

# UTICAJ MORFINA NA RAZVOJ ULKUSNIH LEZIJA KOD PACOVA IZLOŽENIH INDOMETACINSKOM STRESU

## AUTORI

Julijana Rašić<sup>1</sup>, Snežana Janičijević Hudomal<sup>1</sup>, Zorica Stanojević-Ristić<sup>1</sup>, Bojana Kisić<sup>2</sup>, Snežana Stević<sup>1</sup>, Leonida Vitković<sup>3</sup>, Milica Mijović<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Univerzitet u Prištini, Medicinski fakultet, Institut za farmakologiju sa toksikologijom, Kosovska Mitrovica, Srbija

<sup>2</sup> Univerzitet u Prištini, Medicinski fakultet, Institut za biohemiju, Kosovska Mitrovica, Srbija

<sup>3</sup> Univerzitet u Prištini, Medicinski fakultet, Institut za histologiju i embriologiju, Kosovska Mitrovica, Srbija

<sup>4</sup> Univerzitet u Prištini, Medicinski fakultet, Institut za patologiju, Kosovska Mitrovica, Srbija

## SAŽETAK

Oksidativni stres ima značajnu ulogu u razvoju stres ulkusnih lezija pacova izloženih indometacinskom stresu. Endogeni opiodi se oslobađaju tokom stresa i mogu ublažiti pojavu ulkusnih lezija u želucu. Cilj ovog istraživanja bio je da se ispita uticaj morfina na razvoj ulkusnih lezija, patohistološke promene i antioksidativni status u želucu pacova izloženih indometacinskom stresu. Eksperiment je izveden na mužjacima Wistar pacova, TM 200-230 g. Indometacinski stres je izazivan intragastričnom primenom indometacina u dozi od 20 mg/kg TM, 6 sati pre žrtvovanja. Morfin je aplikovan intraperitonealno, u dozi 10 mg/kg TM, 15 minuta pre izlaganja indometacinskom stresu. Veličina lezija u vidu petehija i erozija, izražena je kao ukupna površina promena (mm<sup>2</sup>) tj. ulkusni indeks (UI). Patohistološki preparati analizirani su svetlosnim mikroskopom tipa Leica DML S2, a specifične promene fotodokumentovane digitalnim aparatom tipa Canon Power Shot S70. U homogenatu želuca mereni su aktivnost katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GSHPx), glutation reduktaze (GR) i ksantin oksidaze (XOD), ali i sadržaj redukovanog glutationa (GSH) i intenzitet lipidne peroksidacije (Lpx). Morfin je značajno smanjio ulkusni indeks (UI) kod životinja izloženih indometacinskom stresu, a patohistološki je utvrđeno prisustvo velike količine mukusa u mukozi želuca. Primena morfina u pretretmanu indometacinskog stresa je statistički značajno smanjila aktivnost svih enzima u želucu u odnosu na kontrolnu grupu, i to aktivnost katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GSHPx) i glutation reduktaze (GR), ksantin oksidaze (XOD), kao i intenzitet lipidne peroksidacije (Lpx), dok je sadržaj redukovanog glutationa ostao nepromenjen. Gastroprotektivno dejstvo morfina kod životinja izloženih indometacinskom stresu je najverovatnije posledica jačanja citoprotektivnih mehanizama, a ne antioksidantnog delovanja.

Gljučne reči: morfin, indometacin, stres ulkus, oksidativni stres, antioksidativni status

## UVOD

Stres mogu izazvati brojni i raznovrsni činioci. On može biti posledica dejstva bioloških činioca (opekotine, povrede, operacije, glad, velika temperaturna kolebanja, nasilna imobilizacija, teška metabolička oboljenja), ali i psihofizičkih (strah, bol, tuga, narušavanje funkcija organizma) [1].

Stres ulkus predstavlja akutnu leziju (petehije, erozije ili ulceracije) mukoze želuca ili akutni hemoragični gastritis, nastao kao posledica delovanja različitih stresora [1, 2]. Kliničko iskustvo pokazalo je da su najčešći uzroci stres ulkusa: politrauma, obimni hirurški zahvati, kraniocerebralne povrede, opekotine, povrede kičmene moždine, sepsa, hemoragični šok, insuficijencija jetre, bubrega ili srca, akutni pankreatitis, ileus, akutni infarkt miokarda, hipotenzija, psihološki stresovi, nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL), kao i visoke doze glikokortikoida [3, 4, 5].

Oksidativni stres igra vrlo važnu ulogu u patogenezi preko 100 oboljenja [6]. On podrazumeva oštećenje tkiva nastalo zbog prevelike proizvodnje slobodnih kiseoničnih radikala, ili njihovog poremećenog uklanjanja. Eksperimentalna istraživanja su potvrdila značaj slobodnih kiseoničnih radikala (ROS) i lipidne peroksidacije u patogenezi akutnih gastričnih lezija nastalih dejstvom etanola, nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL) i *Helicobacter pylori* infekcije [7, 8, 9].

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL) se vrlo često koriste i propisuju u celom svetu, naročito kod osoba starijih od 65 godina [10, 11]. Indometacin pripada grupi nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL), čiji je osnovni mehanizam delovanja inhibicija enzima ciklooksigenaze (COX) odgovornog za sintezu prostaglandina. On je neselektivni inhibitor ciklooksigenaze (COX), tj. podjednako deluje i na konstitutivnu ili ciklooksigenazu 1 (COX-1) i na inducibilnu ili ciklooksigenazu 2 (COX-2), pa često dovodi do oštećenja želuca [12]. Znamo da su prostaglandini E klase (PgE) značajni za normalno funkcionisanje mukozne želudačne barijere, i

da je upravo zato oštećenje sluznice želuca, u smislu gastrointestinalnih krvarenja i erozija najčešće neželjeno dejstvo NSAID [13].

Poznato je da pacijenti sa endoskopski dijagnostikovanim gastrointestinalnim krvarenjem ili stres ulkusima, veoma često pored antiulkusnih lekova dobijaju i lekove protiv bolova (analgetike). Ne postoje relevantni podaci kako ovi lekovi utiču na razvoj erozija, da li ih produbljuju ili zaceljuju, odnosno da li utiču na sporiji ili brži oporavak bolesnika [14].

Opioidni sistem je jedan od najznačajnijih sistema koji učestvuje u ograničavanju stresne reakcije i sprečavanju nastanka njenih štetnih posledica na svim nivoima regulacije od centralnih do perifernih. Organizam u stresu pojačano sintetizuje endogene opioide: endorfine, posebno  $\beta$ -endorfine, zatim enkefaline (metionin- i leucin-enkefalin) i dinorfine odgovorne za stres indukovanu analgeziju, koja se naziva još i psihogenom analgezijom. Ovaj efekat je potvrđen i na eksperimentalnim životinjama i na ljudima koji imaju jake bolove, koje je na drugi način nemoguće suzbiti. Enkefalini, endorfini i dinorfini imaju slične efekte sa morfinom, pa se stoga, nazivaju endogeni opiodi ili endogeni opijati [15].

Morfin je prirodni alkaloid dobijen zasecanjem nezrelih čahura maka (*Papaver somniferum*), i osnovni predstavnik grupe opioidnih analgetika. Morfin je snažan agonista na  $\mu$ -opioidnim receptorima, a slabi agonista na  $\kappa$ - i  $\delta$ -opioidnim receptorima. Svoje dejstvo ispoljava kako u CNS-u, tako i na perifernim organima. Neka ranija eksperimentalna istraživanja potvrdila su gastroprotektivno delovanje morfina kod pacova izloženih imobilizacionom stresu ubrzanom hladnoćom (CRS) [16]. O uticaju morfina na razvoj oksidativnog stresa postoje vrlo kontradiktorni podaci, većina autora tvrdi da on izaziva oksidativni stres, ali ima i onih koji tvrde suprotno, tj. da deluje antioksidantno [16, 17, 18].

## CILJ RADA

Imajući u vidu sve napred navedeno, cilj našeg istraživanja bio je da se ispita uticaj morfina na razvoj stres ulkusnih lezija, patohistološke promene i antioksidativni status u želucu eksperimentalnih životinja izloženih indometacinskom stresu. U te svrhe merili smo aktivnost katalaze (CAT, E.C. 1.11.1.6), glutacion peroksidaze (GSHPx, E.C. 1.11.1.9), glutacion reduktaze (GR, E.C. 1.6.4.2), ksantin oksidaze (XOD, E.C. 1.2.3.2), sadržaj redukovane glutationa (GSH) i intenzitet lipidne peroksidacije (Lpx).

## MATERIJAL I METODE

### Lekovi

U ogledu su korišćeni indometacin (Indometacin, kapsule 25 mg, Belupo) i morfin hidrohlorid (Stellorphanad 10®, ampule 10 mg/1mL, Stella, Lohmann & Rauscher Group). Srednje pojedinačne doze ispitivanih lekova određivane su na osnovu srednje pojedinačne doze za čoveka na kg telesne mase (TM) životinje i Clarkove formule.

### Eksperimentalne životinje

Ispitivanje je sprovedeno na polno zrelih mužjacima laboratorijskih pacova tipa Wistar, prosečne telesne

mase od 200-230 grama i starosti do 11 nedelja. Pacovi su odgajani namenski u vivarijumu Centra za biomedicinska istraživanja Galenika a.d. Životinje su do početka oglada boravile u standardnim kavezima od pleksiglasa na stalnoj sobnoj temperaturi od  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , sa cirkadijalnim ritmom (12h dan/12h noć) i hranjene standardnom hranom za laboratorijske pacove, proizvedenom u Veterinarskom institutu u Zemunu. Broj pacova u kavezu kretao se od 4-6. Sve životinje su tretirane prema principima međunarodne deklaracije o životinjama (Guide for care and Use of Laboratory Animals, NIH publication № 85-23). Pre sprovedenog istraživanja pribavljena je saglasnost Etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta Priština, sa sedištem u Kosovskoj Mitrovici.

### Eksperimentalna studija

Sve životinje su pre oglada izložene 24-satnom gladovanju, tako što su pojedinačno smeštane u metaboličke kaveze od pleksiglasa za mrežastim podom, da bi se sprečila koprofagija, pri čemu je voda bila ad libitum. Eksperimenti su uvek izvođeni u istom dnevnom intervalu od 9-14h.

Prva OO - grupa životinja (n=10) predstavljala je kontrolu legla, a činile su je životinje koje nisu bile izlagane stresu i nisu tretirane lekovima. Drugu IndO - grupu (n=10) činile su životinje izložene indometacinskom stresu, koji je izazivan intragastričnom primenom indometacina u dozi od 20 mg/kg TM životinje, 6 sati pre žrtvovanja. Odgovarajuća doza indometacina nalazila se u 1 mL vode. Nakon isteka 6-og sata, životinje su žrtvovane u etarskoj narkozi. Treća IndM - grupa životinja (n=10) primila je morfin intraperitonealno, u dozi 10 mg/kg TM, 15 minuta pre izlaganja indometacinskom stresu.

### Uzimanje i makroskopska analiza uzoraka

Nakon žrtvovanja, životinji je uzdužnim rezom otvarana trbušna duplja i želudac oslobođen od njegovih ligamenata, a potom odstranjen iz trbušne duplje presecanjem trbušnog dela ezofagusa i duodenuma. Makroskopski su praćeni izgled i veličina želuca.

Želudac je otvaran makazama duž velike krivine od kardije do duodenuma i beleženo je ima li sadržaja i kakav je. Nakon toga, želudac je ispran tekućom vodom i fiksiran iglicama za stiroporsku pločicu. Zaostali ugrušci krvi odstranjivani su brisanjem papirnatom vatom, a želuci potom slikani digitalnim aparatom (Canon Power Shot A40) u makro modu. Sve promene na želucu posmatrane su i beležene pod lupom (3x uvećanje, LUXO Magnifier). Pri tome, beležen je broj lezija (petehija i erozija), kao i njihova veličina izražena u mm, merena milimetarskom folijom veličine 5x5 cm.

Na osnovu dobijenih podataka, ukupna veličina lezija izražavana je kao ulkusni indeks (UI). Vrednost UI izračunata je kao količnik iz ukupne površine lezija i broja životinja. Ukupna površina lezija bila je jednaka zbiru površine erozija u  $\text{mm}^2$  i površine petehijalnih krvarenja u  $\text{mm}^2$ . Površina erozija izračunata je množenjem širine i dužine erozija u mm. Površina petehijalnih krvarenja je izračunata na isti način, s tim da su u petehijalna krvarenja ubrajane sve lezije manje od  $0.5 \times 0.5$  mm.

$$\text{Ulkusni indeks (UI)} = \frac{\text{površina erozija u mm}^2 + \text{površina petehijalnih krvarenja u mm}^2}{\text{broj životinja}}$$

#### Histopatološka analiza uzoraka

Za histološku obradu preparati su pripremani standardnim tehnikama, rezanjem, kalupljenjem u parafinu i sečenjem na kliznom mikrotomu 4-6  $\mu\text{m}$  debljine, a potom bojeni hematoksilin-eozinom i po PAS-u.

Histološki preparati analizirani su svetlosnim mikroskopom tipa Leica DML S2, a specifične promene fotodokumentovane digitalnim aparatom tipa Canon Power Shot S70.

#### Biohemijska analiza uzoraka

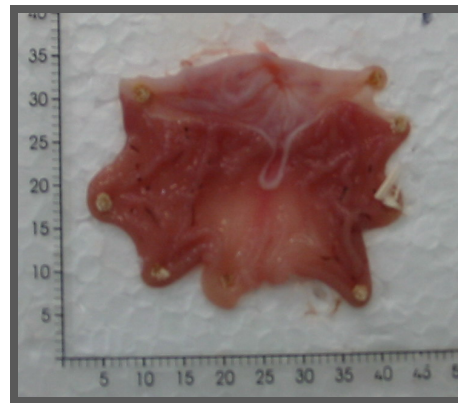
Izolovan želudac je homogeniziran u Potterovom homogenizatoru, sa puferom koji se sastojao od 50 mmol/dm<sup>3</sup> TRIS HCl i 0,25 mol/dm<sup>3</sup> saharoze, pH=7,4, u odnosu 1:3, na 4°C. Dobijeni homogenat je proceđen kroz gazu i određivani su biohemijski parametri. Aktivnost katalaze (CAT) određena je metodom po Beers-u i Sizer-u [19], glutation peroksidaze (GSHPx) metodom Chin-a i sar. [20], glutation reduktaze (GR) metodom Glatzle i Vuillenmir-a [21] i ksantin oksidaze (XOD) metodom po Bergmayer-u [22]. Sadržaj redukovano glutation (GSH) određen je po metodi Kapetanović i Mieval [23], a intenzitet lipidne peroksidacije (LPx) metodom Buerg-e i Austa [24] i izražen kao nmol malondialdehida/mg proteina/min ( $\epsilon=1,56 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### Statistička analiza

Rezultati merenja su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (SD) od 10 pojedinačnih životinja. Testiranje statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti izvršeno je pomoću Student-ovog t-testa, za male i nezavisne uzorke. Kriterijum za statističku značajnost bio je  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  i  $p < 0,001$ .

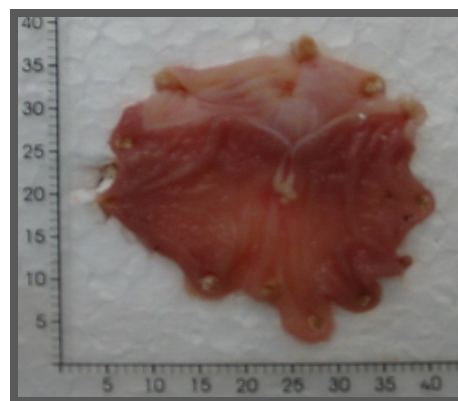
## REZULTATI

Kod kontrolne IndO grupe (životinje koje su dobile indometacin u dozi od 20 mg/kg TM) razvile su se promene na sluznici želuca u vidu erozija i petehijalnih krvarenja (Slika 1). Ukupna površina erozija i petehijalnih krvarenja iznosila je  $UI = 1,21 \pm 0,82 \text{ mm}^2$ . Pri ekstirpaciji želuca primećeno je da je želudac mali, a sukrvičav sadržaj bio je prisutan kod 6 od 10 ogleđnih životinja.



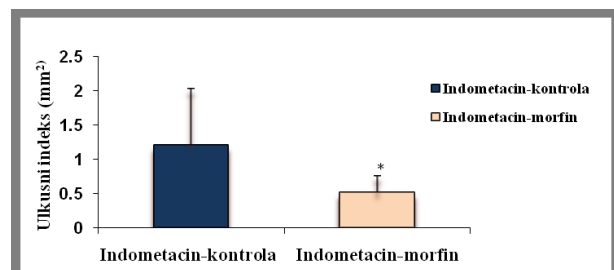
Slika 1. Makroskopski izgled želuca kontrolne IndO grupe životinja izložene indometacinskom stresu

U IndM grupi (životinje koje su primile morfin u pretretmanu indometacinskog stresa) erozije su bile površne ili duboke, crne, okrugle, bedemastih ivica (Slika 2). Pri ekstirpaciji želuca je kod svih 10 ispitivanih životinja bio mali, kod 4 je želučasti sadržaj bio sukrvičav, a kod 6 je bila prisutna velika količina mukusa.



Slika 2. Makroskopski izgled želuca IndM grupe životinja, koja je primila morfin u pretretmanu indometacinskog stresa

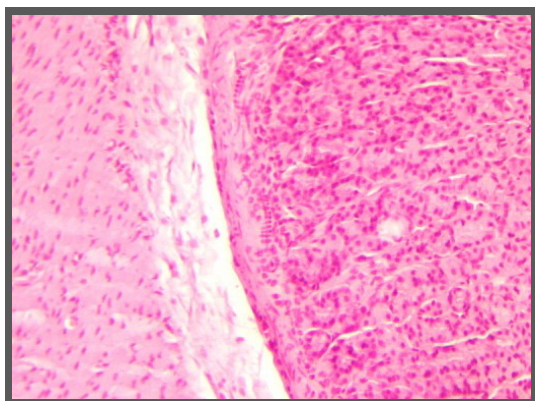
Ukupna površina lezija kod IndM grupe iznosila je  $UI = 0,51 \pm 0,24 \text{ mm}^2$ , i bila je statistički značajno manja u odnosu na kontrolnu IndO grupu ( $UI = 1,21 \pm 0,82 \text{ mm}^2$ ), što se može videti na grafikonu 1.



\* $p < 0,05$  (statistička značajnost)

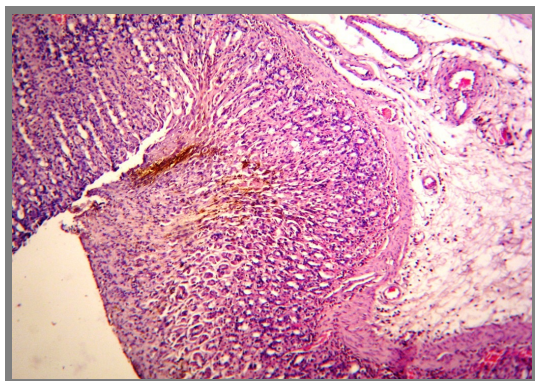
Grafikon 1. Makroskopske promene kod životinja IndM grupe, koje su primile morfin u pretretmanu indometacinskog stresa

Kod kontrolne OO grupe (zdrave, netretirane životinje) konstatovan je normalan histološki nalaz sa dominacijom leukocita u lamini muscularis mucosae (Slika 3).



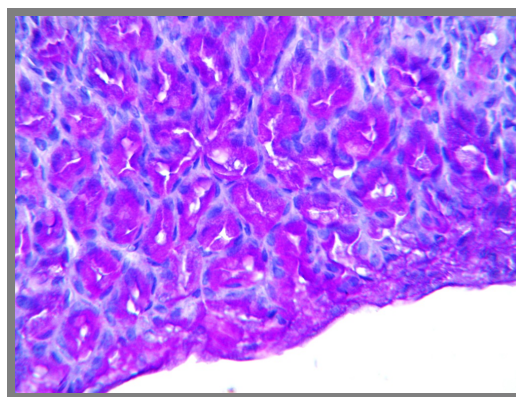
Slika 3. Mikroskopski izgled želuca kontrolne OO grupe zdravih (netretiranih) životinja (uveličanje 100x)

Histopatološkom analizom želuca kontrolne IndO grupe uočeni su plići i dublji defekti mukoze, od kojih su pojedini zahvatali i polovinu debljine iste, zatim ekstravazirani eritrociti, uglavnom u površnom sloju mukoze i hipermični krvni sudovi. U submukozi i uz laminu muscularis mucosae zapaženi su znaci zapaljenja, tj. edem i masa leukocita (uglavnom polimorfonukleara), a takođe su viđeni i mastociti (Slika 4).



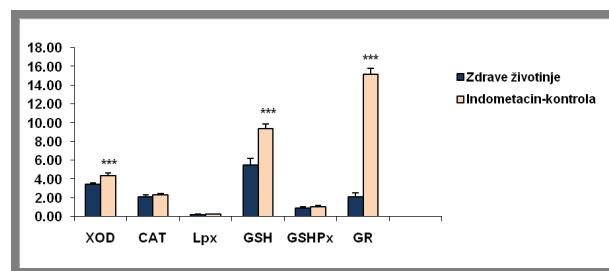
Slika 4. Mikroskopski izgled želuca kontrolne IndO grupe životinja izložene indometacinskom stresu (uveličanje 100x)

Kod IndM grupe mikroskopski su uočeni plitki defekti mukoze, zatim hiperemija, naročito površnog dela sa ekstravazacijom eritrocita, što je odgovaralo makroskopski vidljivim finim tačkastim krvarenjima. U submukozi su bili prisutni leukociti i mastociti (kako polimorfonukleari tako i mononukleari). Na preparatima bojenim po PAS-u, na površini mukoze uočene su ćelije koje proizvode mukus i velika količina mukusa (Slika 5).



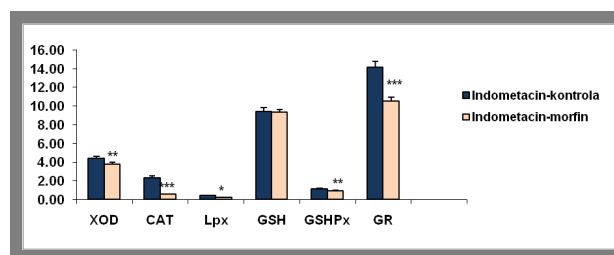
Slika 5. Mikroskopski izgled želuca IndM grupe životinja, koja je u pretretmanu indometacinskog stresa primila morfin (uveličanje 200x)

Indometacinski stres je statistički značajno povećao aktivnost ksantin oksidaze (XOD), i glutation reduktaze (GR), kao i sadržaj redukovanog glutationa (GSH) u želucu životinja IndO grupe, dok na aktivnost katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GSHPx), ali i intenzitet lipidne peroksidacije (Lpx) nije značajno uticao, u odnosu na OO grupu netretiranih životinja (Grafikon 2).



\*\*\*p<0,001 (statistička značajnost)

Grafikon 2. Promene parametara oksidativnog stresa u želucu kod životinja kontrolne IndO grupe izložene indometacinskom stresu (aktivnost XOD, CAT, GSHPx i GR izražena u nmol/mg proteina·min<sup>-1</sup>; intenzitet Lpx izražen u nmol malondialdehida/mg proteina; sadržaj GSH izražen u nmol GSH/mg proteina)



\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 (statistička značajnost)

Grafikon 3. Promene parametara oksidativnog stresa u želucu kod životinja IndM grupe, koje su primile morfin u pretretmanu indometacinskog stresa (aktivnost XOD, CAT, GSHPx i GR izražena u nmol/mg proteina·min<sup>-1</sup>; intenzitet Lpx izražen u nmol malondialdehida/mg proteina; sadržaj GSH izražen u nmol GSH/mg proteina)

Primena morfina u pretretmanu indometacinskog stresa je statistički značajno smanjila aktivnost svih enzima u želucu IndM grupe životinja u odnosu na kontrolnu IndO grupu, i to aktivnost ksantin oksidaze (XOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GSHPx) i glutation reduktaze (GR). Morfin je smanjio i intenzitet lipidne peroksidacije (Lpx) u želucu IndM grupe životinja, dok sadržaj redukovanog glutationa nije promenio u odnosu na kontrolu (Grafikon 3).

## DISKUSIJA

Indometacinski stres u trajanju od 6 sati izazvao je akutne promene na sluznici želuca u vidu crnih, crtastih erozija i petehijalnih krvarenja. Kod svih 10 oglednih životinja bile su prisutne i erozije i petehije, čija je ukupna površina iznosila  $UI=1.21 \pm 0.82$  mm<sup>2</sup>. Postojeće promene verifikovane su i patohistološki, kao plići i dublji defekti mukoze želuca. U submukozi i uz laminu muscularis mucosae zapaženi su i znaci zapaljenja, tj. edem i masa leukocita (uglavnom polimorfonukleara).

Primenjen u jednokratnoj dozi od 20 mg/kg TM indometacin nije povećao intenzitet lipidne peroksidacije (Lpx) u želucu, ali je značajno povećao sadržaj redukovanog glutationa (GSH), aktivnost glutation reduktaze (GR) i ksantin oksidaze (XOD), a na aktivnost katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GSHPx) nije uticao u odnosu na kontrolnu IndO grupu.

Istraživanja patofizioloških procesa koji su odgovorni za razvoj gastričnih lezija nastalih primenom indometacina, ali i drugih nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL) traju već nekoliko decenija [25, 26]. Osnovni događaj je neselektivna inhibicija enzima ciklooksigenaze 1 i 2 (COX 1 i 2) čime se prekida sinteza prostaglandina, osnovnih medijatora inflamacije tj. zapaljenja. Međutim, prostaglandini imaju i neke fiziološke funkcije u organizmu, pa tako gastrična mukoza kontinuirano proizvodi prostaglandine E i I klase (PGE2 i PGI2) i time održava ravnotežu između odbrambenih i agresivnih faktora. Prostaglandini stimulišu sekreciju mukusa i bikarbonata, dva važna faktora gastrične mukozne barijere, povećavaju protok krvi i proliferaciju epitelnih ćelija, ali i kože sekreciju pepsina i HCl [27, 28].

Najnovija eksperimentalna istraživanja potvrđuju da NSAIL pored inhibicije sinteze prostaglandina, kože sintezu i sekreciju mukusa, kao i sekreciju bikarbonata, podstiču sekreciju HCl i pepsina, što sve zajedno izaziva ishemiju. Kao posledica ishemije razvija se oksidativni stres u ćelijama mukoze želuca, odnosno u tkivu se nagomilavaju reaktivni kiseonični radikali (ROS), koji stupaju u reakciju sa proteinima, lipidima i DNA ćelija mukoze želuca [29, 30]. Mnogi autori ukazuju na prooksidantno dejstvo indometacina u mukozi želuca pacova, koje se manifestuje povećanjem intenziteta lipidne peroksidacije (povećan sadržaj malondialdehida - MDA), smanjenjem sadržaja redukovanog glutationa i smanjenjem aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GSHPx) [31, 32, 33, 34]. Takođe je zabeležena neutrofilna infiltracija gastrične mukoze, sa posledičnim povećanjem mijeloperoksidazne aktivnosti [29].

Interesantno je napomenuti da se naši rezultati razlikuju u odnosu na već navedene, po pitanju oksidativnog stresa i enzima antioksidativne zaštite. Naime, indometacin nije doveo do povećanja intenziteta lipidne

peroksidacije (Lpx), a umesto smanjenja došlo je do značajnog povećanja sadržaja redukovanog glutationa (GSH) i aktivnosti peroksidaze (Px), glutation reduktaze (GR) i ksantin oksidaze (XOD). Mišljenja smo da je vreme od 6 sati koliko su životinje bile izložene indometacinu bilo dovoljno da se organizam odbrani od ROS povećanjem aktivnosti Px i GR, i posledičnim povećanjem GSH, te nije došlo do porasta malondialdehida kao indeksa lipidne peroksidacije (Lpx). Moguće je da su naši rezultati drugačiji jer su pojedini autori koristili više doze indometacina, a pored toga i vreme njegovog delovanja je bilo kraće. Sabiu i sar. primenili su indometacin u dozi od 30 mg/kg TM u trajanju 4 sata, dok su Rozza i sar. primenili dozu od 100 mg/kg TM [33, 35].

Primena morfina u dozi od 10 mg/kg TM 15 minuta pre indometacinskog stresa je značajno smanjila intenzitet želudačnih lezija u odnosu na kontrolnu IndO grupu životinja. Ukupna površina promena u IndM grupi životinja koje su primile morfin pre indometacinskog stresa iznosila je  $UI=0.51 \pm 0.24$  mm<sup>2</sup>. Patohistološki su primećeni plitki defekti mukoze sa ekstravazacijom eritrocita i masom leukocita u submukozi.

Morfin je značajno smanjio intenzitet lipidne peroksidacije (Lpx) u želucu, ali i aktivnost svih enzima katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GSHPx), glutation reduktaze (GR), pa i ksantin oksidaze (XOD u poređenju sa kontrolom, dok je sadržaj redukovanog glutationa (GSH) ostao nepromenjen.

Dugo se već zna da organizam u stresu pojačano sintetise endogene opioide: endorfine, enkefaline i dinorfine, i da oni učestvuju u ograničavanju stresne reakcije. Preventivno dejstvo opioidnog analgetika morfina na pojavu stres ulkusa istražuje se već tridesetak, a možda i više godina, ali se tačan mehanizam njegovog preventivnog delovanja na razvoj stres ulkusa još ne zna. O uticaju morfina na razvoj ulkusnih lezija u želucu životinja izloženih indometacinskom stresu nema objavljenih podataka.

Cho i sar. ispitivali su dejstvo morfina na gastričnu mukožu pacova izloženih imobilizacionom stresu ubrzanom hladnoćom (CRS) [16]. Po njihovom mišljenju morfin, pre svega, stimuliše citoprotektivne mehanizme mukoze želuca, tj. stimuliše lučenje mukusa, podstiče ćeljsku proliferaciju i angiogenezu. S obzirom da je morfin smanjio aktivnost mijeloperoksidaze u gastričnoj mukozi, ističu i njegovo antiinflamatorno dejstvo. Naši rezultati takođe potvrđuju pojačano lučenje mukusa u želucu ispitivanih životinja, što se moglo i golim okom videti, ali je i patohistološki potvrđeno (na preparatima bojenim po PAS-u, na površini mukoze uočene su ćelije koje proizvode mukus).

Mišljenja o delovanju morfina na oksidativni stres i enzime antioksidativne zaštite su vrlo oprečna. Scrabalova i sar. smatraju da mnogi faktori određuju da li će on delovati kao prooksidans ili antioksidans, i to: vrsta, godine starosti, pol, vrsta tkiva ili organa, primenjena doza i dužina trajanja terapije [17]. Isti autori tvrde da morfin može dovesti do razvoja oksidativnog stresa na dva načina, s jedne strane povećanom produkcijom slobodnih kiseoničnih i drugih radikala, a s druge strane smanjenom aktivnošću antioksidativne zaštite.

Akutna ili hronična primena morfina dovela je do značajnog smanjenja sadržaja redukovanog glutationa (GSH) u mozgu glodara i čoveka, kao i jetri miševa, dok je do smanjenja aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GSHPx) došlo



samo posle hronične primene [36, 37, 38]. Drastichova i sar. tvrde pak, da dugotrajna primena morfina nije izazvala promene u aktivnosti enzima SOD, GSHPx i CAT u srcu pacova [39]. Rozisky i sar. tvrde da je morfin izazvao sistematski oksidativni stres u pacova, koji se manifestovao pojačanom produkcijom slobodnih radikala i smanjenom aktivnošću enzima antioksidativne zaštite u različitim tkivima, tj. jetri, bubregu, kičmenoj moždini, likvoru, hipokampusu i krvnoj plazmi [40].

U nekim radovima se pominje da je hronična primena morfina dovela do oštećenja jetre kod pacova i miševa koji su razvili toleranciju i fizičku zavisnost prema istom [18, 41]. Kod tretiranih životinja zabeležen je značajan pad u sadržaju redukovano glutaciona (GSH) u jetri (do 40%), ali i aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation S transferaze (GST), ali i povećan nivo malondialdehida (MDA), kao indeksa lipidne peroksidacije [18, 41, 42].

Naši rezultati se donekle podudaraju sa prethodnim jer je morfin smanjio aktivnost svih enzima antioksidativne zaštite CAT, GSHPx i GR, što govori u prilog njegovog prooksidantnog delovanja, ali je doveo i do smanjenja sadržaja MDA tj. intenziteta lipidne peroksidacije što bi ukazivalo na njegovo antioksidativno dejstvo.

## ZAKLJUČAK

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da opioidni analgetik morfin može zaštititi gastričnu sluznicu pacova od agresivnog delovanja nesteroidnog antiinflamatornog leka (NSAIL) indometacina. Gastroprotektivno dejstvo morfina je najpre posledica pojačane produkcije mukusa tj. stimulacije citoprotektivnih mehanizama mukoze želuca, jer je patohistološki potvrđen veliki broj mukusnih ćelija i deo sloj mukusa na površini mukoze.

Po pitanju oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite ne možemo biti sigurni da li je delovao prooksidativno ili antioksidativno u mukozi želuca. Naime, u prilog njegovog prooksidativnog dejstva ide značajno smanjenje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GSHPx) i glutation reduktaze (GR). S druge strane, morfin je ispoljio antioksidativno dejstvo u smislu značajnog smanjenja sadržaja malondialdehida (MDA), tj. intenziteta lipidne peroksidacije (Lpx), ali i smanjenja aktivnosti ksantin oksidaze (XOD).

Sve ovo ukazuje na to da je neophodno sprovesti dodatna istraživanja da bi sa sigurnošću dokazali da morfin ispoljava antioksidativno dejstvo u mukozi želuca.

**NAPOMENA:** U radu su publikovani rezultati iz dokrorata Julijane Rašić, pod nazivom: „Uloga inflamatornih i oksidativnih parametara u razvoju stresom indukovanih ulkusnih lezija pacova i mogućnost njihove modulacije različitim lekovima“.

## LITERATURA

1. Robert A, Szabo S. Stress ulcers. In: Selyes Guide to Stress Research; Seyle H, Ed; Van Nostrand Reinhold Company Inc, New York, NY, USA, 1983; Volume 2: 22-46.
2. Szabo S, Glavin S. Hans Selye and the concept of biologic stress. Ulcer patogenesis as a historical paradigm. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 597: 14-6.
3. Janićijević-Hudomal S, Rašić J, Mikić D, Piperski V: Incidenca stres ulkusa kod bolesnika sa sepsom. *Praxis Medica* 2009; 37(1-2): 73-6.
4. Rašić J, Nestorović V, Janićijević-Hudomal S, Rašić D, Kisić B: Profilaksa stres ulkusa. *Praxis Medica* 2012; 41(3-4): 89-92.
5. Mohebbi L, Hesch K: Stress ulcer prophylaxis in the intensive care unit. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2009; 22(4): 373-76.
6. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition and biological effects. *Biochem and Biophys Res Commun* 2005; 338: 668-76.
7. Galunska B, Marazova K, Yankova T, Popov A, Frangov P, Krushkov I, Di Massa A. Effects of paracetamol and propacetamol on gastric mucosal damage and gastric lipid peroxidation caused by acetylsali-cylic acid (ASA) in rats. *Pharmacological Research* 2002; 46: 141-8.
8. Popovic M, Janicijevic-Hudomal S, Kaurinovic B, Rasic J, Trivic S. Antioxidant effect of some drugs on ethanol-induced ulcers. *Molecules* 2009; 14: 816-26.
9. Popovic M, Janicijevic-Hudomal S, Kaurinovic B, Rasic J, Trivic S., Vojnovic M. Antioxidant effects of some drugs on immobilization stress combined with cold restraint stress. *Molecules* 2009; 14: 4505-16.
10. Leslie JC. Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. *Arthritis Res Ther* 2013; 15(3): S2.
11. Ringim AH. Review evidence-based insights on non-steroidal antiinflammatory drugs. *J Pharm Cosmet Sci* 2015; 3(2): 8-13.
12. Malfeitheiner P, Chan FK, McColl KE. Peptic ulcer disease. *Lancet* 2009; 374: 1449-61.
13. El-Ashmawy NE, Khedr EG, El-Bahrawy HA, Selim HM. Gastroprotective effect of garlic in indomethacin induced gastric ulcer in rats. *Nutrition* 2016; 32(7-8): 849-54.
14. Rašić J: Uloga inflamatornih i oksidativnih parametara u razvoju stresom indukovanih ulkusnih lezija pacova i mogućnost njihove modulacije različitim lekovima. Kosovska Mitrovica: Univerzitet u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici, 2007. Disertacija.

15. Kaličanin P, Stožinić S, Paleev RN, Slijepčević D. Stres zdravlje - bolest. Beograd: Obeležja, 2001.
16. Cho CH, Wu KK, Wu S, i sar. Morphine as a drug for stress ulcer prevention and healing in the stomach. *Eur J Pharmacol* 2003; 460: 177-82.
17. Skrabalova J, Drastichova Z, Novotny J. Morphine as a potential oxidative stress-causing agent. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* 2013; 10: 367-72.
18. Yun J, Oliynyk S, Lee Y, i sar. Ajoene restored behavioral patterns and liver glutathione level in morphine treated C57BL6 mice. *Arch Pharm Res* 2017; 40(1): 106-11.
19. Beers RFJ, Sizer JW. Spectrophotometric method for measuring of breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1950; 195: 133-40.
20. Chin PTY, Stults FH, Tappel AL. Purification of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochemica and Biophysica Acta* 1976; 445: 558-660.
21. Glatzle D, Vuillenmir K. Glutathione reductase test with whole blood a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in human. *Experientia* 1974; 30 (6): 565-638.
22. Bergmayer UH. *Methoden der enzymatischen analyse*. Verlag Chemie Weinheim 1970; 483-84.
23. Kapetanović IM, Mיעyal II. Inhibition of acetaminophen induced hepatotoxicity by phenacetin and its alkoxy analogs. *Journal of Pharmacology Experimental Therapy* 1979; 209: 25-30.
24. Buerge AJ, Aust DS. *Methods in enzymology*, Fleischer S, Parker L. Eds. Academic Press, New York, 1978, 306.
25. Wallace J. Recent advances in gastric ulcer therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5(6): 573-7.
26. Kay B, Paola P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Pain Res* 2015; 8: 105-18.
27. Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology* 2008; 135(1): 41-60.
28. Bigoniya P, Singh K. Ulcer protective potential of standardized hesperidin, a citrus flavonoid isolated from *Citrus sinensis*. *Rev Bras Farma* 2014; 24: 330-40.
29. Bayir Y, Odabasoglu F, Cakir A, Aslan A, Suleyman H, Halici M, Kazaz C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine*, 2006; 13(8): 584-90.
30. Kiarostami V, Samini L, Ghazi-Khansari M. Protective effect off me-latonin against multistress condition induced lipid peroxidation via measure of gastric mucosal lesion and plasma malondialdehyde levels in rats. *Word J Gastroenterol* 2006; 12(46): 7527-31.
31. El-Komy MM, Mouafi FE. Mitigating effect of *Avicena marina* on indomethacin induced gastric ułcer in male albino rats. *Egyptian journal of Basic and Applied Sciences (EJBAS)* 2016; 3: 155-63.
32. Cheng YT, Lu CC, Yen GC. Beneficial effects of camellia oil (*Camellia oleifera* Abel.) on hepatoprotective and gastroprotective activities. *J Nutr Sci Vitaminol* 2015; 61: S100-S102.
33. Rozza AI, Hiruma-Lima CA, Takahira RK, Padovani CR, Pellizzon CH. Effect of menthol in experimentally induced ulcers: Pathways of gastroprotection. *Chemico Biological Interactions* 2013; 206: 272-78.
34. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe S. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev* 2014; 94: 329-54.
35. Sabiu S, Garuba T, Sunmonu T i sar. Indomethacin-induced gastric ulceration in rats: protective roles of *Spondias mombin* and *Ficus exasperata*. *Toxicology Reports* 2015; 2: 261-67.
36. Ozmen I, Naziroglu M, Alici HA, Sahin F, Cengiz M, Eren I. Spinal morphine administration reduces the fatty acid contents in spinal cord and brain by oxidative stress. *Neurochem Res* 2007; 32(1): 19-25.
37. Abdel-Zaher AO, Abdel-Rahman MS, Elwasei FM. Blockade of nitric oxide overproduction and oxidative stress by *Nigella sativa* oil attenuates morphine-induced tolerance and dependence in mice. *Neurochem Res* 2010; 35(10): 1557-65.
38. Sumathi T, Nathiya VC, Skthikumar M. Protective effect of Bacoside-A against morphine- induced oxidative stress in rats. *Ind J Pharm Sci* 2011; 73(4):409-15.
39. Drastichova Z, Skrabalova J, Jedelsky P, Neckar J, Kolar F, Novotny J. Global changes in the rat heart proteome induced by prolonged morphine treatment and withdrawal. *PLoS One* 2012; 7(10): e47167.
40. Rozisky JR, Laste G, De Macedo IC i sar. Neonatal morphine administration leads to changes in hippocampal BDNF levels and antioxidant enzyme activity in the adult life of rats. *Neurochem Res* 2013; 38:494-503.
41. Yun J, Lee Y, Zun K, Oh S. Bergenin decreases the morphine-induced physical dependence via antioxidative activity in mice. *Arch Pharm Res* 2014; 38(6):1248-54.
42. Samarghandian S, Afshari R, Farkhondeh T. Effect of long-term treatment of morphine on enzymes, oxidative stress indices and antioxidant status in male rat liver.

**THE EFFECT OF MORPHINE ON DEVELOPMENT OF ULCER LESIONS OF THE RATS EXPOSED TO INDOMETHACIN INDUCED STRESS**

Julijana Rasic<sup>1</sup>, Snezana Janicijevic Hudomal<sup>1</sup>, Zorica Stanojevic-Ristic<sup>1</sup>, Bojana Kistic<sup>2</sup>, Snezana Stevic<sup>1</sup>, Leonida Vitkovic<sup>3</sup>, Milica Mijovic<sup>4</sup>

<sup>1</sup> University of Pristina, Faculty of Medicine, Institute of Pharmacology and Toxicology, Kosovska Mitrovica, Serbia

<sup>2</sup> University of Pristina, Faculty of Medicine, Institute of Biochemistry, Kosovska Mitrovica, Serbia

<sup>3</sup> University of Pristina, Faculty of Medicine, Institute of Histology and Embryology, Kosovska Mitrovica, Serbia

<sup>4</sup> University of Pristina, Faculty of Medicine, Institute of Pathology, Kosovska Mitrovica, Serbia

**SUMMARY**

Oxidative stress plays an important role in development of ulcer lesions of the rats exposed to indomethacin induced stress. It has been suggested that endogenous opioids released during the stress may attenuate gastric ulcer lesions. The aim of this study was to investigate effects of morphine on development of ulcer lesions, pathohistological alterations and antioxidative status in stomach of the rats exposed to indomethacin induced stress. Research was performed on adult, male Wistar rats weighting 200-230 g. Indomethacin stress was induced by intragastric administration of indomethacin at a dose of 20 mg/kg b.w. 6 hours before sacrificing. Morphine was applied intraperitoneally, in the doses of 10 mg/kg b.w. 15 minutes before indomethacin induced stress. The size of lesions in the form of petechiae and erosion, is expressed as the total surface of changes (mm<sup>2</sup>), i.e. ulcer index (UI). The pathohistological samples were analyzed by Leica DML S2 light microscope, and specific changes were photodocumented with Canon Power Shot S70 digital camera. In the homogenate of the stomach, the activity of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSHPx), glutathione reductase (GR) and xanthine oxidase (XOD) were measured, as well as the reduced glutathione content (GSH) and the lipid peroxidation intensity (Lpx). Morphine significantly reduced the ulcer index (UI) in animals exposed to indomethacin stress and the presence of large amounts of mucus in the stomach mucosal was established histopathologically. The use of morphine in the pre-treatment of indomethacin induced stress statistically significantly reduced the activity of all enzymes in the stomach compared to the control group, and this activity of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSHPx) and glutathione reductase (GR), xanthine oxidase (XOD), as well as the lipid peroxidation intensity (Lpx), while the reduced glutathione content remained unchanged. Gastroprotective morphine activity in animals exposed to indomethacin induced stress is most likely a consequence of the strengthening of cytoprotective mechanisms rather than antioxidant action.

Keywords: morphine, indomethacin, stress ulcer, oxidative stress, antioxidative status

---