

УДК 577.112.3:591.1:57.021: 57.023

ВЛИЯНИЕ КУРСОВОГО ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ МАЛЫХ ДОЗ ДАЛАРГИНА НА ДИНАМИКУ УРОВНЯ МОЛЕКУЛ СРЕДНЕЙ МАССЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ СТРЕССОРНОМУ УЛЬЦЕРОГЕНЕЗУ

Никольская В. А.^{1,2}, Черетаев И. В.¹, Минина Е. Н.¹

¹*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия*

²*Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Симферополь, Россия
E-mail: ladyvictoria_nikol@mail.ru*

В работе изучали влияние курсового интраназального введения малых доз даларгина на динамику содержания молекул средней массы в сыворотке крови лабораторных крыс при стрессорном ulcerogenezе. Эксперименты выполнены на 32 беспородных крысах-самцах массой 180–220 г. Было показано, что превентивное курсовое 28-дневное интраназальное введение даларгина (0,2 мг/кг) в условиях воздействия стрессорного ulcerogenezа приводило к возвращению к уровню нормы индекса распределения (ИР_{280/254}) молекул средней массы, регистрируемых при λ 254 и 280 нм, оказывая стресс-протекторное действие. ИР_{280/254} является показателем, отражающим протекание регуляторных процессов в организме с вовлечением стресс-лимитирующих систем ($\lambda = 280$ нм) и патологических, стресс-реализующего характера ($\lambda = 254$ нм).

Ключевые слова: молекулы средней массы, стрессорный ulcerogenez, даларгин, малые дозы, интраназальное введение, лабораторные крысы, сыворотка крови.

ВВЕДЕНИЕ

Интраназальное применение биологически активных веществ является перспективной областью медико-биологических исследований, так как этот способ введения обеспечивает наиболее быструю доставку лекарственных средств [1]. Основными преимуществами интраназального пути введения лекарственных веществ является наличие центрального действия лекарственных веществ (ЛВ) за счет того, что оболочки обонятельных нервов лишены гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), ЛВ из носовой полости могут сразу же поступать в головной мозг; высокая биодоступность (отсутствие эффекта первого прохождения через печень и связанных с этим неблагоприятных реакций); удобство и легкость применения; быстрота развития системного эффекта (5–10 мин после применения) [1; 2].

Особое место среди препаратов, для которых этот способ доставки наиболее предпочтителен, занимают нейропептиды энкефалины, эндорфины и их аналоги, участвующие в регуляции функций нервной системы и оказывающие антистрессорное и протекторное действие, поскольку многие из них не способны

проникать через ГЭБ [1; 2]. К одним из таких нейропептидов, который является аналогом мет-энкефалина, относится даларгин. Традиционно даларгин считается препаратом периферического действия, реализующим свои эффекты через активацию периферических μ - и δ -опиоидных рецепторов, поскольку его проникновение через ГЭБ затруднено [3]. Вместе с тем даларгин всё же способен преодолевать ГЭБ при введении его в дозах от 500 до 1000 мкг/кг и выше [4], а значит активировать и центральные опиатные рецепторы. Известно [3–5], что в различных дозах при пероральном введении обладает выраженным гастропротекторным, антиоксидантным, стресс-протекторным и противоболевым действием. Существуют убедительные доказательства выраженной биологической эффективности интраназально вводимого даларгина в малых дозах (10^{-9} – 10^{-11} М) в предотвращении различных последствий физиологического стресса в организме. В частности, показано, что в малых дозах даларгин при курсовом введении обладает противоболевым и антидепрессантным действием [5–7], однако физиологические и биохимические механизмы этих эффектов пока не выяснены. Не исключено, что в их раскрытие значительный вклад может внести изучение динамики специфических маркеров, сопровождающих развитие патологических и стрессорных реакций в организме.

На сегодняшний день интегральным маркером физиологического и биохимического статуса организма при различных патологиях является определение молекул средней массы (МСМ) [8]. Возможности этого метода для идентификации интоксикационных процессов в различном биологическом материале весьма органично вписались и реализуются в скрининговой диагностике общего состояния организма, а также стали неотъемлемой частью идентификации значительного уровня отклонений при различных патологиях [8; 9]. Следует отметить, что, как правило, полиэтиологичность в определении МСМ проявляется в неспецифическом возрастании данного пула соединений в организме. Это было отмечено как при различного рода патологических состояниях, так и при окислительном стрессе [8–12]. Например, увеличение МСМ наблюдалось в модели ulcerogenezа, вызванного индометацином [12]. Известно [13], что состояние стресса приводит к напряжению всех систем организма, что, вероятно, должно сказаться и на уровне МСМ. Общие сведения о МСМ сводятся к тому, что это гетерогенная полифункциональная группа, включающая в себя вещества различной химической структуры, отличающиеся природой происхождения [9]. Возможно, что именно эти свойства и характеристики способствуют реализации их участия, в том числе в качестве биорегуляторов [9; 12; 14], во всех рассмотренных в литературе процессах, сопровождающихся тем или иным родом отклонений в организме.

Цель работы – изучить влияние курсового интраназального введения малых доз даларгина на динамику содержания молекул средней массы в сыворотке крови лабораторных крыс при стрессорном ulcerogenezе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (Страсбург, Франция, 1986).

Эксперимент выполнен в течение 28 дней на 32 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 180–220 г., разделённых на 4 группы по 8 особей, которым вводили интраназально вещества в объеме 0,1 мл согласно табл. 1. Введение веществ на 28-й день эксперимента опытным группам № 2 и № 3 осуществляли за 30 минут до проведения стрессорного ульцерогенеза. Даларгин («Фармсинтез», Украина) растворяли в физиологическом растворе. Нами выбрана наиболее эффективная малая доза этого препарата при интраназальном введении на основании предыдущих исследований его биологической активности в тесте Порсолта [6].

Стресс-реакцию «стрессорный ульцерогенез» моделировали на экспериментальных животных в модели вынужденного плавания [15] в бассейне в течение 60 мин. Животные, которые не подвергались стрессорному ульцерогенезу согласно плану эксперимента (контрольная группа и опытная группа № 1, см. табл. 1), в это время оставались в своих клетках. За 24 ч до стрессорного воздействия животных всех групп не кормили, оставляя свободный доступ к воде. Бассейн представлял керамическую ёмкость размерами 80 x 80 x 130 см. Уровень воды в нём составлял 30 см, а температура воды – + 20°C. Забой экспериментальных животных осуществляли через 30 мин. после стрессорного ульцерогенеза (через 2 часа с момента введения веществ) путём декапитации на гильотине («НПК Открытая наука, Россия»). Кровь отбирали в вакуумные пробирки с разделительным гелем для сыворотки BD Vacutainer® (BD Vacutainer® SST™ II Advance).

Таблица 1

Характеристика групп крыс-самцов, используемых в эксперименте

Группа	Характеристика группы и вводимых ей веществ
Контроль	Интakтные крысы (n=8) после интраназального курсового 28-дневного введения 0,1 мл физиологического раствора (0,9 % NaCl)
Опытная № 1	Крысы (n=8), не подвергавшиеся стрессорному ульцерогенезу, после 28-дневного интраназального введения 0,1 мл даларгина в дозе 0,2 мкг/кг
Опытная № 2	Крысы (n=8), подвергнутые на 28-й день стрессорному ульцерогенезу, после интраназального курсового 28-дневного введения 0,1 мл физиологического раствора (0,9 % NaCl)
Опытная № 3	Крысы (n=8), подвергнутые на 28-й день стрессорному ульцерогенезу, после 28-дневного интраназального введения 0,1 мл даларгина в дозе 0,2 мкг/кг

Материалом для исследований служила сыворотка крови, полученная двукратным центрифугированием по 10 минут при 1300 g (центрифуга ПЭ 6926, Россия) при 25°C [16]. Изучение уровня МСМ в сыворотке крови с помощью метода Габриэлян [17] путем её депротеинизации 20-% трихлоруксусной кислотой («Компонент-Реактив», Россия), центрифугирования при 3000 g в течение 20 минут и дальнейшем проведении измерений экстинкций супернатанта в ультрафиолетовой области спектра при длинах волн (λ) 254 и 280 нм на спектрофотометре 5400-УФ («Экрос-аналитика», Россия). Также определяли индекс распределения МСМ при длинах волн регистрации 280 и 254 нм ($IP_{280/254}$), который вычисляли как отношение экстинкций МСМ при длинах волн регистрации 280 и 254 нм [18].

Статистическую обработку результатов эксперимента осуществляли с помощью параметрического t-критерия Стьюдента, так как экспериментальные данные подчинялись закону нормального распределения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 2 представлены нативные данные (в е. о. п.) уровня МСМ в сыворотке крови лабораторных крыс при воздействии препарата даларгин (0,2 мкг/кг), стрессорного ulcerogenezа и при сочетанном воздействии стрессорного ulcerogenezа и даларгина (0,2 мкг/кг), а также динамика этого показателя в процентах. Анализ полученных данных показал (табл. 2), что прием даларгина достоверно понижал уровень МСМ в сыворотке крови лабораторных животных на 54,38 % при λ 254 нм ($n = 8$; $p \leq 0,01$) и на 78,98 % ($n = 8$; $p \leq 0,01$) при λ 280 нм.

Таблица 2

Уровень молекул средней массы (в е. о. п. и %) в сыворотке крови лабораторных крыс после приема препарата даларгин (0,2 мкг/кг), стрессорного ulcerogenezа и при сочетанном воздействии стрессорного ulcerogenezа и даларгина (0,2 мкг/кг)

Сыворотка крови лабораторных крыс	Длина волны регистрации, нм	
	254	280
контроль (n=8)	0,331±0,013 100 %	0,452±0,017 100 %
после воздействия препарата даларгин (n=8)	0,151±0,03** 45,62 %	0,095±0,019** 21,02 %
под влиянием стрессорного ulcerogenezа (n=8)	0,245±0,049* 74,02 %	0,205±0,041** 45,35 %
при сочетанном воздействии стрессорного ulcerogenezа и даларгина (n=8)	0,064±0,049** 19,34 %	0,098±0,041** 21,68 %

Примечание: *, ** – достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой при $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно; е. о. п – единицы оптической плотности.

Стрессорный ульцерогенез приводил к достоверному снижению в сыворотке крови лабораторных животных содержания МСМ (табл. 2) на 26 % при λ регистрации 254 нм ($n = 8$; $p \leq 0,05$) и на 54,65 % при λ 280 нм ($n = 8$; $p \leq 0,01$).

Вероятно, наблюдаемые изменения МСМ могут связаны с тем, что некоторые из них могут образовывать агрегаты, вклад которых при всех длинах волн в эксперименте не регистрируется, т. к. они представляют собой крупные образования, молекулярная масса которых превышает 5000 Да. Известно [19–21], что при патологических состояниях, многие из которых так или иначе сопровождаются накоплением продуктов окислительной модификации белков и перекисного окисления липидов, может происходить агрегация пептидов при конъюгации с продуктами окисления, а значит и тех МСМ, которые имеют пептидную природу.

Из приведенных данных также следует, что даларгин в большей степени снижал МСМ, содержащие нуклеиновые кислоты, аминокислоту тирозин и её производные (λ 280 нм), чем пул МСМ, в который входят промежуточные продукты интенсивного протеолиза белков и пептидов, эндотоксины, продукты нормального и патологического метаболизма, пептиды, содержащие аминокислоту фенилаланин и её производные (λ 254 нм).

Сходная направленность динамики МСМ, но значительно более выраженная, наблюдалась и в условиях стрессорного ульцерогенеза (табл. 2). Возможно, что наблюдаемые менее выраженные изменения МСМ в сторону снижения при воздействии стрессорного ульцерогенеза (λ 254 нм), чем при других длинах волн, связаны с тем, что практически при любом неблагоприятном и стрессорном воздействии на организм активируются процессы свободнорадикального окисления, а это приводит к накоплению токсических веществ, относящихся к эндотоксинам [21; 22]. К ним принадлежит большая группа химических веществ, включающая недоокисленные продукты обмена, кинины, катехоламины, альдегиды, кетоны, биогенные амины и другие. Молекулярная масса эндогенных патогенов колеблется в широких пределах [14; 23; 24]. Однако следует учитывать и тот факт, что и инсулин, также относящийся к пулу МСМ, снижается в условиях транзиторного функционального диабета, развивающегося при стрессе, что является важным моментом в реализации липидомобилизующей функции и усилении глюконеогенеза глюкокортикоидами [25–27].

Из литературных данных известно, что даларгин не влияет на базовый уровень МСМ, но предотвращает их рост при стрессе, а также предотвращает активацию процессов перекисного окисления липидов при стрессе [12]. Полученные результаты могут служить отражением реализации в организме принципа обратной связи. Являясь аналогом мет-энкефалина, даларгин запускает процессы снижения синтеза и секреции эндогенных опиоидных пептидов (энкефалинов), что предотвращает их избыточное накопление в организме. Известно, что опиоидные пептиды в норме продуцируются нейронами опиоидергической системы гипоталамуса и секреторных клеток гипофиза [28]. Опиоидергическая система относится к основным центральным стресс-лимитирующим системам организма, поэтому снижение уровня МСМ может свидетельствовать о перестройке

функциональной активности данной системы в условиях стрессорного ulcerогенеза. При этом сам даларгин (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) в сыворотке крови может быть отнесён к пулу МСМ (молекулярная масса – 733,92 Да), с одним из пиков поглощения в ультрафиолетовой области спектра при λ 257 нм, близкому к регистрируемой нами λ 254 нм, так как он содержит аминокислоту фенилаланин.

При сочетанном воздействии стрессорного ulcerогенеза и даларгина (0,2 мкг/кг) по сравнению с контролем наблюдалось достоверное уменьшение уровня МСМ в сыворотке крови лабораторных животных при всех длинах волн регистрации (табл. 2) на величину приблизительно равную 80 % (при λ 254 нм снижение показателя составило 80,66 %, $n = 8$, $p \leq 0,01$; а при λ 280 нм – 78,32 %, $n = 8$, $p \leq 0,01$). Это свидетельствует о проявлении нивелирующего эффекта воздействия двух факторов по отношению к разнице показателей при разных длинах волн регистрации, которое выражается в неспецифическом снижении МСМ. Оно указывает на общее замедление скорости протекания как патологических, так и регулируемых физиологических процессов.

Для получения более полной картины изменений и для того, чтобы более детально проследить динамику различных по биологическому эффекту соединений МСМ, вычисляли ИР_{280/254} (табл. 3). Данный индекс в целом позволяет оценить направленность наблюдаемых изменений физиолого-биохимических регуляторных процессов в сторону патологии либо нормы и их соотношение между собой.

Таблица 3

Индекс распределения молекул средней массы при длинах волн 280 и 254 нм (ИР_{280/254}) в сыворотке крови лабораторных крыс после препарата даларгин (0,2 мкг/кг), стрессорного ulcerогенеза и при сочетанном воздействии стрессорного ulcerогенеза и даларгина (0,2 мкг/кг)

Сыворотка крови лабораторных крыс	ИР _{280/254}
контроль (n=8)	1,366 ± 0,015 у. е. 100 %
после воздействия даларгина (n=8)	0,629 ± 0,025 у. е. ** 46,04 %
под влиянием стрессорного ulcerогенеза (n=8)	0,837 ± 0,045 у. е. ** 61,27 %
при сочетанном воздействии стрессорного ulcerогенеза и даларгина (n=8)	1,531 ± 0,045 у. е. ** 112,07 %

Примечание: ** – достоверность различий ИР_{280/254} по сравнению с контрольной группой при $p < 0,01$. За 100 % принят ИР_{280/254} в сыворотке крови контрольной группы крыс, у. е. – условные единицы.

ИР_{280/254} определяет интенсивность участия в протекающих в организме процессах фракций МСМ, регистрируемых при длинах волн 280 и 254 нм. При

λ 280 нм регистрируются фракции МСМ, содержащие нуклеиновые кислоты и ароматические аминокислоты, в основном производные триптофана, а при λ 254 нм – промежуточные продукты интенсивного протеолиза белков и пептидов, эндотоксины, продукты нормального и патологического метаболизма и производные фенилаланина [29]. Триптофановые производные при дальнейшей фрагментации и протеолизе пептидов могут служить источником этой аминокислоты в биосинтезе такого важного нейротрансмиттера как серотонин, а фениланиновые производные могут быть использованы в организме в качестве источника тирозина, являющегося предшественником в биосинтезе катехоламинов (дофамин, адреналин, норадреналин) и тиреоидных гормонов (тироксин, трийодтиронин) [30–32]. При этом серотонинергическая нейромедиаторная система является одной из ведущих стресс-лимитирующих систем организма, а катехоламины – основной компонент симпато-адреналовой стресс-реализующей системы [30].

Таким образом, биологический смысл $IP_{280/254}$, с одной стороны, заключается в том, что этот индекс в основном показывает соотношение между содержанием маркеров патологических, токсических и интенсивных метаболических реакций в организме (МСМ при 254 нм) и маркеров физиологических регуляторных процессов, принимающих участие в каскаде сложных реакций организма, возникающих в ответ на стресс (λ 280 нм); с другой стороны, этот индекс может показывать интенсивность участия в ответной реакции организма на стресс некоторых основных стресс-реализующих (λ 254 нм) и стресс-лимитирующих систем организма (λ 280 нм).

Анализ данных $IP_{280/254}$ показал (табл. 3), что по сравнению с контролем после воздействия препарата даларгин данный показатель достоверно снижался на 54 % ($n = 8$; $p \leq 0,01$), а под влиянием стрессорного ulcerogenesis – на 38,7 % ($n = 8$; $p \leq 0,01$). При сочетанном воздействии стрессорного ulcerogenesis и даларгина $IP_{280/254}$ практически возвращался к значениям контрольной группы и несколько превышал их (112 %, $n = 8$; $p \leq 0,01$, табл. 3). Поэтому можно сказать, что превентивное курсовое 28-дневное интраназальное введение даларгина в дозе 0,2 мг/кг в условиях воздействия стрессорного ulcerogenesis приводило к возвращению близкому к контрольной группе соотношений МСМ, отражающих протекание регуляторных ($\lambda = 280$ нм) и патологических процессов в организме ($\lambda = 254$ нм) и МСМ, показывающих активность стресс-реализующих ($\lambda = 254$ нм) и стресс-лимитирующих систем организма ($\lambda = 280$ нм).

По результатам данного исследования можно говорить о стресс-протекторном действии даларгина, который способствует сохранению естественного соотношения физиологически значимых фракций МСМ в организме в условиях стресса, что проявлялось в динамике $IP_{280/254}$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе изучено влияние курсового интраназального введения малой дозы даларгина (0,2 мг/кг) на динамику содержания молекул средней массы в сыворотке крови лабораторных крыс в норме и при стрессорном ulcerogenesis.

1. Показано, что после 28-дневного курсового интраназального введения даларгина (0,2 мг/кг) в сыворотке крови крыс ($n = 8$) происходит достоверное снижение уровня молекул средней массы (на 54,38 % при $\lambda = 254$ нм, $p \leq 0,01$; на 79 % при $\lambda = 280$ нм, $p \leq 0,01$) по сравнению с контрольной группой ($n = 8$).
2. Установлено, что в группе крыс ($n = 8$), подвергнутых стрессорному ulcerогенезу, после предварительного интраназального курсового 28-дневного введения 0,1 мл физиологического раствора (0,9 % NaCl) наблюдалось достоверное снижение уровня молекул средней массы (на 26 % при $\lambda = 254$ нм, $p \leq 0,05$; на 54,65 % при $\lambda = 280$ нм, $p \leq 0,01$) по сравнению с контрольной группой ($n = 8$).
3. Отмечено, что в группе крыс ($n = 8$), подвергнутых стрессорному ulcerогенезу, после предварительного курсового интраназального 28-дневного введения даларгина в дозе 0,2 мг/кг происходило неспецифическое достоверное снижение уровня молекул средней массы практически на одном уровне при всех длинах волн регистрации (на 80,66 % при $\lambda = 254$ нм, $p \leq 0,01$; на 78,32 % при $\lambda = 280$ нм, $p \leq 0,01$) по сравнению с контрольной группой ($n = 8$).
4. Показано, что в сыворотке крови лабораторных крыс после воздействия даларгина ИР_{280/254} достоверно снижался на 54 % ($n = 8$; $p \leq 0,01$) по сравнению с контролем, под влиянием стрессорного ulcerогенеза ($n = 8$; $p \leq 0,01$) – на 38,73 %. При сочетанном воздействии стрессорного ulcerогенеза и даларгина данный индекс практически возвращался к значениям контрольной группы и несколько превышал их, составляя 112 % ($n = 8$; $p \leq 0,01$). Обнаруженная динамика ИР_{280/254} позволяет говорить о стресс-протекторном действии даларгина, так как длительное превентивное интраназальное введение этого препарата способствует сохранению естественного соотношения физиологически значимых фракций молекул средней массы в организме в условиях стресса.

Работа выполнена на оборудовании КП ФГАОУ ВО КФУ им. В. И. Вернадского» «Экспериментальная физиология и биофизика».

Список литературы

1. Гуревич К. Г. Разработка систем интраназальной доставки лекарственных средств. / Гуревич К. Г. // Качественная клиническая практика. – 2002 – № 1. – С. 3–5.
2. Metder B. Kinetics of peptide uptake and tissue distribution following a single dose of peptide / B. Metder, S. Anderton, S. P. Manickasingham [et al.]. // Immunol. Invest. – 2000. – Vol. 29, No 1. – P. 61–70.
3. Титов М. И. Даларгин – пептидный препарат с цитопротективным действием / М. И. Титов, В. А. Виноградов, Ж. Д. Беспалова // Бюллетень ВКНЦ. – 1985. – № 2. – С. 72–76.
4. Полонский В. М. Место приложения (центральное или периферическое) противоязвенного действия синтетического аналога эндогенных опиоидов даларгина в экспериментальной модели цистеаминовых дуоденальных язв у крыс / В. М. Полонский, К. Н. Ярыгин, К. Н. Кривошеев // Бюл. экспер. биол. мед. – 1987. – № 4. – С. 433–434.
5. Коренюк И. И. Влияние даларгина в малых дозах на болевую чувствительность у крыс / И. И. Коренюк, Е. Н. Минина, Ю. В. Белоусова [и др.] // Учёные записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология, химия. – 2014. – Т. 27, № 4 (66). – С. 43–51.

6. Минина Е. Н. Влияние малых доз даларгина при интраназальном введении на поведение крыс в тесте Порсолта / Е. Н. Минина, И. В. Черетаев // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2016. – Т. 6, № 4. – С. 22–26.
7. Минина Е. Н. Влияние малых доз даларгина на болевую чувствительность крыс при однократном и интраназальном курсовом введении / Е. Н. Минина, И. В. Черетаев // Успехи современной науки. – 2016. – Т. 1, № 8. – С. 202–207.
8. Никольская В. А. Влияние экспериментальной гиперинсулинемии на уровень молекул средней массы в сыворотке крови лабораторных крыс / В. А. Никольская // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2012. – Т. 25, № 1 (64). – С. 172–176.
9. Никольская В. А. Биохимический аспект рассмотрения молекул средней массы в организме / В. А. Никольская, Ю. В. Данильченко, З. Н. Меметова // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2013. – Т. 26, № 1 (65). – С. 139–145.
10. Никольская В. А. Влияние окислительного стресса *in vitro* на уровень молекул средней массы в сыворотке крови и гемолизате эритроцитов *Sus scrofa* / В. А. Никольская // Экосистемы. – 2011. – № 4. – С. 123–126.
11. Никольская В. А. Влияние окислительного стресса *in vitro* на показатели сыворотки крови и эритроцитов представителей *Amphibia*, *Aves* и *Mammalia* / В. А. Никольская, И. В. Черетаев // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – № 6 (48), Ч. 5. – С. 19–24.
12. Мосина Л. М. Ульцерогенез и эндогенная интоксикация / Л. М. Мосина, О. И. Авдейкина // Экспериментальная клиническая гастроэнтерология. – 2008. – № 6. – С. 36–40.
13. Меерсон Ф. З. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам / Ф. З. Меерсон, М. Г. Пшенникова. – М.: Медицина, 1988. – 256 с.
14. Громашевская Л. Л. «Средние молекулы» как один из показателей «метаболической интоксикации» в организме / Л. Л. Громашевская // Лабораторная диагностика. – 1997. – № 1. – С. 11–16.
15. Porsolt R. D. Psychotropic screening procedures / R. D. Porsolt, R. A. McArthur, A. Lenegre // *Methods in Behavioral Pharmacology*. – 1993. – Vol. 10. – P. 23–51.
16. Lewis S. M. Dacie and Lewis Practical Haematology / S. M. Lewis, B. G. Bain, I. Bates. – Elsevier. – 2006. – 722 p.
17. Габриэлян Н. И. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях: метод. рекомендации / Н. И. Габриэлян, Э. Р. Левицкий, А. А. Дмитриев [и др.]. – М.: Медицина, 1985. – 34 с.
18. Габриэлян Н. И. Ориентировочный тест для диагностики гнойно-септических процессов / Н. И. Габриэлян, О. А. Савостьянова // Лабораторное дело. – 1987. – № 2. – С. 79–80.
19. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков / Дубинина Е. Е., Шугалей И. В. // Успехи современной биологии. – 1993. – № 1. – С. 71–79.
20. Зенков Н. К. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах / Н. К. Зенков, Е. Б. Меньшикова // Успехи современной биологии. – 1993. – № 3. – С. 286–296.
21. Дубинина Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты / Е. Е. Дубинина. – СПб.: Издательство «Медицинская пресса», 2006. – 400 с.
22. Глебов А. Н. Роль кислородсвязывающих свойств крови в развитии окислительного стресса, индуцированного липополисахаридом / А. Н. Глебов, Е. В. Шульга, В. В. Зинчук; под ред. Зинчука В. В. – Гродно: ГрГМУ, 2011. – 216 с.
23. Галактионов С. Г. Пептиды группы «средних молекул» / С. Г. Галактионов, В. М. Цейтин, В. И. Леонова [и др.] // Биоорганическая химия. – 1984. – Т. 10, № 1. – С. 5–17.
24. Владыко А. С. Средние молекулы и проблемы эндогенной интоксикации при критических состояниях / А. С. Владыко, Э. Р. Левицкий, Л. П. Поддубная [и др.] // Анестезиология и реаниматология. – 1987. – № 2. – С. 37–42.
25. Фелиг Ф. Эндокринология и метаболизм: в 2-х т. / Под ред. Ф. Фелига, Д. Б. Бакстера, Ф. У. Бродуса, Л. А. Фромена. – М.: Медицина, 1985. – 517 с.

26. Иванов В. В. Гипоинсулинемия и перекисное окисление липидов при эмоционально-болевым стрессе / В. В. Иванов, И. В. Луста, Т. Н. Сатрихина [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 1990. – Т. 6, № 2. – С. 77–80.
27. Иванов В. В. Окислительный стресс: влияние на секрецию инсулина, рецепцию гормона адипоцитами и липолиз в жировой ткани / В. В. Иванов, Е. В. Шахристова, Е. А. Степовая [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 32–39.
28. Губанова Е. И. Неспецифические механизмы развития болезней / Е. И. Губанова, Л. Н. Рогова, Н. Ю. Дзюбенко. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2011. – 76 с.
29. Аксенова В. М. Биохимические методы диагностики эндогенной интоксикации: метод. Рекоменд / В. М. Аксенова, В. Ф. Кузнецов, Ю. Н. Маслов [и др.] – Пермь: ПГМА, 2005. – 48 с.
30. Kvetnansky R. Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches / R. Kvetnansky, E. L. Sabban, M. Palkovits // *Physiol. Rev.* – 2009. – Vol. 89. – P. 535–606.
31. Марри Р. Биохимия человека: в 2 т. Т. 2 / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес [и др.]. – М.: Мир, 1993. – 415 с.
32. Северин Е. С. Биохимия: учебник. / Е. С. Северин, Т. Л. Алейникова, Л. В. Авдеева [и др.]; под ред. Е. С. Северина. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 784 с.

THE IMPACT COURSE INTRANASAL ADMINISTRATION LOW DOSES OF DALARGIN ON THE DYNAMICS OF THE LEVEL OF AVERAGE WEIGHT MOLECULES IN BLOOD SERUM LABORATORY RATS SUBJECTED TO STRESS ULCEROGENESIS

Nikolskaya V. A., Cheretaev I. V., Minina E. N.

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russian Federation
E-mail: ladyvictoria_nikol@mail.ru*

The work studied the impact course intranasal application low doses of dalargin on the dynamics of the content of average weight molecules in blood serum laboratory rats in normal and stress-induced ulcerogenesis.

The experiments were performed on 32 male rats weighing 180–220 g, which were divided into 4 groups. Rats in the control group (n=8) and in group II (n=8) was administrated within 28 days intranasally 0.1 ml of physiological solution (0.9-% NaCl). Animals of groups I (n=8) and III (n=8) received intranasally 0.1 ml of Dalargin (0.2mg/kg) within 28 days. On day 28 the animals of groups II (n=8) and III (n=8) were subjected to stress ulcerogenesis. Stress reaction "stress ulcerogenesis" was modeled on experimental animals in the model of forced swimming in the pool for 60 min. the Animals that were not exposed to stress ulcerogenesis in accordance with the plan of the experiment (control group and experimental group I) at this time remained in their cages. For 24 h before stress exposure in animals of all groups were not fed, leaving free access to water. Pool was represented by a ceramic tank with dimensions 80 x 80 x 130 cm water Level in it was 30 cm and the water temperature is + 20 ° C. The slaughter of experimental animals was carried out after 30 min. after stress-induced ulcerogenesis (2 hours since the introduction of the substances) by decapitation on the guillotine. Blood was collected in vacutainer tubes with a separator gel for serum BD Vacutainer®.

Material for the study was blood serum, obtained by centrifugation twice for 10

minutes at 1300 g at 25°C. Examine the levels of average weight molecules (AWM) in the blood serum using the method Gabrielian by deproteinization of 20 % trichloroacetic acid, centrifugation at 3000 g for 20 minutes and further measurements of extinction of the supernatant in the ultraviolet region of the spectrum at wavelengths (λ) of 254 and 280 nm on a spectrophotometer 5400-UV ("Ekros-Analitika", Russia). Also determined the index of distribution of AWM at the wavelengths registration of 254 and 280 nm ($ID_{280/254}$), which was calculated as the ratio of AWM extinction at the wavelengths of 254 and registration 280 nm.

Statistical processing of experimental results was performed using parametric student's t-test as the experimental data obeyed the normal distribution. Graphical visualization of data performed in the software package GraphPad Prism 6. The adopted level of significance of intergroup differences was 5 %.

It is shown that after a 28-day course intranasal administration of dalargin (0.2 mkg/kg) in blood serum of rats ($n = 8$) there was a significant decrease in the level of AWM (54,38 % at $\lambda = 254$ nm, $p \leq 0.01$; 79 % at $\lambda = 280$ nm, $p \leq 0.01$) compared with the control group ($n = 8$).

Established that in the group of rats ($n = 8$), subjected to stress ulcerogenesis after intranasal pre-course 28-day administration of 0.1 ml saline (0.9 % NaCl) showed a significant reduction in the AWM (26 % at $\lambda = 254$ nm, $p \leq 0.05$; 54,65 % at $\lambda = 280$ nm, $p \leq 0.01$) compared with the control group ($n = 8$).

It is noted that in the group of rats ($n = 8$), subjected to stress ulcerogenesis, after a preliminary course of intranasal 28-day administration of dalargin in a dose of 0.2 mkg/kg was non-specific decrease a level of AWM almost at the same level at all wavelengths registration (80,66 % at $\lambda = 254$ nm, $p \leq 0.01$; 78,32 % at $\lambda = 280$ nm, $p \leq 0.01$) compared with the control group ($n = 8$).

It is shown that in the blood serum of laboratory rats after exposure to $ID_{280/254}$ dalargin was significantly reduced by 54 % ($n = 8$; $p \leq 0.01$) compared to control, under the influence of stress ulcerogenesis ($n = 8$; $p \leq 0.01$) – 38,73 %. With the combined effects of stress ulcerogenesis and dalargin the index almost back to the values of the control group and slightly higher, amounting to 112 % ($n = 8$; $p \leq 0.01$). These results showed that a preventive course of 28-day intranasal introduction of dalargin (0.2 mkg/kg) in conditions of exposure to stress ulcerogenesis led to a return to normal ratios of the AWM, reflecting the regulatory flow ($\lambda = 280$ nm) and pathological processes in the organism ($\lambda = 254$ nm) and AWM, showing the activity of stress-realizing ($\lambda = 254$ nm) and stress-limiting systems of the organism ($\lambda = 280$ nm), providing a stress-protective effect.

Keywords: average weight molecules, stress ulcerogenesis, dalargin, low doses, intranasal administration, laboratory rats, blood serum.

References

1. Gurevich K. G., Development of systems for intranasal drug delivery, *Kachestvennaya klinicheskaya praktika*, **1**, 3. (2002).
2. Metder B., Anderton S., Manickasingham S. P., Wraith C. Kinetics of peptide uptake and tissue distribution following a single dose of peptide, *Immunol. Invest.*, **29**, **1**, 61. (2000).
3. Titov M. I., Vinogradov V. A., Bepalova J. D., Dalargin and peptide drug with cytoprotective action, *Byulleten' VKNC*, **2**, 76 (1985).
4. Polonskij V. M., Yarygin K. N., Krivosheev K. N., Place of application (central or peripheral) antiulcer action of a synthetic analogue of endogenous opioids dalargin in experimental models cysteamine duodenal ulcers in rats, *Byul. ehksper. biol. med.*, **4**, 433 (1987).
5. Korenyuk I. I., Minina E. N., Belousova YU. V., Cheretaev I. V., The effect of dalargin in small doses on pain sensitivity in rats, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry*, **27**, **4** (66), 43 (2014).
6. Minina E. N., Cheretaev I. V., Influence of small doses of dalargin, when administered intranasally on the behavior of rats in the test of Porsolt, *Krymskij zhurnal ehksperimental'noj i klinicheskoy mediciny*, **6**, **4**, 22 (2016).
7. Minina E. N., Cheretaev I. V., Influence of small doses of dalargin on pain sensitivity in rats under single and intranasal course administration, *Uspekhi sovremennoj nauki*, **1**, **8**, 202 (2016).
8. Nikol'skaya V. A., Effect of experimental hyperinsulinemia on the level of average weight molecules in blood serum of laboratory rats, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry*, **25**, **1** (64), 172 (2012).
9. Nikol'skaya V. A., Danil'chenko YU. V., Memetova Z. N. Biochemical aspect of consideration of the average weight molecules in the body, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry*, **26**, **1** (65), 139 (2013).
10. Nikol'skaya V. A., The influence of oxidative stress in vitro on the level of average weight molecules in blood serum and hemolysate of erythrocytes *Sus scrofa*, *Ekosistemy*, **4**, 123 (2011).
11. Nikol'skaya V. A., Cheretaev I. V., The effect of oxidative stress on the in vitro parameters of blood serum and erythrocytes of representatives of the Amphibia, Aves and Mammalia, *Mezhdunarodnyj nauchno-issledovatel'skij zhurnal*, **6** (48), 19 (2016).
12. Mosina L. M., Avdejkina O. I., The ulcerogenesis and endogenous intoxication, *Ekspirimentalnaya klinicheskaya gastroenterologiya*, **6**, 36 (2008).
13. Meerson F. Z., Pshennikova M. G., *Adaptation to stress situations and physical loads*, 256 p. (Medicine, Moscow, 1988).
14. Gromashevskaya L. L., "Middle molecules" as one of the indicators of "metabolic intoxication" in the body, *Laboratornaya diagnostika*, **1**, 11. (1997).
15. Porsolt R. D., McArthur R. A., Lenegre A. Psychotropic screening procedures, *Methods in Behavioral Pharmacology*, **10**, 23 (1993).
16. Lewis S. M., Bain B. G., Bates I., *Dacie and Lewis Practical Haematology*, 722 p. (Elsevier, 2006).
17. Gabriehlyan N. I., Levickij E. R., Dmitriev A. A. i dr., *Screening method for determination of middle molecules in biological fluids: guidelines*, 34 p. (Medicina, Moscow, 1985).
18. Gabriehlyan N. I., Savost'yanova O. A. Tentative test for the diagnosis of purulent-septic processes, *Laboratornoe delo*, **2**, 79. (1987).
19. Dubinina E. E., Shugalej I. V. Oxidative modification of proteins, *Uspekhi sovremennoj biologii*, **1**, 71 (1993).
20. Zenkov N. K., Men'shikova E. B., Activated oxygen metabolites in biological systems, *Uspekhi sovremennoj biologii*, **3**, 286 (1993).
21. Dubinina E. E., *Products of oxygen metabolism in the functional activity of cells (life and death, creation and destruction). Physiological and clinical-biochemical aspects*, 400 p. (Saint Petersburg: publishing house of the "Medical press", 2006).
22. Glebov A. N., SHul'ga E. V., Zinchuk V. V., *The role oxygen-containing properties of blood in the development of oxidative stress induced by lipopolysaccharide*, 216 p. (Hrodna, GMU, 2011).
23. Galaktionov S. G., Cejtin V. M., Leonova V. I., Nikolajchik V. V., Mihneva V. M., The peptides of the group of "middle molecules", *Bioorganicheskaya himiya*, **10**, **1**, 5 (1984).

24. Vladyko A. S., Levickij E. R., Poddubnaya L. P., Gabrielyan N. I. Middle molecules and the problem of endogenous intoxication in critical conditions, *Anesteziologiya i reanimatologiya*, **2**, 37 (1987).
25. Felig F., Baxter J. B., Broadus W. F., Fromen L. A. *Endocrinology and metabolism: in 2 vol.*, 517 p. (Medicina, Moscow, 1985).
26. Ivanov V. V., Lusta I. V., Satrihina T. N., Udincev N. A., Hypoinsulinemia and lipid peroxidation under emotional-pain stress, *Problemy ehndokrinologii*, **6**, **2**, 77. (1990).
27. Ivanov V. V., Shahristova E. V., Stepovaya E. A., Nosareva O. L., Fyodorova T. S., Ryazanceva N. V., Novickij V. V., Oxidative stress: influence on insulin secretion, hormone reception by adipocytes and lipolysis in adipose tissue, *Byulleten' sibirskoj mediciny*, **13**, **3**, 32 (2014).
28. Gubanova E. I., Rogova L. N., Dzyubenko N. Y. Nonspecific mechanisms of disease development, 76 p. (Volgograd: Izd-vo VolgMU, 2011).
29. Aksenova V. M., Kuznecov V. F., Maslov Y. N., Shchekotov V. V., Shchekotova A. P. *Biochemical diagnostics of endogenous intoxication: guidelines*, 48 p. (Perm, PGMA, 2005).
30. Kvetnansky R., Sabban E. L., Palkovits M. Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches, *Physiol. Rev.*, **89**, 535. (2009).
31. Marri R., Grenner D., Mejes P., Roduehl V. *Human biochemistry: in 2 vol.*, **2**, 415 p. (Moscow, Mir, 1993).
32. Severin E. S., Alejnikova T. L., Avdeeva L. V., Andrianova L. E., Belushkina N. N., Volkova N. P., Golenchenko V. A., Vorob'yova S. A., Gubareva A. E., Korlyakova O. V., Lihachyova N. V., Pavlova N. A., Rubcova G. V., Silaeva S. A., Siluyanova S. N., Titova T. A. *Biochemistry: a textbook*. 784 p. (Moscow, GEOTAR-MED, 2004).