

УДК 616.348-002-092.9:[616.345-018.73-092:612.015.111

© Колектив авторів, 2012.

ЗМІНИ АКТИВНОСТІ NO-СИНТАЗНОЇ СИСТЕМИ ТА АРГІНАЗИ У СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ТОВСТОЇ КИШКИ ПРИ БЛОКУВАННІ ПРОЗАПАЛЬНИХ ЕНЗИМІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛІТУ

І.С. Фоменко, П.О. Склярів, Н.Б. Панасюк, Л.П. Білецька, О.Я. Склярів

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра біохімії (зав. – д.м.н., проф. О.Я. Склярів), м. Львів.

THE CHANGES OF NO-SYNTHASE AND ARGINASE ACTIVITY IN COLONIC MUCOSA UNDER CONDITIONS OF PROINFLAMMATORY ENZYMES BLOCKAGE IN EXPERIMENTAL COLITIS

I.S. Fomenko, P.O. Sklyarov, N.B. Panasyuk, L.P. Biletska, O.Y. Sklyarov

SUMMARY

The study shows the acute rise of inducible NO-synthase activity, nitrite anion content and lipoperoxidation processes and decreased arginase activity in colonic mucosa under conditions of the ulcerative colitis. The cytoprotective substances, different due to their mechanism of action, decreased the level of inducible NO-synthase activity, nitrite anion content, lipoperoxidation processes but increased arginase activity in colonic mucosa and L-arginine concentration in blood.

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ NO-СИНТАЗНОЙ СИСТЕМЫ И АРГИНАЗЫ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ ПРИ БЛОКИРОВАНИИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЭНЗИМОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЛИТЕ

И.С. Фоменко, П.А. Склярів, Н.Б. Панасюк, Л.П. Билецкая, А.Я. Склярів

РЕЗЮМЕ

В работе показано, что при язвенном колите у крыс резко повышается активность индуцибельной NO-синтазы, содержание нитрит-аниона и процессы липопероксидации, тогда как активность аргиназы снижалась в слизистой оболочке толстой кишки. Разные по механизму действия цитопротекторные вещества на фоне колита снижали уровень активности iNOS, содержание нитрит-аниона, процессы липопероксидации, при этом активность аргиназы повышалась, также увеличивалась концентрация L-аргинина в плазме крови.

Ключові слова: NO-синтазна система, аргіназа, експериментальний коліт.

У регуляції фізіологічних функцій та патофізіологічних механізмах товстої кишки суттєву роль відіграє NO-синтазна система. За фізіологічних умов у СОТК експресуються конститутивні форми NO-синтаз – нейрональна (nNOS) та ендотеліальна (eNOS), які синтезують незначну кількість нітрогену оксиду, що приймає участь у підтриманні відповідного рівня кровоплину, процесах транспорту води та електролітів, бактерицидній дії, процесах міжклітинної комунікації та механізмах нейротрансмісії у ентеральних нейронах [6], тоді як експресія iNOS є незначною [8, 14]. У розвитку виразкових ушкоджень слизової оболонки товстої кишки (СОТК) при виразковому коліті відзначається різке зростання активності прозапальних ензимів – індукцибельної NO-синтази (iNOS), циклооксигенази-2 (ПГЕ2), 5-ліпооксигенази (5-ЛОГ), і, відповідно, продукція нітрогену оксиду, простагландинів групи E2 та лейкотрієнів (лейкотрієну B₄) [7, 15]. Одночасно підвищується активність процесів ліпопероксидації [12]. Взаємодія нітрогену оксиду з супероксидним радикалом призводить до утворення цитотоксичної речовини – пероксинітриду, яка нітрозилує тирозинові залишки багатьох протеїнів,

супероксиддисмутази та інших мідь-вміщуючих протеїнів [11].

Паралельно з NO-синтазами L-аргінін метаболізується аргіназою з утворенням сечовини та орнітину, з останнього синтезуються поліаміни та пролін, які за умов виразкового коліту проявляють цитопротекторну дію [13].

Враховуючи те, що активація iNOS є ключовим фактором у розвитку запального процесу, метою роботи було визначення впливу різних за механізмом дії цитопротекторних речовин на активність NO-синтазної системи, аргінази та процесів ліпопероксидації за умов експериментального коліту.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проведені на 68 щурах згідно міжнародних умов проведення експериментів з лабораторними тваринами. Щурі утримувались на стандартному раціоні віварію, при проведенні досліду тварин брали натщесерце, забезпечуючи безперешкодний доступ до води.

Було проведено 6 серій досліджень: у першій серії тваринам моделювали виразкові ушкодження СОТК шляхом перректального введення 4% оцтової кислоти

[5]; тваринам другої групи вводили аміногуанідин (20 мг/кг) - блокатор iNOS; тваринам третьої групи - цеlexоксиб (10 мг/кг) – блокатор ЦОГ-2; тваринам четвертої групи - L-аргінін (100 мг/кг); тваринам п'ятої групи - блокатор ЦОГ-2/5-ЛОГ речовину 2-аміно-5-(3,5-дитертбутил-4-гідроксибензиліден)-тіазол-4-один (2A5DHT) (10 мг/кг), яка є структурним аналогом препарату “Дарбуфелон”; тваринам шостої групи - 2-гідрокси-4-{4-[5-(2-метил-3-фенілаліліден)-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл]-бутириламіно} - бензойна кислота (10 мг/кг) (Les-4408). Речовини вводились перорально за 15 хвилин до моделювання коліту.

Препарати 3,5-дитертбутил-4-гідроксибензиліден)-тіазол-4-один та -{4-[5-(2-метил-3-фенілаліліден)-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл]-бутириламіно} - бензойна кислота синтезовані на кафедрі фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького проф. Лесиком Р.Б.

Забір матеріалу для досліджень проводили під уретановим знечуженням (1,1 мг/кг). Активність NO-синтаз у СОТК визначали за методом [3]; вміст нітрит-аніону за методом [10], активність аргінази за [9], оцінку процесів ліпопероксидації оцінювали за вмістом продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-

активних продуктів) [4], концентрацію L-аргінину в плазмі крові визначали за методом [1].

Результати оброблено за методом варіаційної статистики з використанням програмного забезпечення ANOVA з визначенням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У тварин контрольної групи активність cNOS у СОТК $0,606 \pm 0,14$ нмоль/хв·мг, iNOS - $0,24 \pm 0,088$ нмоль/хв·мг, активність аргінази - $0,32 \pm 0,05$ мкмоль/хв·мг, що відповідає результатам отриманим іншими авторами [2]. Вміст нітрит-аніону був $15,4 \pm 1,5$ мкмоль/л, ТБК-активних продуктів - $253 \pm 14,2$ мкмоль/г·тк.

При виразковому коліті рівень активності cNOS майже не змінювався, тоді як активність iNOS різко зростала - у 6,4 рази ($p < 0,01$), активність аргінази зменшилась на 32%, вміст нітрит-аніону підвищувався на 69% ($p < 0,05$), вміст ТБК-активних продуктів зростав на 68% ($p < 0,05$) у СОТК; концентрація L-аргінину у плазмі крові зменшилась на 53% ($p < 0,05$) (табл. 1). Отримані результати свідчать, що за умов виразкового коліту різке зростання активності iNOS призводить до зниження рівня активності аргінази у СОТК та концентрації L-аргінину у плазмі крові, що супроводжується підвищенням рівня процесів ліпопероксидації та синтезом нітрит-аніону.

Таблиця 1

Активність NO-синтаз, аргінази, вміст нітрит-аніону у СОТК та концентрація L-аргінину у плазмі крові за умов дії різних за механізмом цитопротекторних речовин

Серії досліджень	iNOS нмоль/хв·мг	eNOS нмоль/хв·мг	Нітрит-аніон мкмоль/г	L-аргінін мкг/мл	Аргіназа мкмоль/хв·мг
Контроль	$0,24 \pm 0,088$	$0,61 \pm 0,1$	$15,4 \pm 1,5$	$38,2 \pm 8,4$	$0,32 \pm 0,05$
Коліт	$1,53 \pm 0,27^*$	$0,71 \pm 0,21$	$26 \pm 2,1^*$	$18,1 \pm 2,6^*$	$0,19 \pm 0,063^{\#}$
L-аргінін + коліт	$0,55 \pm 0,07^{\#}$	$0,47 \pm 0,11$	$18,25 \pm 1,5^{\#}$	$32,1 \pm 3,4^{\#}$	$0,26 \pm 0,04$
Аміногуанідин + коліт	$0,85 \pm 0,27^{\#}$	$0,6 \pm 0,14$	$19,2 \pm 0,83$	$24,4 \pm 3,2^{\#}$	$0,23 \pm 0,035$
Целекоксиб + коліт	$1,14 \pm 0,2$	$0,47 \pm 0,05$	$19,8 \pm 1,6$	$21,9 \pm 1,8$	$0,24 \pm 0,047$
2A5DHT + коліт	$0,92 \pm 0,18^{\#}$	$0,42 \pm 0,1$	$18,6 \pm 1,5^{\#}$	$26,6 \pm 1$	$0,22 \pm 0,04$
Les-4408 + коліт	$1,07 \pm 0,19^{\#}$	$0,40 \pm 0,03$	$18,4 \pm 1,3^{\#}$	$25,3 \pm 2,5$	$0,29 \pm 0,015$

Примітка: * - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками контрольної групи тварин; # - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками за умов коліту.

Самостійне блокування iNOS аміногуанідином зменшувало активність iNOS (на 44%, $p < 0,05$), при цьому знижувався вміст нітрит-аніону (26%, $p < 0,05$) та ТБК-активних продуктів (12%, $p < 0,05$), активність аргінази мала тенденцію до зростання у СОТК, у плазмі крові зростала концентрація L-аргінину (на 34%). Таким чином, блокування iNOS аміногуанідином спричиняло виражене зменшення активності рівня активності iNOS, відповідно знижувався вміст нітрит-аніону, дещо зростала активність аргінази у СОТК та зростала концентрація L-аргінину у плазмі крові.

Введення L-аргінину на фоні ульцерогенного коліту призводило до зменшення: рівня активності iNOS - на 63% ($p < 0,05$), вмісту нітрит-аніону - на 34% ($p < 0,05$), активність аргінази зростала (на 25%) у СОТК; концентрація L-аргінину у плазмі крові підвищилась на (77%, $p < 0,05$) у порівнянні з показниками коліту.

Порівнюючи ступінь блокування iNOS при введенні селективного блокатора ЦОГ-2 целекоксибу та речовини 2A5DHT - блокатора ЦОГ-2/5-ЛОГ, слід відзначити більш виражений гальмівний вплив на

активність iNOS речовини 2A5DHT.

Гальмівний вплив на активність iNOS та процеси ліпопероксидації спричиняє речовина {4-[5-(2-метил-3-фенілаліліден)-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл]-бутириламін} - бензойна кислота, яка має антиоксидантні властивості і гальмує рівень активності iNOS на 30%.

ВИСНОВКИ

Речовини, різні за механізмом цитопротекторної дії, селективний блокатор iNOS аміногуанідин; селективний блокатор ЦОГ-2 целекоксиб, субстрат для NO-синтази та аргінази L-аргінін, блокатор ЦОГ-2/5-ЛОГ - 2-аміно-5-(3,5-дитертбутил-4-гідроксибензиліден)-тіазол-4-один (2A5DHT) та 2-гідрокси-4-{4-[5-(2-метил-3-фенілаліліден)-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл]-бутириламін} - бензойна кислота у різній ступені знижували рівень активності iNOS, вміст нітрит-аніону, процеси ліпопероксидації, однак при цьому підвищувалась активність аргінази у СОТК та концентрація L-аргініну у плазмі крові за умов експериментального коліту. Найбільш виражений гальмівний вплив на рівень активності iNOS та процеси ліпопероксидації спричиняла дія екзогенно введеного L-аргініну. Поєднане блокування ЦОГ-2/5-ЛОГ було вираженішим за ефект дії селективного блокатора ЦОГ-2 целекоксибу. Похідний тіазолідонів - {4-[5-(2-метил-3-фенілаліліден)-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-3-іл]-бутириламін} - бензойна кислота викликає виражене зниження рівня активності iNOS та процесів ліпопероксидації за умов експериментального коліту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Руководство к практическим занятиям по биохимии / Т.Л. Алейникова, Г.В.Рубцева, Н.А. Павлова. – М. : Медицина, 2000. – 128 с.
2. 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.
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. И.М -2000. - №3. - С.3-7.
4. Тимурбулатов М.А. Метод повышения свободнорадикального окисления липидсодержащих

компонентов крови и его диагностическое значение / М.А. Тимурбулатов, Е.И Селезнев. // Лабораторное дело. - 1981. - N 4. - С. 209-211.

5. Acute experimental colitis decreases colonic circular smooth muscle contractility in rats/ Myers B.S., Martin J. S., Dempsey D. T. [et al.] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 1997. – Vol. 273. – P. 928-936.

6. Changes in distribution of three isoforms of nitric oxide synthase in ulcerative colitis./ Vento P., Kiviluoto T., Jdrvinen H.J. [et al.] // Scand. J. Gastroenterol. – 2001. – Vol. 36. – N 2. – P. 180-189.

7. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease./ Singer I.I., Kawka D.W., Schloemann S. [et al.] // Gastroenterology. – 1998. – Vol.115. – N 2. – P. 297-306.

8. Effect of melatonin on the expression of iNOS and COX-2 in the rat models of colitis/ Dong W.G., Mei Q., Yu J.P. [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2003. – Vol. 9. – N 6. – P. 1307-1311.

9. Geyer J.W., Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. // Anal. Biochem. – 1971.- Vol. 39. – N 2. – P. 412-417.

10. 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.

11. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants./ Kruidenier L., Kuiper I., Lamers C.B. [et al.] // J. Pathol. – 2003. – Vol. 201. – N 1. – P. 28-36.

12. Pravda J. Radical induction theory of ulcerative colitis. // World J. Gastroenterol. – 2005. – Vol.11. – N 16. – P. 2371-2384.

13. Protective role of arginase in a mouse model of colitis./ Gobert A.P., Cheng Y., Akhtar M. [et al.] // J. Immunol. – 2004. – Vol. 173. – N 3. - P. 2109-2117.

14. The physiological expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human colon / Roberts P.J., Riley G.P., Morgan K. [et al.] // J. Clin. Pathol. – 2001. – Vol. 54. – N 4. – P. 293-297.

15. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs / J. Martel-Pelletier, D. Lajeunesse, P. Reboul [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2003. – Vol. 62. – P. 501-509.