

Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского
Серия «Биология, химия». 2007. Том 20 (59). № 1. С. 151-156.

УДК 616.33-002.44: 539.1.047

ВПЛИВ ІНГІБІТОРІВ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ НА ПРОЦЕСИ ВИРАЗКОУТВОРЕННЯ

Дробінська О.В., Максимович Я.С., Остапченко Л.І.

Досліджено вплив інгібіторів синтезу оксиду азоту на процеси виразкоутворення. Встановлено, що введення серотоніну викликає підвищення активності NO-синтази на 85% порівняно з контролем і спричинює розвиток значної кількості нейродистрофічних уражень. Застосування неселективного інгібітору NO-синтази L-NAME призводить до зниження активності ферменту на 26% порівняно з серотоніновою моделлю виразки. При цьому не було зареєстровано виразок, і відмічено зменшення кількості ерозій та їх довжини. Селективний інгібітор індукційної форми NO-синтази аміногуанідин у дозі 20мг/кг посилював ураження слизової, тоді як застосування селективного інгібітора нейрональної форми NO-синтази 7-нітроіндазолу спричинувало статистично достовірне зниження активності ферменту до рівня контрольних величин. Через 2 години після введення 7-нітроіндазолу утворення виразок та масивних крововиливів не спостерігалось.

Ключові слова: оксид азоту, виразкоутворення.

ВСТУП

Експериментальними і клінічними дослідженнями останніх років показано, що основним уражуючим фактором при ульцерогенезі є ендотеліальна дисфункція, яка характеризується дисбалансом між факторами релаксації і констрикції. Наслідком цих процесів є порушення регіонального кровотоку, ішемія судин слизової оболонки шлунку, тканинна гіпоксія, що сприяє розвитку некрозу та ацидозу клітин епітелію, утворенню тромбів та крововиливів [1]. Однією із речовин, яка бере участь в регуляції тону судин, сприяє вивільненню вазоактивних медіаторів із клітин ендотелію і забезпечує кровопостачання органів шлунково-кишкового тракту є оксид азоту (NO) [2]. Оксид азоту синтезується в організмі людини і тварин із L-аргініну за допомогою цитохром P-450-подібних гемопротеїнів NO-синтаз (NOS). По характеру індукції і фізіологічним властивостям вони розділені на два типи: I тип конститутивні (Ca^{2+} - і кальмодулін залежні), до яких відноситься нейрональна (nNOS) та ендотеліальна (eNOS) форми ферменту і II тип індукційна (цитокінзалежна) NO-синтаза, до якої відноситься макрофагальна (iNOS) форма ферменту [3]. При дії ацетилхоліну, брадікініну та інших агентів, які стимулюють реакції фосфатиділінозитолфосфатного регуляторного циклу відбувається активація конститутивної NO-синтази, що призводить до синтезу незначної кількості NO (пікомолі) протягом кількох хвилин. Під впливом імуногенних та прозапальних стимулів (інтерферон, інтерлейкін-1, фактор некрозу пухлин та ін.) відповідні клітини (макрофаги, нейтрофіли, моноцити, гепатоцити, фібробласти та ін.) продукують значно більшу кількість NO (наномолі) протягом кількох годин за рахунок підвищення активності індукційної форми ферменту [3]. На сьогоднішній день немає

остаточної думки про те, активація якої із цих ізоформ залучена до процесів виразкоутворення або цитопротекції.

Дані літератури щодо участі певних форм ферменту у розвитку виразкової хвороби доволі суперечливі. Так, було відмічено надмірну експресію iNOS на 1 – 2 другу добу після індукування виразки оцтовою кислотою, що співпадало зі збільшенням площі кратеру виразки [4], у той же час інші автори пояснюють такий характер експресії даної форми ферменту з ранніми процесами загоєння [5].

Метою роботи було оцінити вплив інгібіторів NO-синтази на процеси ульцерогенезу за умов експериментальної серотонінової моделі виразки шлунка у щурів.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Експерименти проведені на 50 нелінійних білих щурах-самцях масою 180-200г. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію. За добу до проведення експерименту тварини мали доступ лише до води. Серотонін вводили в/о в дозі 10 мг/кг за методом [6]. Неселективний інгібітор NO-синтази L-NAME (2,5мг/кг) [7] та специфічні інгібітори iNOS та nNOS – аміногуанідин (20мг/кг) [8] та 7-нітроіндазол (50 мг/кг) [9] вводили в/о за 5 хвилин до введення серотоніну. Через 2 години тварин декапітували і візуально досліджували стан слизової оболонки шлунку. Диференційно підраховували кількість ерозій, виразок, масивних крововиливів та довжину ерозій, площу виразок і масивних крововиливів. Ступінь ураженості слизової оболонки оцінювали із розрахунку на 1 шлунок. Слизову оболонку шлунка піддавали гомогенізації в трис-НСІ буфері (рН=7,4) у співвідношенні 1:10 при 0⁰С [10] і досліджували активність NO-синтази за методом [11]. Білок визначали за методом Лоурі. Статистичну обробку результатів проводили на IBM PC ET з використанням стандартних пакетів прикладних програм.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведених досліджень, нами було встановлено, що через 2 години після введення серотонін спричиняв нейродистрофічні ураження в слизовій оболонці шлунку щурів. Ми реєстрували значну кількість виразок, ерозій і крововиливів в кількості 3,5; 2,6; 1,3 відповідно із розрахунку на 1 шлунок. Площа виразок і крововиливів становила 8,5 та 3,7 мм², а довжина ерозій 5,2 мм (табл.).

Серотонінова модель виразки шлунку відома як ішемічна модель, яка виникає за рахунок вазоконстрикторних властивостей серотоніну, що задіяний в механізми скорочення гладеньких м'язів і є медіатором нервових процесів в ЦНС. У відповідь на вазоконстрикторний ефект серотоніну, відбувається генерація оксиду азоту, що проявляється у статистично значимому збільшенні активності NO-синтази на 85% (рис.).

Активація NO-синтази призводить до гіперпродукції оксиду азоту, надлишковий рівень якого може проявляти пошкоджуючу дію на клітини. Оксид азоту може бути агресивним фактором за рахунок своєї здатності при певних умовах пригнічувати циклооксигеназу, посилювати цитотоксичність пероксиду водню, ініціювати апоптоз клітин. NO реагує з клітинними залізовмісними білками (такими, як аконітаза циклу Кребса, комплекси I–III мітохондріального ланцюга переносу електронів) і шляхом S-нітрозилювання повністю їх

ВПЛИВ ІНГІБІТОРІВ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ НА ПРОЦЕСИ ВИРАЗКОУТВОРЕННЯ

інактивує. У присутності кисню утворюються активні інтермедіати NO (включаючи пероксинітрит ONOO⁻), що прямо проявляє цитотоксичну дію [12].

Таблиця

Вплив серотоніну і досліджуваних речовин на ураження слизової оболонки шлунку щурів. (n=40, M±m)

Показники ураженості	Серотонін (10 мг/кг)	Серотонін (10 мг/кг) + L-NAME (2,5мг/кг)	серотонін (10 мг/кг) + аміногуанідин (20 мг/кг)	серотонін (10 мг/кг) + 7-нітроіндазол (50 мг/кг)
Кількість ерозій	2,6±0,68	0,7±0,21*	1,1±0,52	0
Довжина ерозій (мм)	5,18±0,95	1,15± 0,48*	2,36±1,98	0
Кількість виразок	3,46±0,93	0	1,84±0,58	0
Площа виразок (мм ²)	8,48±3,10	0	20,45±8,0	0
Кількість крововиливів	1,27±0,52	1,1±0,40	6,6±1,34	0
Площа крововиливів (мм ²)	3,68±1,02	6,35±1,13*	80±42,9	0

Примітка: * різниця вірогідна в порівнянні з експериментальною моделлю виразки, p < 0,05

Гіперпродукцією оксиду азоту також обумовлено інгібування гліцеральдегід – 3-фосфатдегідрогенази шляхом рибозилування і нітрозилування. Це призводить до гальмування гліколізу і, як наслідок, до порушення енергетичного метаболізму. Всі ці небажані ефекти опосередковані активацією NOS та надмірним виробленням NO, при якому проявляється цитотоксичний ефект оксиду азоту. Отримані нами дані свідчать, що в ураження слизової оболонки шлунка, викликаних серотоніном робить свій внесок і оксиду азоту. З літературних джерел відомо, що високі концентрації оксиду азоту не реалізують вазодилаторний ефект через активацію розчинної гуанілатциклази по гемзалежному механізму з накопиченням цГМФ. Навпаки, вони виявляють пряму цитотоксичну дію, зв'язуючись з супероксидним радикалом, утворюють пероксинітрит (ONOO⁻), який індукує ушкодження ДНК і мутації [13]. Надмірне генерування оксиду азоту NO-синтазою можна розглядати як додатковий цитотоксичний фактор ушкодження слизової оболонки шлунка щурів. У високих концентраціях оксид азоту є фактором ендогенної інтоксикації, що визначає його цитотоксичну дію і викликає загибель клітин і тканин за механізмами апоптозу і некрозу.

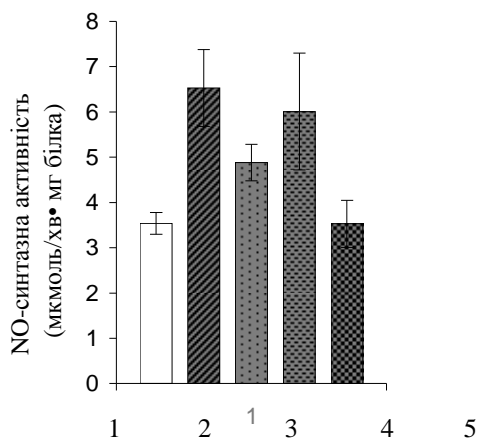


Рис. Активність NO-синтази в гомогенаті клітин слизової оболонки шлунку щурів за умов серотонінової моделі виразки і при введенні досліджуваних речовин.

1. контроль, n=10;
2. серотонін (10 мг/кг), n=10;
3. серотонін (10 мг/кг) + L-NAME (2,5 мг/кг), n=10;
4. серотонін (10 мг/кг) + аміногуанідин (20 мг/кг), n=10;
5. серотонін (10 мг/кг) + 7-нітроіндазол (50 мг/кг), n=10.

* різниця вірогідна в порівнянні з контролем, $p < 0,05$

** різниця вірогідна в порівнянні з експериментальною моделлю виразки, $p < 0,05$

Доказом цього є цитопротекторна дія на слизову оболонку шлунка щурів неселективного інгібітору NO-синтази L-NAME. Після введення L-NAME активність NO-синтази знижувалась на 26%. Нами не було зареєстровано виразок, встановлено статистично достовірне зменшення на 73% і 78% кількості ерозій і їх довжини, але площа крововиливів статистично значно збільшувалась на 72%.

Використання селективного інгібітору індукцибельної форми NO-синтази аміногуанідину призводило до незначного зниження активності ферменту. При цьому кількість ерозій і виразок зменшувалася на 58% і 47% відповідно, однак площа виразок збільшувалася у 2,4 рази, кількість масивних крововиливів підвищувалася у 5,2 рази, а їх площа – у 21,7 рази.

Можна припустити, що активація NO-синтази здійснюється за рахунок конститутивних форм синтази оксиду азоту, які проявляють свою активність тільки в присутності кальцію і кальмодуліну. Вазодилататорний ефект оксиду азоту реалізується через його взаємодію з цитозольним ферментом розчинною гуанілатциклазою, що призводить до її активації, зростання внутрішньоклітинного рівня циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ) та активації специфічного ферменту цГМФ-залежної протеїнкінази (G-кінази) [15].

Підвищення продукції NO відбувається пропорційно надходженню в цитоплазму іонів кальцію або ззовні, або із ендоплазматичного ретикулуму (при дії ацетилхоліну,

ВПЛИВ ІНГІБІТОРІВ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ НА ПРОЦЕСИ ВИРАЗКОУТВОРЕННЯ

брадікініну та інших агентів, стимулюючих реакції фосфатидилінозитолфосфатного циклу). Ефекти оксиду азоту залежать не лише від концентрації, але також і від місця його продукції, дифузії в клітинах і тканинах, утворення NO-вмісних сполук, взаємодії з реактивними формами кисню (особливо із супероксид-аніон радикалом).

Застосування селективного інгібітору нейрональної форми NO-синтази 7-нітроіндазолу спричинювало статистично достовірне зниження активності NO-синтази до рівня контрольних величин. Через 2 години після введення 7-нітроіндазолу утворення виразок та масивних крововиливів взагалі не спостерігалось.

Відомо, що нейрональна форма NO-синтази присутня у нітрергічних нейронах, які іннервують судини органів шлунково-кишкового тракту. Оксид азоту, який утворюється в результаті активації нейрональної форми NO-синтази задіяний в процеси регуляції тону судин як гальмівний нейромедіатор периферичної нервової системи [15]. Тому можна припустити, що надмірна активація nNOS призводить до сильної вазодилатації судин, порушенню кровотоку і гіпоксії. Крім того, нейрональна форма NO-синтази здатна продукувати і супероксидний радикал, який вступає в реакцію з оксидом азоту утворюючи пероксинітрит (ONOO⁻). Пероксинітрит не тільки здатний ушкоджувати ліпідне оточення іонних каналів мембран клітин і впливати на їх функцію шляхом нітрозилювання або окислення відповідних білків, але і безпосередньо проявляє вазодилаторні властивості, що призводить до незворотної релаксації гладеньких м'язів.

ВИСНОВКИ

Таким чином, в результаті проведених досліджень, нами встановлено, що у складні механізми виразкоутворення, спричиненого серотоніном залучена нейрональна форма NO-синтази. Гіперпродукцію синтезу NO можна розглядати як один із основних цитотоксичних факторів ушкодження слизової оболонки шлунка щурів і прогресування виразкоутворення.

Список літератури

1. Язвенная болезнь / Под ред. Ю.Ю. Елисеєва. – М.: КРОН-ПРЕСС, 2000. – 304 с.
2. Поленов С.А. Окись азота в регуляції функцій шлунково-кишкового тракту // Рос. журн. гастроентерології, гепатології, колонопроктології. – 1998. – Т.8, № 1. – С. 53–60.
3. Michel T., Feron O. Nitric Oxide Synthases: Which, Where, How, And Why // J. Clin. Invest. – 1997. – Vol. 100(9) - P. 2146–2152.
4. Guo J.S., Cho C.H., Wang W.P., Shen X.Z., Cheng C.L., Koo M.W.L. Expression and activities of three inducible enzymes in the healing of gastric ulcers in rats // World J Gastroenterol. – 2003.- Vol. 9, № 8. – P. 1767-1771
5. Tatemichi M., Ogura T., Sakurazawa N., Nagata H., Sugita M., Esumi H. Roles of inducible nitric oxide synthase in the development and healing of experimentally induced gastric ulcers // Int. J. Exp. Path. – 2003. - Vol. 84. – P. 213 – 220.
6. Dixit C., L.Rastogi., M. Dikshit. Effect of nitric oxide modulators on pylorus ligation induced ulcers in the rat // Pharmacol. Res. - 1999. - Vol.39. - P. 33-39.
7. Takeuchi K., Yasuhiro T., Asada Y., Sugawa Y. Role of nitric oxide in pathogenesis of aspirin-induced gastric mucosal damage in rats // Digestion – 1998. – V.59. – P. 298-307.
8. Takeuchi K., Hatazawa R., Tanigami M., Tanaka A., Ohno R., Yokota A. Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats//Life Sciences . - 2007. – Vol. 80. – P. 329–336

9. Москвин А. Н., Жиляев С. Ю., Шарапов О. И., Платонова Т. Ф., Гуцаева Д. Р., Косткин В. Б., Демченко И. Т. Мозговой кровоток модулирует нейротоксическое действие гипербарического кислорода с помощью нейронального и эндотелиального оксида азота // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. - 2002. - Т. 88, N 7. - С. 873-880.
10. Биологические мембраны. Методы / Под ред. Дж. Финдлея, У. Эванза. – М.: Мир, 1990. – 424 с.
11. Hevel J.M., White K.A., Marletta M.A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase // – 1991. – Vol. 266, № 34. – P. 22789 – 22791.
12. Маеда Х., Акаике Т. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 1007-1019.
13. Lamarque D., Whittle B.J.R. Role of oxygen-derived metabolites in the rat gastric mucosal injury induced by nitric oxide donors // European Journal of Pharmacology. – 1995. – Vol.277. – P.187 - 194.
14. Северина И.С. Растворимая гуанилат циклаза в молекулярном механизме физиологических эффектов оксида азота // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 939-947.
15. Toda N., Herman A.G. Gastrointestinal Function Regulation by nitrergic Efferent Nerves // Pharmacol Rev. – 2005. -Vol. 57, No. 3. – P. :315–338

Дробинская О.В., Максимович Я.С., Остапченко Л.И. Влияние ингибиторов оксида азота на процессы изъязвления // Ученые записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского. - 2007. - Серия «Биология, химия». – Т. 20 (59), № 1. – С. 151-156.

Исследовано влияние ингибиторов синтеза оксида азота на процессы изъязвления, вызванного серотонином. Показано, что введение серотонина вызывает увеличение активности синтазы оксида азота на 85% по сравнению с контролем. Использование неселективного ингибитора NO-синтазы L-NAME (2,5мг/кг) ведет к снижению активности фермента на 26% в сравнении с серотониновой моделью язвы. При этом не было зарегистрировано язв, и отмечено уменьшение количества эрозий и их длины. Селективный ингибитор индуцибельной формы NO-синтазы амингуанидин в дозе 20 мг/кг не имел сильного влияния на активность фермента, но усиливал повреждения слизистой. Использование селективного ингибитора нейрональной формы NO-синтазы 7-нитроиндазола вызывало снижение активности фермента к контрольному уровню. Через 2 часа после введения 7-нитроиндазола образование язв, кровоизлияний и эрозий не наблюдалось.

Ключевые слова: оксид азота, изъязвление.

Drobinska O., Maksymovych I., Ostapchenko L. Effects of inhibitors of nitric oxide on process of ulceration // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V.I. Vernadskogo. Series "Biology, chemistry". – 2007. – Vol. 20 (59), № 1. – P. 151-156.

Effects of inhibitors of nitric oxide synthesis on processes of ulceration induced by serotonin were studied. Serotonin provoked damages of gastric mucosa in 2 h after serotonin administration. The NOS activity increased by 85% in comparison with control animals. Usage of aminoguanidine resulted in significant enlargement of the ulcers and hemorrhages areas. NOS activity didn't differ from that after the serotonin administration. L-NAME treatment inhibited NOS activity by 25, and prevented ulcers and hemorrhages formation, but increased the hemorrhages area. 7-nitroindazole administration decreased NOS activity to control level and prevented ulcer injuries.

Keywords: nitric oxide, ulceration.