

МОДУЛЮВАННЯ АКТИВНОСТІ NO-ЕРГІЧНОЇ СИСТЕМИ У ШЛУНКУ ЗА УМОВ СТРЕПТОЗОТОЦИНІНДУКОВАНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ

В експериментах на 36 щурах-самцях із стрептозотоциніндукованою гіперглікемією показано зниження активності sNOS, зростання активності iNOS та вмісту нітрит-аніона, а також підвищення рівня оксидативних процесів у слизовій і м'язовій оболонках шлунка, що порушує секреторну та моторно-евакуаторну функції шлунка. Двотижневе введення L-аргініну і блокування рівня активності iNOS аміногуанідином моделюють активність NO-ергічної системи та процеси ліпопероксидації у шлунку.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **NO-ергічна система, процеси ліпопероксидації, гіперглікемія, шлунок.**

ВСТУП. Відомо, що фізіологічна роль NO-ергічної системи в органах травної системи пов'язана з регуляцією численних локальних тканинних процесів, таких, як секреція, нейротрансмісія, моторика, всмоктування, регуляція стану локальної мікрогемодинаміки [9, 21]. Характер дії нітрогену оксиду (NO), який безпосередньо бере участь у регуляторних процесах, залежить від активності NO-синтази. У слизовій оболонці шлунка NO бере участь у регуляції секреції шлункових залоз, кровотоку, моторики, підтриманні структури та функції слизового бар'єру, процесах міжклітинної інтеграції, передачі інформації у неадренергічних нехолінергічних нейронах [23]. Нітрогену оксид є одним з основних чинників, що регулюють моторику гладких м'язів органів травлення. Гіперглікемія викликає розслаблення гладких м'язів, знижує їх тонус, що призводить до зменшення амплітуди і тривалості м'язових скорочень шлунка, тиску в гастроезофагальному сфінктері [10, 18], а також спричиняє ендотеліальну дисфункцію [12]. NO-ергічна система безпосередньо бере участь у розвитку порушень моторики органів травлення [2, 15].

На сьогодні недостатньо вивченими є зміни NO-ергічної системи у слизовій (СОШ) та м'язовій оболонках шлунка (МОШ), що і зумовило визначення активності NO-синтаз, вмісту нітрит-аніона та процесів ліпопероксидації у шлунку як за умов норми, так і при модулюванні активності NO-синтаз за стрептозотоциніндукованою гіперглікемією.

© О. І. Децик, О. Я. Склярів, 2013.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди було проведено на 36 білих щурах масою 150–170 г, яких поділили на чотири групи: 1-ша – контрольна, тваринам протягом двох тижнів перорально вводили фізіологічний розчин; 2-га – тварини, яким одноразово вводили стрептозотин у дозі 60 мг/кг інтраперитонеально (концентрація глюкози у крові становила понад 16 ммоль/л); 3-тя – тварини, яким на тлі гіперглікемії протягом 14 днів щоденно перорально вводили L-аргінін у дозі 300 мг/кг; 4-та – тварини, яким на тлі гіперглікемії щоденно протягом 14 днів вводили блокатор iNOS аміногуанідин у дозі 20 мг/кг внутрішньочеревно.

Декапітацію тварин проводили під уретановим знеболюванням. У гомогенатах слизової та м'язової оболонок шлунка визначали: активність NO-синтаз [6], вміст ТБК-активних продуктів [7], активність ензимів антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази (СОД) [8] і каталази [4], вміст нітрит-аніона за допомогою реактиву Гріса [14].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням прикладної програми "Statistica". Статистично достовірними вважали розбіжності при $p < 0,05$. Дослідження було виконано згідно з правилами, передбаченими Європейською комісією по нагляду за проведенням лабораторних дослідів за участю експериментальних тварин.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У контрольних тварин як у слизовій, так і в м'язовій обо-

лонках шлунка активність конститутивної NO-синтази (сNOS) була вищою, ніж активність індукційної NO-синтази (іNOS), що відповідає даним літератури [5]. Вміст нітрит-аніона між СОШ та МОШ достовірно не відрізнявся (табл. 1). Перебіг процесів ліпопероксидації та активність каталази у СОШ були вищими порівняно з МОШ, тоді як рівень активності СОД не відрізнявся (табл. 2).

За умов гіперглікемії активність сNOS у СОШ зменшилась на 50 % ($p < 0,05$), тоді як у МОШ вона виражено не змінювалась. Активність іNOS у СОШ при гіперглікемії підвищилась на 87 % ($p < 0,05$), у МОШ – у 2,3 раза

($p < 0,01$). Вміст нітрит-аніона в СОШ збільшився на 22 % ($p < 0,05$), у МОШ – мав тенденцію до зростання.

Гіперглікемія призводила до посилення процесів ліпопероксидації – найбільш виражено зростав вміст ТБК-активних продуктів (ТБК) у СОШ на 22 % ($p < 0,05$), у МОШ – на 17 % ($p < 0,05$). Паралельно підвищувалась активність СОД – на 65 % ($p < 0,05$) у слизовій оболонці шлунка та на 23 % у м'язовій.

Отже, отримані результати свідчать про те, що за умов гіперглікемії у слизовій та м'язовій оболонках шлунка знижується активність сNOS, зростають активність іNOS і вміст нітрит-

Таблиця 1 – Вміст нітрит-аніона та активність NO-синтаз у слизовій і м'язовій оболонках шлунка за умов стрептозотоциніндукованої гіперглікемії та при модулюванні рівня активності NO-синтаз

Серія досліджень	NOS, нмоль/хв·г	сNOS, нмоль/хв·г	іNOS, нмоль/хв·г	Нітрит-аніон, мкмоль/л
Слизова оболонка шлунка				
Контроль	0,647±0,128	0,460±0,025	0,180±0,057	17,75±1,7
Тварини з гіперглікемією	0,826 ±0,14	0,229±0,078*	0,597±0,14*	21,8±1,05*
Введення L-аргініну на тлі гіперглікемії	0,651±0,17	0,176±0,05	0,474±0,147	19,57±1,5
Інгібування іNOS на тлі гіперглікемії	0,636±0,044	0,181±0,024	0,403±0,037	21±1,09
М'язова оболонка шлунка				
Контроль	0,5±0,118	0,37±0,1	0,16±0,038	18,0±1,4
Тварини з гіперглікемією	0,65±0,087	0,29±0,085	0,37±0,089*	19,8±1
Введення L-аргініну на тлі гіперглікемії	0,61±0,095	0,25±0,034	0,36±0,09	20,3±2,7
Інгібування іNOS на тлі гіперглікемії	0,53±0,09	0,29±0,037	0,24±0,125	19,6±1,15

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з показниками контрольної групи тварин.

Таблиця 2 – Вміст ТБК та активність СОД і каталази у м'язових оболонках шлунка та товстої кишки за умов стрептозотоциніндукованої гіперглікемії і при модулюванні рівня активності NO-синтаз

Серія досліджень	ТБК, мкмоль/г·тк	Активність СОД, мкмоль НСТ/ хв·мг білка	Активність каталази, мкмоль H_2O_2 /хв·л
Слизова оболонка шлунка			
Контроль	218±7,76	18,8±1,35	0,280±0,033
Тварини з гіперглікемією	266,6±16,2*	31±4,1*	0,399±0,03
Введення L-аргініну на тлі гіперглікемії	232,1±10,3 [#]	21,7±2,6 [#]	0,324±0,022
Блокування іNOS на тлі гіперглікемії	248,6±25,9	20,3±1,32 [#]	0,336±0,015
М'язова оболонка шлунка			
Контроль	129±9,8	18,9±1,42	0,111±0,006
Тварини з гіперглікемією	150,5±11,5*	23,3±3,95	0,143±0,006
Введення L-аргініну на тлі гіперглікемії	129±8,35 [#]	21,4±1,8	0,136±0,01
Блокування іNOS на тлі гіперглікемії	119±7,4 [#]	22,2±1,63	0,129±0,007

Примітки:

- 1) * – $p < 0,05$ порівняно з показниками контрольної групи тварин.
- 2) [#] – $p < 0,05$ порівняно з показниками гіперглікемії.

аніона, а також підвищуються рівень оксидативних процесів та активність супероксиддисмутази (СОД).

Відомо, що при гіперглікемії значно зростає експресія іNOS під впливом цитокінів IL-1, IFN- γ , TNF- β та різко підвищується продукція нітрогену оксиду, взаємодія якого з O₂⁻ призводить до утворення високотоксичної сполуки – пероксинітриту [16]. Останній викликає пошкодження ДНК, нітрозилує білки, спричиняє порушення процесів поділу та енергозабезпечення клітини, окиснює кофактор BH₄ eNOS до неактивного BH₂ [3, 19].

Гіперглікемія викликає зниження секреції залоз шлунка [11] та рівня кровотоку в його слизовій оболонці [13].

Зростання рівня активності іNOS, вмісту нітрит-аніона та процесів ліпопероксидації є одним із ключових механізмів розслаблення гладких м'язів у шлунку і виникнення антральної гіпокінезії або гастроаритмії, що призводить до порушень моторно-евакуаторної функції шлунка. Так, у хворих на цукровий діабет 1-го типу зменшувались моторика і тиск в антральному відділі шлунка, зростав час евакуації з шлунка у дванадцятипалу кишку, затримка випорожнення шлунка спостерігалась у 27–58 % хворих [20, 22].

Двотижневе введення прекурсора для NO-синтаз L-аргініну на тлі гіперглікемії у СОШ викликало тенденцію до зниження активності NO-синтаз, вмісту нітрит-аніона, тоді як у МОШ достовірних змін не було.

Слід відзначити, що вміст ТБК у СОШ та МОШ зменшився на 13 і 14 % (p<0,05) відповідно. Також відмічено зменшення рівня активності СОД, переважно у СОШ, – на 30 % (p<0,05). Активність каталази змінювалась недостовірно.

Отже, отримані результати свідчать про те, що двотижневе введення L-аргініну на тлі гіперглікемії у цілому не викликало виражених змін NO-ергічної системи у слизовій та м'язовій оболонках шлунка. При цьому проявилась антиоксидантна дія L-аргініну – зменшувався вміст продуктів ТБК у слизовій та м'язовій оболонках шлунка.

Моделювання активності NO-ергічної системи у слизовій та м'язовій оболонках шлунка шляхом двотижневого блокування рівня активності іNOS аміногуанідином викликало у СОШ зменшення активності іNOS на 49 %

(p<0,05) та зростання активності cNOS на 66 %. У МОШ було відзначено тенденцію до зниження активності іNOS на 35 % (p>0,05).

Процеси ліпопероксидації за умов блокування активності іNOS у СОШ мали тенденцію до зменшення. Рівень активності СОД у СОШ знижувався на 35 % (p<0,05); у МОШ вміст ТБК знизився на 21 % (p<0,05), активність СОД і каталази змінювалась недостовірно.

Таким чином, двотижневе блокування рівня активності іNOS аміногуанідином на тлі гіперглікемії викликало тенденцію до зниження рівня активності іNOS у СОШ та МОШ, зміни вмісту нітрит-аніона були недостовірними. Антиоксидантні процеси більшою мірою знижувались у МОШ.

Антиоксидантна дія аміногуанідину пов'язана зі зниженням продукції трансформуючого фактора росту β_1 , фактора росту тромбоцитів, гальмуванням посттрансляційного нітрозилування білків пероксинітритом, нормалізацією рівноваги між оксидативними процесами та антиоксидантною системою, інгібуванням неферментативного глікозилювання [1, 17].

Отже, двотижневе введення прекурсора NO-синтаз L-аргініну або селективного блокатора іNOS аміногуанідину моделює активність NO-ергічної системи і процесів ліпопероксидації за умов стрептозотоциніндукованої гіперглікемії, що може впливати на секреторну та моторно-евакуаторну функції шлунка.

ВИСНОВКИ. 1. Гіперглікемія викликає у слизовій та м'язовій оболонках шлунка зниження активності cNOS, зростання активності іNOS і вмісту нітрит-аніона, а також підвищення рівня оксидативних процесів, що є одним із факторів порушення секреторної та моторно-евакуаторної функцій шлунка.

2. Двотижневе введення L-аргініну на тлі гіперглікемії не спричиняє виражених змін NO-ергічної системи у слизовій та м'язовій оболонках шлунка. При цьому проявляється антиоксидантна дія L-аргініну – зменшується вміст продуктів ТБК у шлунку.

3. Двотижневе блокування рівня активності іNOS аміногуанідином на тлі стрептозотоциніндукованої гіперглікемії викликає тенденцію до зниження рівня активності іNOS у слизовій та м'язовій оболонках шлунка, при цьому антиоксидантні процеси більшою мірою знижуються у м'язовій оболонці шлунка.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бродик І. В. Вплив аміногуанідину на активність NO-синтази в лейкоцитах периферичної крові за умов стрептозотоцинового діабету в щурів / І. В. Бродик, Н. О. Сибірна // Експерим. фізіологія та біохімія. – 2006. – № 3. – С. 45–49.
2. Децик О. І. Роль NO-синтазної системи у регуляції моторної функції органів травлення за фізіологічних умов та при цукровому діабеті I типу / О. І. Децик, О. Я. Склярів, І. С. Фоменко // Практ. медицина. – 2010. – **26**, № 5. – С. 128–133.
3. Ивашкин В. Т. Оксид азота в регуляции функциональной активности физиологических систем / В. Т. Ивашкин, О. М. Драпкина // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2000. – № 4. – С. 16–21.
4. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
5. Насадюк Х. М. Вплив коротколанцюгового пептиду аргініл-альфа-аспартил-лізил-валіл-тирозил-аргініну на активність NO-синтазної системи та процеси ліпопероксидації при експериментальній виразці шлунка / Х. М. Насадюк, О. Я. Склярів // Клін. та експерим. фізіологія та біохімія. – 2010. – **49**, № 1. – С. 35–41.
6. Сумбаев В. В. Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс / В. В. Сумбаев, И. М. Ясинская // Совр. пробл. токсикологии. – 2000. – № 3. – С. 3–7.
7. Тимурбулатов М. А. Метод повышения свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / М. А. Тимурбулатов, Е. И. Селезнев // Лаб. дело. – 1981. – № 4. – С. 209–211.
8. Чевари С. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте / С. Чевари, Т. Андял, Я. Штрэнгер // Лаб. дело. – 1991. – № 10. – С. 9–13.
9. Cirino G. Nitric oxide releasing drugs: from bench to bedside / G. Cirino // Dig. Liver Dis. – 2003. – **35** (suppl. 2). – P. 2–8.
10. Characterization of myenteric neuropathy in the jejunum of spontaneously diabetic BB-rats / M. Zandecki, P. Vanden Berghe, I. Depoortere [et al.] // Neurogastroenterol. Motil. – 2008. – **20**, № 7. – P. 818–828.
11. Effects of streptozotocin-induced long-term diabetes on parietal cell function and morphology in rats / S. M. Bastaki, E. Adeghate, I. S. Chandranath [et al.] // Mol. Cell. Biochem. – 2010. – **341**, № 1–2. – P. 43–50.
12. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus / I. Van den Oever, H. G. Rafterman, M. T. Nurmohamed [et al.] // Mediators of Inflammation. – 2010. – **2010**. – Published online 2010, 10.1155/2010/792393.
13. Epalrestat prevents the decrease in gastric mucosal blood flow and protects the gastric mucosa in streptozotocin diabetic rats / H. Suzuki, T. Shimosegawa, S. Ohara [et al.] // J. Gastroenterol. – 1999. – **34**, № 2. – P. 172–177.
14. Green L. C. Analysis of nitrate, nitrite and (1515) nitrate in biological fluids / L. C. Green, A. W. David // Anal. Biochem. – 1982. – **126**. – P. 131–138.
15. Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine / Z. D. Qu, M. Thacker, P. Baqyanszki [et al.] // Cell Tissue Res. – 2008. – **334**, № 2. – P. 147–161.
16. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and 2 diabetes: many differences few similarities / M. Cnop, N. Welsh, J. C. Jonas [et al.] // Diabetes. – 2005. – **64**, № 2. – P. 97–107.
17. Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME in streptozotocin induced diabetic rats: impacts on oxidative stress / A. Seven, S. Guzel, O. Seymen [et al.] // Tohoku J. Exp. Med. – 2003. – **199**, № 4. – P. 205–210.
18. Regional differences in the manifestation of gastrointestinal motor disorders in type 1 diabetic patients with autonomic neuropathy / A. Roszczocy, R. Roka, T. T. Varkonyi [et al.] // Z. Gastroenterol. – 2004. – **42**, № 11. – S. 1295–1300.
19. Role of cyclooxygenase-2 in cytokine-induced beta-cell dysfunction and damage by isolated rat and human islets / M. R. Heitmeier, C. B. Kelly, N. J. Ensor [et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, № 51. – P. 53145–53151.
20. Samson M. Gastrointestinal motor mechanisms in hyperglycaemia induced delayed gastric emptying in type I diabetes mellitus / M. Samson, L. M., Akkermans, R. J. Jebbink [et al.] // Gut. – 1997. – **49**, № 5. – P. 641–646.
21. Sharma J. Role of nitric oxide in inflammatory diseases / J. Sharma, A. Al-Omran, S. S. Parvathy // Inflammopharmacology. – 2007. – **15**. – P. 252–259.
22. Smith D. S. Current concepts in diabetic gastroparesis / D. S. Smith, C. D. Ferris // Drugs. – 2003. – **63**, № 13. – P. 1339–1358.
23. Wallace J. L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury / J. L. Wallace, L. Ma // Exp. Biol. Med. Vol. – 2001. – **226**, № 11. – P. 1003–1015.

МОДЕЛИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ NO-ЭРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ЖЕЛУДКЕ ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

Резюме

В экспериментах на 36 крысах-самцах с стрептозотоциндуцированной гипергликемией показано снижение активности cNOS, возрастание активности iNOS и содержания нитрит-аниона, а также повышение уровня оксидативных процессов в слизистой и мышечной оболочках желудка, что нарушает секреторную и моторно-эвакуаторную функции желудка. Двухнедельное введение L-аргинина и блокирование уровня активности iNOS аминоксидом моделируют активность NO-эргической системы и процессы липопероксидации в желудке.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **NO-эргическая система, процессы липопероксидации, гипергликемия, желудок.**

O. I. Detsyk, O. Ya. Sklyarov
DANYLO HALYTSKYI LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

MODULATION OF NO-ERGIC SYSTEM ACTIVITY IN STOMACH UNDER THE CONDITIONS OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED HYPERGLYCAEMIA

Summary

In experiments on 36 male rats with streptozotocin-induced hyperglycaemia the decrease of cNOS activity and increase of iNOS and nitrite-anion content were revealed as well as the increase of the oxidative processes level in mucosal and muscular layers of the stomach. Two-weeks administration of L-arginine on the background of hyperglycaemia did not cause any significant changes of NO-ergic system, whereas lipoperoxidation processes level in mucosal and muscular layers of the stomach decreased.

KEY WORDS: **NO-ergic system, lipoperoxidation processes, hyperglycaemia, stomach.**

Отримано 19.12.12

Адреса для листування: О. Я. Скляров, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна, e-mail: sklyarov@meduniv.lviv.ua.