of Redox-stress Response Capacity is a substantive characteristic of aging: Revising the redox theory of aging / J. Meng, Z. Lv, X. Qiao et al. // *Redox Biology*. – 2017. – Vol. 11. – P. 365–374.

163. Mersereau, W. A. Role of gastric mucosal folds in formation of focal ulcers in the rat / W. A. Mersereau, E. J. Hinchey. // *Surgery*. – 1982. – Vol. 91. – P. 150–155.

164. Miller, T. A. Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: Current knowledge and proposed mechanisms / T. A. Miller // *American Journal of Physiology*. – 1983. – Vol. 245. – P. 601–623.

165. Mizushima, N. The role of Atg proteins in autophagosome formation / N. Mizushima, T. Yoshimori, Y. Ohsumi. // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 2011. – Vol. 27. – P. 107–132.

166. Nag, D. S. Indomethacin impairs mitochondrial dynamics by activating the PKC $\zeta$ -p38DRP1 pathway and inducing apoptosis in gastric cancer and normal mucosal



cells / D. S. Nag, S. Pramanik, K. Mitra. // *Journal of biological chemistry*. – 2019. – April 2. – URL : <http://www.jbc.org/content/early/2019/04/02/jbc.RA118.004415.full.pdf> (дата обращения: 12.05.2019).

167. Nagano, Y. Rebamipide significantly inhibits indomethacin-induced mitochondrial damage, lipid peroxidation, and apoptosis in gastric epithelial RGM-1 cells / Y. Nagano, H. Matsui, M. Muramatsu et al. // *Digestive Diseases and Sciences*. – 2005. – Vol. 50. – P. 76–83.

168. Nakayama, M. Low-dose aspirin is a prominent cause of bleeding ulcers in patients who underwent emergency endoscopy / M. Nakayama, R. Iwakiri, M. Hara et al. // *Journal Gastroenterology*. – 2009. – Vol. 44. – P. 912–918.

169. Nguyen T. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro / T. Nguyen, D. Brunson, C.L. Crespi et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1992. – Vol. 89. – P. 3030–3034.

170. O'Neill, G. P. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues / G. P. O'Neill, A. W. Ford-Hutchinson. // *FEBS Letters*. – 1993. – Vol. 330. – P. 156–160.

171. Ock, C. Y. Genetic ablation or pharmacologic inhibition of autophagy mitigated NSAID-associated gastric damages / C. Y. Ock, J. M. Park, Y. M. Han et al. // *Journal of Molecular Medicine*. – 2017. – Vol. 95 (4). – P. 405–416.

172. Ohno, T. Dilatation and constriction of rat gastric mucosal microvessels through prostaglandin EP2 and EP3 receptors / T. Ohno, M. Katori, M. Majima et al. // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. – 1999. – Vol. 13. – P. 1243–1250.

173. Okada, M. Role of prostaglandin deficiency in pathogenic Mechanism of gastric lesions induced by indomethacin in rats / M. Okada, H. Niida, K. Takeuchi. // *Digestive Diseases and Sciences*. – 1989. – Vol. 34. – P. 694–702.

174. Ootani, H. Role of Helicobacter pylori infection and nonsteroidal anti-inflammatory drug use in bleeding peptic ulcers in Japan / H. Ootani, R. Iwakiri, R. Shimoda et al. // *Journal Gastroenterology*. – 2006. – Vol. 41. – P. 41–46.

175. Othman, A. I. The protective action of melatonin on indomethacin-induced gastric and testicular oxidative stress in rats / A. I. Othman, M. A. El-Missiry, M. A. Amer. // *Redox Report*. – 2001. – Vol. 6, № 3. – P. 173–177.
176. Ott, M. Mitochondria, oxidative stress and cell death / M. Ott, V. Gogvadze, S. Orrenius et al. // *Apoptosis*. – 2007. – № 12 (5). – P. 913–922.
177. Pahl, H. L. Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcriptional factors / H. L. Pahl. // *Oncogene*. – 1999. – Vol. 18. – P. 6853–6866.
178. Pal, C. Gallic acid prevents nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy in rat by blocking oxidative stress and apoptosis / C. Pal, S. Bindu, S. Dey et al. // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2010. – Vol. 49. – P. 258–267.
179. Pal, C. Tryptamine-gallic acid hybrid prevents non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy: correction of mitochondrial dysfunction and inhibition of apoptosis in gastric mucosal cells / C. Pal, S. Bindu, S. Dey et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287 (5). – P. 3495–3509.
180. Powell, D. W. Physiological concepts of epithelial barriers / D. W. Powell. // *Mechanisms of Mucosal Protection in the Upper Gastrointestinal Tract*. – New York : Raven Press, 1984. – P. 1–5.
181. Poynard, T. Meta-analysis of randomized clinical trials comparing lansoprazole with ranitidine or famotidine in the treatment of acute duodenal ulcer / T. Poynard, M. Lemaire, H. Agostini. // *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. – 1995. – Vol. 7. – P. 661–665.
182. Rajapakse, N. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties / N. Rajapakse, E. Mendis, W.-K. Jung, J.-Y. Je, S.-K. Kim. // *Food Research International*. – 2005. – Vol. 38, № 2. – P. 175–182.
183. Robert, A. Cytoprotection by prostaglandins / A. Robert. // *Gastroenterology*. – 1979. – Vol. 77. – P. 761–767.
184. Robinson, D. R. Eicosanoid, inflammation and anti inflammation drug / D. R. Robinson. // *Clinical and Experimental Rheumatology*. – 1987. – Vol. 7, Suppl. 3. – P. 155–161.

185. Roth, S. H. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. We started it - can we stop it? / S. H. Roth. // *Archives of Internal Medicine*. – 1986. – № 146 (6). – P. 1075–1076.
186. Sarah, A. The non-COX targets of NSAIDs, lipoxygenases, PPARs, IKK and NF $\kappa$ B, do not reduce A $\beta$ 42 production / A. Sarah, S.W. Sagi, S. Weggen et al. // *Journal of biological chemistry*. – 2003. – June 12. – URL : <http://www.jbc.org/content/early/2003/06/12/jbc.M303588200.full.pdf> (датаобращения: 12.05.2019).
187. Scarpignato, C. Towards a GI safer antiinflammatory therapy / C. Scarpignato, I. Bjarnason, J. Bretagne et al. // *International Journal of Gastroenterology*. – 1999. – Vol. 12 (4). – P. 186–215.
188. Scheiman, J. M. The use of proton pump inhibitors in treating and preventing NSAID-induced mucosal damage / J. M. Scheiman. // *Arthritis Research & Therapy*. – 2013. – Vol. 15 (3). – S. 5.
189. Scheiman, J. M. The use of proton pump inhibitors in treating and preventing NSAID-induced mucosal damage / J. M. Scheiman. // *Arthritis Research & Therapy*. – 2013. – Vol. 15, Suppl 3. – S. 5.
190. Sibilias, V. Central ghrelin gastroprotection involves nitric oxide/prostaglandin cross-talk / V. Sibilias, F. Pagani, G. Rindi et al. // *British Journal of Pharmacology*. – 2008. – Vol. 154 (3). – P. 688–697.
191. Sibilias, V. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanism of action / V. Sibilias, G. Rindi, F. Pagani et al. // *Endocrinology*. – 2003. – Vol. 144. – P. 353–359.
192. Silverstein, F. New strategies for the prevention of serious upper GI complication from NSAIDs: lessons from the MUCOSA trial / F. Silverstein. // *New Stand. Arth. Care*. – 1996. – Vol. 5. – P. 2–6.
193. Sirri, V. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle / V. Sirri, P. Roussel, D. Hernandez-Verdun. // *Micron*. – 2000. – Vol. 31 (2). – P. 121–126.

194. Sivri, B. Trends in peptic ulcer pharmacotherapy / B. Sivri. // *Fundamental & clinical pharmacology*. – 2004. – Vol. 18, № 1. – P. 23–31.
195. Skulachev, V. P. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables / V. P. Skulachev. // *Trends Biochemistry Science*. – 2001. – Vol. 26. – P. 23–29.
196. Somasundaram, S. The biochemical basis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced damage to the gastrointestinal tract: a review and a hypothesis / S. Somasundaram, H. Hayllar, S. Rafi et al. // *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. – 1995. – Vol. 30. – P. 289–299.
197. Suetsuna, K. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein / K. Suetsuna, H. Ukeda, H. Ochi. // *Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2000. Vol. 11 – P. 12–131.
198. Suri, P. Epidemiology of osteoarthritis and associated comorbidities / P. Suri, D. C. Morgenroth, D. J. Hunter. // *Physical Medicine and Rehabilitation*. – 2012. – Vol. 4 (5 Suppl). – P. 10–19.
199. Suzuki K, Interrelationships among Atg proteins during autophagy in *Saccharomyces cerevisiae* / K. Suzuki, T. Noda, Y. Ohsumi. // *Yeast*. – 2004. – Vol. 21. – P. 1057–1065.
200. Suzuki, H. Ghrelin and oxidative stress in gastrointestinal tract / H. Suzuki, J. Matsuzaki, T. Hibi. // *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. – 2011. – Vol. 48 (2). – P. 122–125.
201. Szabó I. L. PPIs Prevent Aspirin-Induced Gastrointestinal Bleeding Better than H2RAs. A Systematic Review and Meta-analysis / I. L. Szabó, R. Mátics, P. Hegyi. // *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. – 2017. – Vol. 26 (4). – P. 395–402.
202. Szabó, I. Apoptosis in the gastric mucosa. Molecular mechanisms, basic and clinical implications / I. Szabó, A. S. Tarnawski. // *Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2000. – Vol. 51. – P. 3–15.
203. Taha, A. S. Upper gastrointestinal haemorrhage associated with low-dose aspirin and antithrombotic drugs - a 6-year analysis and comparison with non-steroidal

anti-inflammatory drugs / A. S. Taha, W. J. Angerson, R. P. Knill-Jones et al. // *Alimentary Pharmacology Therapeutics*. – 2005. – Vol. 22, № 4. – P. 285–289.

204. Takahashi, S. EP4 receptor mediation of prostaglandin E<sub>2</sub>-stimulated mucus secretion by rabbit gastric epithelial cells / S. Takahashi, K. Takeuchi, S. Okabe. // *Biochemical Pharmacology*. – 1999. – Vol. 58. – P. 1997–2002.

205. Takeuchi, K. Analysis of pathogenic elements involved in gastric lesions induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs in rats / K. Takeuchi, S. Kato, H. Nishiwaki et al. // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. – 1997. – Vol. 12 (5). – P. 360–367.

206. Takeuchi, K. Facilitation by endogenous prostaglandins of capsaicin-induced protection in rodent through EP2 and IP receptors / K. Takeuchi, S. Kato, M. Takeeda et al. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2003. – Vol. 304 (3). – P. 1055–1062.

207. Takeuchi, K. Gastric cytoprotection by prostaglandin E<sub>2</sub> and prostacyclin: relationship to EP1 and IP receptors / K. Takeuchi. // *Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2014. – Vol. 65 (1). – P. 3–14.

208. Takeuchi, K. Impaired duodenal bicarbonate secretion and mucosal integrity in mice lacking prostaglandin E receptor subtype EP3 / K. Takeuchi, H. Ukawa, S. Kato et al. // *Gastroenterology*. – 1999. – Vol. 117. – P. 1128–1135.

209. Takeuchi, K. Importance of gastric motility in the pathogenesis of indomethacin-induced gastric lesions in rats / K. Takeuchi, S. Ueki, S. Okabe. // *Digestive Diseases and Sciences*. – 1986. – Vol. 31. – P. 1114–1121.

210. Takeuchi, K. Involvement of cyclooxygenase-1, prostaglandin E<sub>2</sub> and EP1 receptors in acid-induced HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion in stomach. / K. Takeuchi, E. Aihara, Y. Sasaki et al. // *Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2006. – Vol. 57. – P. 661–676.

211. Takeuchi, K. Oxygen free radicals and lipid peroxidation in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rats / K. Takeuchi, K. Ueshima, Y. Hironaka. // *Digestion*. – 1991. – Vol. 49. – P. 175–184.

212. Takeuchi, K. Prostaglandin EP receptors and their roles in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract / K. Takeuchi. // *Advances in Clinical Chemistry*. – 2010. – Vol. 51. – P. 21–44.

213. Takeuchi, K. Prostaglandin EP Receptors Involved in Modulating Gastrointestinal Mucosal Integrity / K. Takeuchi, K. Shinichi, K. Amagase. // *Journal of Pharmacological Sciences*. – 2010. – Vol. 114. – P. 248–261.

214. Takeuchi, K. Roles of Cyclooxygenase, Prostaglandin E2 and EP Receptors in Mucosal Protection and Ulcer Healing in the Gastrointestinal Tract / K. Takeuchi, K. Amagase. // *Current Pharmaceutical Design*. – 2018. – Vol. 24. – P. 2002–2011.

215. Takeuchi, K. Roles of prostaglandin E-receptor subtypes in gastric and duodenal bicarbonate secretion in rats / K. Takeuchi, H. Ukawa, S. Kato et al. // *Gastroenterology*. – 1997. – Vol. 113. – P. 1553–1559.

216. Tanaka, A. Inhibition of both COX-1 and COX-2 is required for development of gastric damage in response to nonsteroidal antiinflammatory drugs / A. Tanaka, H. Araki, Y. Komoike et al. // *Journal of Physiology Paris*. – 2001. – Vol. 95 (1-6). – P. 21–27.

217. Tanaka, A. Up-regulation of COX-2 by inhibition of COX-1 in the rat: a key to NSAID-induced gastric injury / A. Tanaka, H. Araki, S. Hase et al. // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. – 2002. – Vol. 16. – P. 90–101.

218. Tildesley, G. Ranitidine in the treatment of gastric and duodenal ulcers associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs / G. Tildesley, R. S. B. Ensanullah, J. R. Wood. // *British journal of rheumatology*. – 1993. – Vol. 32. – P. 474–478.

219. Tripathi, K. D. *Essentials of Medical Pharmacology* / K. D. Tripathi. – New Delhi ; London ; Philadelphia ; Panama : Jaypee brothers medical publishers, 2013. – 1200 p. – Text : direct.

220. Tsutsumi, S. Gastric irritant-induced apoptosis in guinea pig gastric mucosal cells in primary culture / S. Tsutsumi, W. Tomisato, T. Takano et al. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2002. – Vol. 1589. – P. 168–180.

221. Turrens, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species / J. F. Turrens. // *The Journal of Physiology*. – 2003. – Vol. 15, № 552 (2). – P. 335–344.
222. Turrens, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain / J. F. Turrens. // *Bioscience Reports*. – 1997. – Vol. 17 (1). – P. 3–8.
223. Uchida, K. A Lipid-derived Endogenous Inducer of COX-2: a Bridge Between Inflammation and Oxidative Stress / K. A. Uchida. // *Molecules & Cells*. – 2008. – Vol. 25 (3). – P. 347–351.
224. Vaananen, P. M. Role of oxygen-derived free radicals in indomethacin-induced gastric injury / P. M. Vaananen, J. B. Meddings, J. L. Wallace. // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 1991. – Vol. 261. – №. 3. – P. G470-G475.
225. Vallecillo-Hernández, J. Indomethacin Disrupts Autophagic Flux by Inducing Lysosomal Dysfunction in Gastric Cancer Cells and Increases Their Sensitivity to Cytotoxic Drugs / J. Vallecillo-Hernández, M. D. Barrachina, D. Ortiz-Masiá et al. // *Scientific reports*. – 2018. – Vol. 8 (1). – P. 1–10.
226. Van der Blik, A. M. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion / A. M. Van der Blik, Q. Shen, S. Kawajiri. // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2013. – № 5. – P. 11–28.
227. Wallace, J. L. Proton pump inhibitors exacerbate NSAID-induced small intestinal injury by inducing dysbiosis / J. L. Wallace, S. Syer, E. Denou et al. // *Gastroenterology*. – 2011. – Vol. 141 (4). – P. 1314–1322.
228. Wallace, J. L. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense / J. L. Wallace, D. N. Granger. // *The FASEB Journal*. – 1996. – Vol. 10. – P. 731–740.
229. Wallace, J. L. Nitric oxide in mucosal defense. A little goes a long-way / J. L. Wallace, M. J. S. Miller. // *Gastroenterology*. – 2000. – Vol. 119. – P. 512–520.
230. Wang, Y. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling / Y. Wang, R. Branicky, A. Noë. // *The Journal of Cell Biology*. – 2018. – Vol. 217 (6). – P. 1915–1928.
231. Whittle, B. J. Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition, as measured by prostacyclin biosynthesis, and the gastrointestinal damage induced by

indomethacin in the rats / B. J. Whittle. // *Gastroenterology*. – 1981. – Vol. 80. №1. – P. 94–98.

232. Wolfe, M. M. The physiology of gastric acid secretion / M. M. Wolfe, A. H. Soll. // *The New England Journal of Medicine*. – 1988. – Vol. 319. – P. 1707–1715.

233. Wu, H.-C. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*) / H.-C. Wu, H.-M. Chen, C.-Y. Shiau. // *Food Research International*. – 2003. – Vol. 36. № 9–10. – P. 949–957.

234. Yang, W. A Measurable increase in oxidative damage due to reduction in superoxide detoxification fails to shorten the life span of long-lived mitochondrial mutants of *Caenorhabditis elegans* / W. Yang, J. Li, S. Hekimi. // *Genetics*. – 2007. – Vol. 177. – P. 2063–2074.

235. Yeomans, N. D. A comparison of omeprazole with ranitidine for ulcers associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. Acid Suppression Trial: Ranitidine versus Omeprazole for NSAID-associated Ulcer Treatment (ASTRONAUT) Study Group / N. D. Yeomans, Z. Tulassay, L. Juhász et al. // *The New England Journal of Medicine*. – 1998. – Vol. 12. – P. 719–726.

236. Yeomans, N.D. Is ranitidine therapy sufficient for healing peptic ulcers associated with non-steroidal anti-inflammatory drug use? N. D. Yeomans, L. E. Svedberg, J. Naesda. // *Int J Clin Pract*. – 2006. –Vol. 60(11). – P. 1401–1407.

237. Yokotani, K. Inhibition of vagally mediated gastric acid secretion by activation of central prostanoid EP3 receptors in urethane- anesthetized rats / K. Yokotani, Y. Okuma, Y. Osumi. // *British Journal of Pharmacology*. – 1996. – Vol. 117. – P. 653–656.

238. Zhu, X. T. Selective COX-2 inhibitor versus non-selective COX-2 inhibitor for the prevention of heterotopic ossification after total hip arthroplasty: A meta-analysis / X. T. Zhu, L. Chen, J. H. Lin. // *Medicine*. – 2018. – Vol. 97(31). – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6081155/> (дата обращения: 10.05.2019).



239. Zoltán Zádori, M. D. Analysis of the mechanisms involved in the regulation of gastric mucosal integrity and gastrointestinal motility / M. D. Zoltán Zádori. – Budapest, 2009. – 20 p.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

НПВП – нестероидный противовоспалительный препарат

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

СОЖ – слизистая оболочка желудка

ЦОГ – циклооксигеназа

PG – простагландин

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

ИПП- ингибитор протонной помпы

ТБРП – тиобарбитуратреактивные продукты;

ОПА – общая прооксидантная активность;

ГПО – глутатионпероксидаза;

СОД – супероксиддисмутаза;

КАТ – каталаза;