

УДК 616.33+616.345)-018.73-092:612.015.111]:577.164.2

© Колектив авторів, 2012.

ВПЛИВ ВІТАМІНУ С НА МЕХАНІЗМИ ЦИТОПРОТЕКЦІЇ ТА АКТИВНІСТЬ NO-СИНТАЗ У СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ШЛУНКА ТА ТОВСТОЇ КИШКИ У ЩУРІВ ЗА УМОВИ АДРЕНАЛІН-ІНДУКОВАНОГО СТРЕСУ

В.С. Журомський, Н.Б. Панасюк, І.С. Фоменко, Т.І. Бондарчук, О.Я. Склярів

Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького, кафедра біохімії (зав. –проф. О.Я. Склярів), м. Львів.

ACTION OF VITAMIN C UPON THE MECHANISMS OF CYTOPROTECTION AND ACTIVITY OF NO-SYNTASES IN GASTRIC MUCOSA AND MUCOUS MEMBRANE OF LARGE INTESTINE OF RATS UNDER THE CONDITION OF ADRENALIN-INDUCED STRESS

V.S. Zhuromskiy, N.B. Panasyuk, I.S. Fomenko, T.I. Bondarchuk, A.Ya. Sklyarov

SUMMARY

In investigations on rats the impact of vitamin C administered alone and on the background of iNOS blockade on parameters of the system L-Arginine/NO-synthases /NO in the gastric mucosa and the mucosal membrane of large intestine under conditions of epinephrine-induced stress was studied. It was shown, that vitamin C exerted cytoprotective effect, in stress possessed cytoprotective action, inhibited the activity of iNOS, decreased the level of nitrite-anion, tiobarbituric acid products and superoxide dismutase activity.

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА С НА МЕХАНИЗМЫ ЦИТОПРОТЕКЦИИ И АКТИВНОСТЬ NO-СИНТАЗ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА И ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС В УСЛОВИЯХ АДРЕНАЛИН-ИНДУЦИРОВАННОГО СТРЕССА

В.С. Журомский, Н.Б. Панасюк, И.С. Фоменко, Т.И. Бондарчук, А.Я. Склярів

РЕЗЮМЕ

В экспериментах на крысах изучали самостоятельное влияние витамина С и его действие при блокировании iNOS в условиях адреналин-индуцированного стресса на систему L-аргинин/NO-синтазы/NO в слизистой оболочке желудка и толстой кишки. Показано, что витамин С в этих условиях оказывает цитопротекторное действие, ингибирует активность iNOS, снижает содержание нитрит-аниона в исследуемых тканях.

Ключові слова: шлунок, товста кишка, вітамін С, стрес, NO-синтази, нітрогену оксид, L-аргінін.

Напружений соціально-економічний стан суспільства сприяє зростанню частоти захворювань системи травлення взагалі та виразкових уражень травного тракту зокрема. У розвитку метаболічних порушень при цьому значне місце посідає система L-аргінин/NO-синтази/нітрогену оксид (NO), між якими відзначається тісний зв'язок. За фізіологічних умов у слизовій оболонці шлунка (СОШ) та товстої кишки (СОТК) експресуються конститутивні форми NO-синтаз (NOS) – нейрональна (nNOS) та ендотеліальна (eNOS); вони продукують незначну кількість NO, який бере участь у підтриманні кровоплину, процесах транспорту води та електролітів тощо [12]. Під час розвитку запальних процесів і деструктивних ушкоджень у слизовій оболонці (СО) травного тракту різко зростає експресія індукцйбельної NOS (iNOS) у макрофагах, нейтрофілах, епітеліоцитах та ендотеліоцитах та продукція NO, взаємодія якого з супероксидним радикалом призводить до утворення цитотоксичної речовини – пероксинітриду, яка нітрозилує тирозинові залишки багатьох протеїнів, супероксиддисмутази та інших мідь-вмісних ензимів

[4, 8]. Стрес є одним з факторів, що активує розвиток оксидативних процесів, змінює стан компонентів антиоксидантного захисту, вміст вітамінів (у тому числі, вітаміну С) у СО травного тракту. З сучасних літературних джерел відомо, що вітамін С (віт. С) бере участь у протективних механізмах СОШ: інгібує синтез ПГЕ₂, не впливаючи при цьому на експресію циклооксигенази-2 (ЦОГ-2) в інфікованих *Helicobacter pylori* у тварин; зменшує рівень прозапальних цитокінів; взаємодіючи з відновленим глутатионом або вітаміном Е, зв'язує супероксидний радикал, пероксид гідрогену, гідроксильний радикал, синглетний кисень, гіпохлоридну кислоту, пероксинітрид [9]. Стосовно впливу віт. С на показники NOS-системи за умов виразкових ушкоджень СО травного тракту дані літератури є суперечливими, переважають дослідження, які були проведені на СОШ.

Метою нашої роботи було вивчення впливу віт. С на активність NO-синтазної системи та вміст NO в СОШ і СОТК, концентрацію L-аргінину в плазмі крові за умов блокування iNOS аміногуанідином при адреналін-індукованому стресі (АІС) у щурів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проведені на 52 статевозрілих щурах-самцях масою 180 – 240 г згідно з міжнародними умовами проведення експериментів на лабораторних тваринах. Щурі утримувались на стандартному раціоні віварію. У день проведення досліду тварин не годували, забезпечуючи безперешкодний доступ до води.

Стрес моделювали шляхом введення адреналіну в дозі 2 мг/кг внутрішньоочеревино натще [2]. Віт. С вводили внутрішньом'язево в дозі 200 мг/кг самостійно, а також на тлі інгібування активності іNOS селективним блокаторм аміногуанідином (внутрішньоочеревино, 20 мг/кг). Препарати вводились за півгодини до введення адреналіну. Через 24 години після введення адреналіну тварин під уретановим (1,1 мг/кг) знечуленням декапітували та проводили розтин по білій лінії живота. Шлунок розтинали по великій кривині, а товсту кишку (ділянку від сліпої до прямої) – вздовж; досліджувані органи промивали фізіологічним розчином і при транслюмінаційному освітленні оцінювали макроскопічно ступінь структурно-геморагічних ушкоджень (СГУ), після чого брали тканину для

гістологічного дослідження. Мікрофотографії отримано за допомогою цифрової фотокамери Olympus C-5050 Zoom та мікроскопа Olympus BX-41 (збільшення Ч 150-320). СОШ та СОТК гомогенізували і визначали відповідні показники.

Для оцінки системи L-аргінін/NO-синтази/ NO у гомогенатах СОШ та СОТК визначали активність NO-синтаз [3]; вміст NO [5], концентрацію L-аргініну в плазмі крові [1]. Результати опрацьовано за методом варіаційної статистики з використанням програмного забезпечення ANOVA з визначенням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Введення адреналіну викликало розвиток СГУ СОШ у вигляді масивних і крапкових крововиливів, ерозій і виразок, площа яких становила $46,4 \pm 5,45 \text{ мм}^2$; виражених макроскопічних ушкоджень СОТК не спостерігалось (рис. 1. А). Однак, при гістологічному аналізі помітні структурні ушкодження як СОШ, так і СОТК (меншою мірою): спостерігалось локальне порушення цілісності слизового бар'єру, набряк, відшарування епітелію та десквамація епітеліоцитів (рис. 1. Б, В). Структура крипт і міжклітинного простору СОТК при цьому не змінювалась.

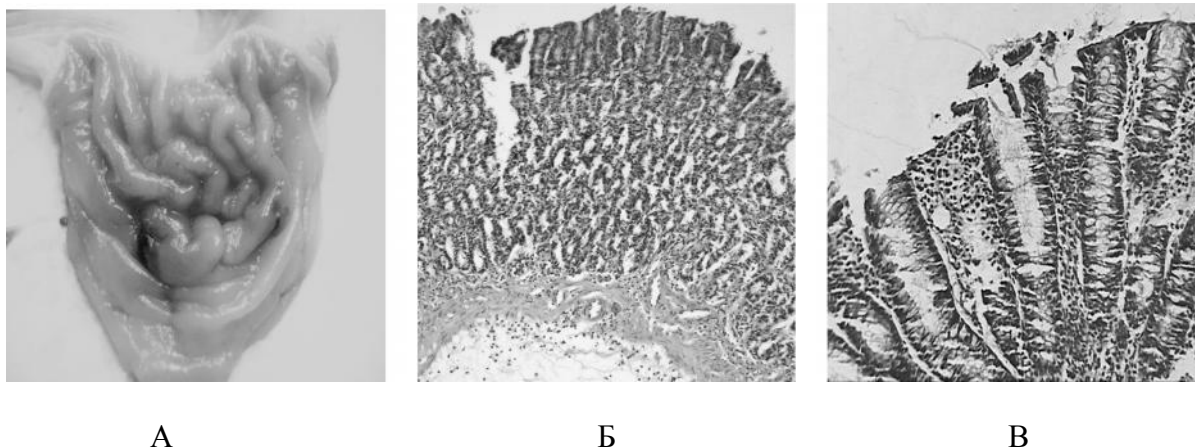


Рис. 1. Зміни СОШ і СОТК за умов дії адреналіну: А – макроскопічні зміни СОШ; Б – гістологічні зміни СОШ; В – гістологічні зміни СОТК (збільшення x 300)

Введення віт. С при АІС СОШ викликало зниження на 65% ($p < 0,05$) площі деструктивних змін, які становили 16 мм^2 . Зменшення деструктивних ушкоджень СОТК гістологічно підтверджувалось збереженням структури більшої площі поверхневого епітеліального бар'єру. За цих умов відзначалось чотирикратне зростання активності загальної NOS ($p < 0,01$), при цьому відзначено різке, в 11 разів ($p < 0,01$) підвищення активності іNOS, активність сNOS підвищувалась у 1,5 рази порівняно з інтактними тваринами (табл. 1). Вміст NO в СОШ зростав на 75% ($p < 0,01$), тоді як концентрація L-аргініну в плазмі крові внаслідок потужної активації іNOS у СОШ

знижувалась на 33 % ($p < 0,05$). АІС у СОТК теж спричинював підвищення загальної активності NOS на 54 % ($p < 0,05$), при цьому в 5 разів ($p < 0,01$) зростала активність іNOS, тоді як активність сNOS майже не змінювалась. Вміст NO у СОТК зростав на 55% ($p < 0,05$). Отже, ульцерогенна дія адреналіну викликала суттєві СГУ, які більшою мірою виникали в СО тіла та пілоричної частини шлунка, тоді як у СОТК торкались лише поверхневих епітеліоцитів. Проте біохімічні зміни у СО досліджуваних органів проявлялись значним зростанням активності іNOS та вмісту нітрит-аніону, а також зменшенням концентрації L-аргініну в плазмі крові. Отримані нами

Таблиця 1

Вплив віт. С на активність NO-синтаз, вміст NO у СОШ і СОТК і концентрацію L- аргініну в плазмі крові за умов блокування iNOS при АІС

Серії досліджень	NOS (нмоль/хв×мг)	iNOS (нмоль/хв×мг)	cNOS (нмоль/хв×мг)	NO (мкмоль/л)	L-аргінін (мкг/мл)
	СОШ/СОТК	СОШ/СОТК	СОШ/СОТК	СОШ/СОТК	Плазма
Інтактні тварини	0,545±0,2 / 0,922±0,1	0,145±0,1 / 0,235±0,1	0,4±0,1 / 0,687±0,1	15,3±2,7 / 15,8±2,01	42,9±10,2
Вплив адреналіну	1,995±0,5 / 1,79±0,3	1,42±0,4 / 1,21±0,2	0,573±0,2 / 0,585±0,12	26,7±1,1 / 24,5±1,3	28,8±2,7
Вплив віт. С на тлі адреналіну	1,39±0,2 / 1,46±0,2	0,763±0,3 / 0,624±0,3	0,64±0,2 / 0,900±0,3	20,5±1,6 / 18,3±1,3	59,7±7,8
Блокування iNOS на тлі адреналіну	0,861±0,04 / 1,59±0,2	0,502±0,08 / 0,682±0,2	0,372±0,02 / 0,586±2,9	13,33±4,93/ 22,3±1,1	45,7±9,8
Дія віт. С на тлі блокування iNOS при дії адреналіну	1,29±0,19 1,54±0,5	0,69±0,16 0,697±0,2	0,6±0,14 / 0,852±0,3	15,78±2,59 / 16,4±1,6	66,39±6,7

результати свідчать про те, що зростання активності iNOS і, відповідно, NO та пероксинітриду є одними з ключових чинників розвитку деструктивних ушкоджень СОШ при стресі, а локальне порушення слизового бар'єру є однією з причин подальшого розвитку запального процесу [10].

Введення віт. С при АІС у СОШ зменшувало активність загальної NOS на 36 % ($p < 0,05$), активність iNOS – на 51 % ($p < 0,05$), тоді як активність cNOS достовірно не змінювалась. Вміст NO зменшився на 23 % ($p < 0,05$), а концентрація L-аргініну в плазмі крові підвищилась вдвічі ($p < 0,05$) порівняно з самостійним впливом адреналіну. У СОТК введення віт. С на тлі дії адреналіну дещо відрізнялося від такого в СОШ: загальна активність NOS знижувалася незначно (на 18 %), активність iNOS – на 48 % ($p < 0,05$), проте активність cNOS зростала на 54 %. Вміст NO зменшився на 25 % ($p < 0,05$). Отримані результати свідчать про протективну дію віт. С як у СОШ, так і в СОТК, яка проявлялася зниженням (порівняно з показниками АІС) загальної активності NOS і iNOS, зменшенням вмісту NO і, відповідно, пероксинітриду та зростанням концентрації L-аргініну в плазмі крові. Зменшення активності iNOS при дії віт. С може бути обумовлене як зниженням інфільтрації нейтрофілів у СО та зменшенням продукції ними інтерлейкінів і пероксинітриду, так і біодоступністю L-аргініну клітинами СО, його впливом на ядерний фактор (NF- κ B), а також блокуванням біосинтезу ЦОГ-2 [11].

Блокування iNOS аміногуанідіном при АІС призводило до зменшення активності iNOS на 35 % у СОШ та на 44 % – у СОТК (порівняно з самостійною дією адреналіну), активність cNOS суттєво (на 65 %) знижувалася в СОШ, тоді як у СОТК практично не змінювалась, вміст NO зменшувався на 50 % і 16 % відповідно. Концентрація L-аргініну при цьому зростала у понад 1,5 рази. При дослідженні ролі NOS

в експериментах на тваринах часто застосовують їх інгібування неселективними інгібіторами (L-NMMA, L-NAME, L-NNA) або селективними блокаторами (аміногуанідин, 1400 W, GW273629). Результати попередніх досліджень виявили неоднозначність їх впливу при виразкових ушкодженнях СОШ і СОТК. Так, неселективний блокатор L-NAME за умов ульцерогенного коліту знижував рівень оксидантів, що посилювало деструктивні зміни [7]. З іншого боку, при інгібуванні iNOS селективним блокатором 1400W відбувалося зменшення набряку та на 68% знижувалася інфільтрація нейтрофілами, на 26 % зменшувалася площа структурних ушкоджень СО. У наших дослідженнях введення селективного інгібітора iNOS аміногуанідину зумовлювало активування цитопротективних механізмів і супроводжувалось суттєвим зниженням активності iNOS у СОШ і СОТК з відповідним зниженням концентрації NO у досліджуваних тканинах і зростанням вмісту L-аргініну у плазмі крові.

Введення віт. С на тлі блокування iNOS при АІС практично не змінювало активності загальної NOS та її ізоформ у досліджуваних тканинах порівняно з показниками при введенні віт. С на тлі АІС. При цьому вміст NO в СОШ знижувався на 24 %, а концентрація L-аргініну в плазмі крові зростала незначно.

Відомо, що вплив віт. С на активність NOS може включати різні механізми: блокування транспорту L-аргініну у клітини, що пов'язано з участю транспортного білка CAT-2; впливом на структурні компоненти NOS – тетрагідрооптерин, кальмодулін, НАДН⁺; не можна виключити вплив віт. С (або його похідних) на регуляцію mRNA NO-синтази; інгібування синтезу прозапальних інтерлейкінів; відновлення N-нітрозокомпонентів; модулювання проліферації клітин та індукування апоптозу [6]. На культурі ендотеліальних клітин було показано, що віт.

С не впливав на експресію iNOS або eNOS, однак він значно підвищував активність iNOS та cNOS, що пов'язують з його протективним ефектом по відношенню до BH_4 та стабілізацію BH_4 [13]. У наших дослідження показано, що введення віт. С на тлі інгібування активності iNOS аміногуанідином при АІС призводило до зростання цитопротективних процесів як у СОШ, так і в СОТК, проте очевидно, що саме дія віт. С є домінуючою в регуляції активності NOS на тлі інгібування iNOS аміногуанідином. Останнє може бути обумовлено впливом віт. С на певний спільний компонент сигнальної системи або пов'язано з безпосереднім інгібуванням активності iNOS.

ВИСНОВКИ

1. Введення адреналіну викликало розвиток СГУ у СОШ, тоді як виражених макроскопічних ушкоджень СОТК не спостерігалось, проте гістологічні дослідження виявили суттєві зміни як у СОШ, так і у СОТК (меншою мірою). За таких умов зміни біохімічних показників були односпрямованими в обидвох тканинах і проявлялись значним зростанням активності загальної NOS, головним чином, за рахунок iNOS, активність якої зростала в 11 разів у СОШ та в 5 разів у СОТК, з паралельним зростанням вмісту NO та зниженням концентрації L-аргініну в плазмі крові на 33 %.

2. Дія віт. С спричинювала морфологічно та гістологічно підтвержене зниження деструктивних змін, викликаних адреналіном. За таких умов активність загальної NOS знижувалась на 36 % у СОШ та на 18 % у СОТК, активність iNOS зменшувалась на 51 % та на 48 % відповідно. Паралельно зменшився вміст NO на 23% в СОШ та 25 % у СОТК, вдвічі зростала концентрація L-аргініну в плазмі крові порівняно з самостійним впливом адреналіну. Така цитопротективна дія віт. С в СОШ та СОТК може бути обумовлена його антиоксидантними властивостями та безпосереднім впливом на активність NOS.

3. Введення аміногуанідину при дії адреналіну суттєво (на 35 % у СОШ та 44 % – у СОТК) зменшувало активність iNOS порівняно з самостійною дією адреналіну, тоді як зміни активності cNOS були різноспрямованими – у СОШ спостерігали її суттєве (на 65 %) зниження, тоді як у СОТК вона практично не змінювалася. Вміст NO за таких умов зменшувався на 50 % у СОШ та 16 % – у СОТК, при цьому концентрація L-аргініну зростала в понад 1,5 рази. Селективне інгібування iNOS аміногуанідином чинило значну цитопротективну дію, що доводить суттєву роль системи L-Аргінін/NOS/NO у розвитку метаболічних змін за умов АІС.

4. Введення віт. С на тлі блокування iNOS при АІС зумовлювало зміни NO-синтазної системи, які

достовірно не відрізнялись від таких при самостійному введенні віт. С за аналогічних умов, що доводить домінуючу роль віт. С у регуляції активності NO-синтаз та цитопротективній дії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Алейникова Т. Л., Рубцова Г. В. Руководство к практическим занятиям по биохимии // М.: Высшая школа. – 1988. – 239 с.
2. Белостоцкий Н. И. Язвобразование в слизистой оболочке желудка крыс под влиянием катехоламинов / Н. И. Белостоцкий // Патологическая физиология и экспериментальная медицина. – 1988. – № 1. – С. 24 – 27.
3. 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.
4. Скляр О. Я. Роль NO-синтазної системи та процесів ліпопероксидації в цитопротекторних механізмах за умов ульцерогенного коліту / О.Я. Скляр, Н.Б. Панасюк, О.Р. Джура // Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. – 2009. – № 1. – С. 38 – 45.
5. Alderton W. K., Cooper C. E. and Knowles R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition // Biochem. J. – 2001. – Vol 357. – P. 593 – 615.
6. Amino acids and immune function / Li P., Yin Y. L., Li D. [et al.] // Brit. J. Nutr. – 2007. – Vol. 98, № 2. – P. 237 – 252.
7. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease / Wu G., Bazer F. W., Davis T. A. [et al.] // Amino Acids. – 2009. – Vol. 37, № 1. – P.153–168.
8. Cho C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders / C. H. Cho // J. Physiol. Paris. – 2001. – Vol. 95, № 1–6. – P. 253 – 256.
9. Das U. N. A radical approach to cancer / U. N. Das // Med. Sci. Monit. – 2002. – Vol. 8, № 4. – P. 79–92.
10. Implications of reactive oxygen species and cytokines in gastroprotection against stress-induced gastric damage by nitric oxide releasing aspirin / Brzozowski T., Konturek P. C., Konturek S. J. [et al.] // Int. J. Colorectal. Dis. – 2003. – Vol. 18, № 4. – P. 320 – 329.
11. Hofseth L. J. Nitric oxide as a target of complementary and alternative medicines to prevent and treat inflammation and cancer / L. J. Hofseth // Cancer Lett. – 2008. – Vol. 268, № 1. – P. 10 – 30.
12. Lanas A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract // Arthritis Research and Therapy. – 2008. – Vol. 10, Suppl 2. – P. 1 – 6.
13. Long-term vitamin C treatment increases vascular tetrahydrobiopterin levels and nitric oxide synthase activity / d'Uscio L. V., Milstien S., Richardson D. [et al.] // Circ. Res. – 2003. – Vol. 92, № 1. – P. 88 – 95.