

УДК 612.014.484+616.348-002): 612.015.11:615.356]-08

© В.Ю.Ємельяненко, Н.Б.Панасюк, О.Я. Склярів, 2013.

СТРЕС ЗМІНЮЄ АКТИВНІСТЬ NO-ЕРГІЧНОЇ СИСТЕМИ У М'ЯЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ТОВСТІЙ КИШКИ

В.Ю. Ємельяненко, Н.Б. Панасюк, О.Я. Склярів

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

STRESS CHANGES THE ACTIVITY OF NO-ERGIC SYSTEM IN THE MUSCULAR LAYER OF THE COLON

V.Y. Yemelyanenko, N.B. Panasyuk, O.Y. Sklyarov

SUMMARY

Stress is one of the factors, causing inflammation in the colon, promotes the development of ulcerative colitis in experimental animals and humans and worsens its course. The change of the motor-evacuating function of the digestive organs is one of the manifestations of the impact of stress. The mechanism of effect of stress is associated with the emergence of hypoxia due to vasoconstriction, changes in the activity of central and enteral neurons, increase of the lipid peroxidation processes, activation of NO-synthase and production of nitrogen oxide, that cause dysmotility of the colon.

СТРЕСС ИЗМЕНЯЕТ АКТИВНОСТЬ NO-ЭРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В МЫШЕЧНОЙ ОБОЛОЧКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ

В.Ю. Емельяненко, Н.Б. Панасюк, О.Я. Склярів

РЕЗЮМЕ

В работе показано, что разные виды стресса (водно-имобилизационный, адреналин-индуцированный), а также экспериментальный колит вызывают увеличение активности индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и процессов липопероксидации в мышечной оболочке толстой кишки, что может приводить к нарушению ее моторно-эвакуаторной функции.

Ключові слова: NO-синтаза, стрес, експериментальний коліт, процеси ліпопероксидації.

Стрес є одним з факторів, що викликає запалення у товстій кишці, сприяє розвитку виразкового коліту у експериментальних тварин та людей і погіршує його перебіг [13]. Одним з проявів впливу стресу є зміна моторно-евакуаторної функції органів травлення. Показано, що за умов гострого або короткочасного стресу відбувається гальмування евакуації з шлунку та активація транзиту по товстій кишці. Ці зміни моторики відіграють роль у механізмах розвитку диспепсичних явищ та зміни частоти стільця у пацієнтів зі стрес-індукованими функціональними розладами травної системи [6, 18].

Дія стресу виникає гіпоксію, внаслідок вазоконстрикції, зростання процесів ліпопероксидації, посилення інфільтрації слизової оболонки товстої кишки (СОТК) лейкоцитами, що викликає її деструктивні uszkodження та порушує моторику [19].

У підтримці морфо-функціонального стану товстої кишки приймає участь система L-аргінін/NO-синтази/нітрогену оксид. За фізіологічних умов у товстій кишці експресуються конститутивні ізоформи NO-синтаз (cNOS) – нейрональна (nNOS) та ендотеліальна (eNOS), які продукують незначну кількість нітрогену оксиду, що приймає участь у підтриманні відповідного рівня кровоплини, процесах транспорту води та електролітів, бактеріцидній

дії по відношенню до мікроорганізмів, у випадку їх попадання у слизову оболонку, процесах міжклітинної комунікації та процесах нейротрансмісії у ентєральних нейронах, регуляції моторики [7]. Тоді як експерсія індукібельної NO-синтази (iNOS) є незначною [9]. Гіпоксія та зростання проникливості слизового бар'єру СОТК призводять до різкого зростання експресії iNOS та продукції нітрогену оксиду, а також значно посилюються процеси ліпопероксидації, що викликає порушення моторики товстої кишки [14].

Зміни NO-ергічної системи та процеси ліпопероксидації у м'язевій оболонці товстої кишки (МОТК) за умов різних видів стресу та при одночасній дії стресу на тлі експериментального коліту вивчено недостатньо.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проводили на 54 білих щурах масою 180–250 г, згідно з вимогами етики, передбаченими положеннями Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин.

Тварини перебували у віварії за відповідних умов освітлення, температурного режиму та стандартного раціону. Перед проведенням досліджень вони мали вільний доступ до води впродовж 20 год.

Моделювали стресу проводили двома шляхами:

перший - водно-іммобілізаційний стрес (ВІС), тривалістю трьох та п'яти годин [10]; другий - застосовуючи введення адреналіну (2 мг/кг, дочеревно) [2]. Коліт викликали шляхом введення одного мілілітра 4% оцтової кислоти у товсту кишку за методом [5]. На тлі знеболювання тіопенталом натрію (40 мг/кг) у тварин виділяли товсту кишку, механічно відділяли м'язову оболонку, яку у подальшому гомогенізували.

Дослідні тварини були поділені на чотири експериментальні групи: перша (контрольна) - тваринам вводили 0,1 мл 0,9% розчину натрію хлориду інтраперитонеально (n = 10); друга - тварини, які були під дією ВІС протягом 3 годин (n = 8); третя - тварини, які були під дією ВІС протягом 5 годин (n = 8); четверта - тварини, яким моделювали вплив стресу шляхом введення адреналіну (n = 10); п'ята - тварини, яким моделювали коліт (n=10); шоста - тварини з адреналін-індукованим стресом (АІС) та

колітом (n = 8).

Для оцінки системи L-аргінін/NO-синтази/нітрогену оксид у гомогенатах МОТК визначали активність NO-синтаз за методом [3]; вміст нітрит-аніону за допомогою реактиву Грісса [11]. Для оцінки процесів ліпопероксидації визначали вміст ТБК-активних продуктів [4]. Концентрацію L-аргініну у плазмі крові визначали за [1]. Статистичну обробку експериментальних результатів проводили з використанням прикладної програми ANOVA "Statistica". Статистично достовірними вважали розбіжності при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У МОТК інтактних тварин домінувала активність cNOS ($0,326 \pm 0,09$ нмоль/хв•г), тоді як рівень активності iNOS був незначним ($0,175 \pm 0,04$ нмоль/хв•г). Вміст нітрит-аніону складав $16,5 \pm 1,17$ мкмоль/л (табл. 1).

Таблиця 1

Зміни активності NO-синтаз, вмісту нітрит-аніону та ТБК-активних продуктів у гомогенаті м'язової оболонки товстої кишки за умов ВІС- і адреналін-індукованого стресу, коліту та дії стресу на тлі коліту

Серії дослідів	ТБК-активні продукти мкмоль/г•тк	cNOS нмоль НАДФН/хв•мг	iNOS нмоль НАДФН/хв•мг	Нітрит-аніон мкмоль/г
Контроль	$107,2 \pm 10,3$	$0,44 \pm 0,09$	$0,228 \pm 0,043$	$16,5 \pm 1,17$
ВІС 3 год	$126 \pm 4,6$	$0,197 \pm 0,045^*$	$0,731 \pm 0,31$	$18,5 \pm 1,7$
ВІС 5 год	$131 \pm 5^*$	$0,22 \pm 0,095$	$1,07 \pm 0,184^{**}$	$18,4 \pm 1,14$
Адреналін	$165 \pm 13,9^*$	$0,441 \pm 0,087$	$1,146 \pm 0,186^{**}$	$22,3 \pm 1,11^*$
Коліт	$176,6 \pm 7,8^{**}$	$0,595 \pm 1,2$	$1,15 \pm 0,106^{**}$	$22 \pm 2,3^*$
Адреналін+ коліт	$180 \pm 5,68^{**}$	$0,409 \pm 1,02$	$1,255 \pm 0,145^*$	$22,3 \pm 1,11^{**}$

Примітка: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ у порівнянні з показниками контрольної групи.

За умов ВІС протягом трьох годин у МОТК різко зростала активність iNOS (у 3,8 рази, $P < 0,01$) та знижувалась активність cNOS (55%, $P < 0,05$); при цьому зростав вміст ТБК-активних продуктів на 17% ($P < 0,05$). Концентрація L-аргініну у плазмі крові знижувалась на 27% ($P < 0,05$), порівняно з показниками контрольної групи тварин. Зростання тривалості стресу до п'яти годин призводило до зростання рівня активності iNOS у МОТК до 4,6 рази ($P < 0,01$), вміст ТБК-активних продуктів збільшився на 22% ($P < 0,05$).

Отже, за умов дії ВІС протягом 3-5 годин у МОТК відзначались виражені зміни NO-ергічної системи: зростала активність iNOS та знижувалась активність cNOS, підвищувався рівень оксидативних процесів, що підвищувало ризик розвитку деструктивних ушкоджень СОТК та виникнення дисфункції моторики кишки. Зниження концентрації L-аргініну у плазмі крові на тлі зростання активності iNOS свідчить про включення та використання L-аргініну у окисному метаболізмі клітин.

У МОТК при дії АІС зростали: активність iNOS

у 5 разів ($P < 0,01$), вміст нітрит-аніону - на 35% ($P < 0,05$), вміст ТБК-активних продуктів - на 35% ($P < 0,05$); тоді як активність cNOS не змінювалась. Таким чином, за умов АІС зміни активності iNOS у МОТК були майже на рівні показників ВІС (5 годин), тоді як вміст ТБК-активних продуктів у МОТК був на 26% вищим, ніж при ВІС.

При експериментальному коліті активність iNOS у МОТК зростала у 5 разів, активність cNOS на 35%, вміст нітрит-аніону підвищувався на 33%. Вміст ТБК-активних продуктів зріс на 65% ($P < 0,01$), концентрація L-аргініну у плазмі крові знижувалась на 41% ($P < 0,05$), у порівнянні з показниками контрольної групи тварин.

Вплив АІС на тлі коліту у МОТК викликав тенденцію до зростання рівня активності iNOS та ТБК-активних продуктів, у порівнянні з показником при дії коліту. Таким чином, дія стресу на тлі коліту викликає зростання активності iNOS та оксидативних процесів у МОТК, що може посилювати деструктивні зміни та функціональні процеси товстої кишки.

Порівнюючи зміни рівня активності NO-синтаз

та вмісту нітрит аніону і ТБК-активних продуктів у МОТК, можна відзначити їх односпрямовані зміни при ВІС, АІС та експериментальному коліті.

Моторика товстої кишки за умов стресу та коліту має свої особливості, що залежить від участі центральних та периферійних нервових механізмів регуляції, так і місцевих факторів, у тому числі нітрогену оксиду. За фізіологічних умов нітрогену оксид, що синтезується nNOS інтернейронів мієнтеральних сплетень та ентеральними інгібіторними неадренергічними нехолінергічними нейронами проявляє інгібіторний тонічний вплив на м'язові скорочення кишки [15]. Активація iNOS при стресі та коліті призводить до синтезу великої кількості нітрогену оксиду, з якого утворюється нітроксил (NO⁻), пероксинітрит (ONOO⁻) та нітрозотіоли, внаслідок чого порушуються функції внутрішньоклітинних білків, плазматичної мембрани та мембран органел, структура ДНК, а також зростають оксидативні процеси [14].

Гострий стрес викликає вивільнення норадреналіну та кортикостерону з надниркових залоз та активує скоротливу активність товстої кишки, викликає гіпермоторику що призводить до підвищення дефекації у щурів і мишей [8]. Посилення моторики викликано виділенням кортикотропін-релізінг фактора (КРФ), який активує парасимпатичні нейрони, а останні стимулюють моторні нейрони автономної нервової системи, внаслідок чого вивільняється ацетилхолін та активується моторика товстої кишки [16].

Якщо за умов стресу моторика товстої кишки зростає, то при експериментальному коліті на тлі різкого зростання активності iNOS частота та амплітуда скорочень циркуляторних м'язів товстої кишки значно зменшувалася [5, 17]. Це може бути пов'язано з тим, що за умов коліту продукція нітрогену оксиду відбувається також нейтрофілами та гладком'язовими клітинами кишки [12].

Отже, за умов стресу та коліту у МОТК щурів зростає активність індукційної NO-синтази та продукція значної кількості нітрогену оксиду, який є провідним фактором дилатації гладких м'язів та порушення моторики товстої кишки.

ВИСНОВКИ

1. Як за умов ВІС та адреналін-індукованого стресу, так і експериментального коліту у МОТК різко зростає активність iNOS, підвищується вміст нітрит-аніону та активуються процеси ліпопероксидації.

2. Зміни активності iNOS у МОТК при п'ятигодинному ВІС були на рівні показників адреналін-індукованого стресу та експериментального коліту. Вплив стресу на тлі коліту підвищує рівень активності iNOS, що може бути ключовим фактором у розвитку дилатації гладких м'язів товстої кишки та порушення її моторно-евакуаторної функції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Алейникова Т.Л. Руководство к практическим занятиям по биохимии / Т.Л. Алейникова, Г.В. Рубцова. – М.: Высшая школа. – 1988. – 239 с.
2. Белостоцкий Н.И. Язвеобразование 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. Тимурбулатов М.А. Метод повышения свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / М.А. Тимурбулатов, Е.И. Селезнев // Лабораторное дело. – 1981. – № 4. – С. 209–211.
5. Acute experimental colitis decreases colonic circular smooth muscle contractility in rats / B.S. Myers, J.S. Martin, D.T. Dempsey [et al.] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 1997. – Vol. 273. – P. 928–936.
6. Bhatia V. Stress and the gastrointestinal tract / V. Bhatia, R.K. Tandon // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2005. – Vol. 20. – P. 332–339.
7. Changes in distribution of three isoforms of nitric oxide synthase in ulcerative colitis / P. Vento, T. Kiviluoto, H.J. Jarvinen [et al.] // Scand. J. Gastroenterol. – 2001. – Vol. 36. – P. 180–189.
8. Choudhury B. K. Norepinephrine mediates the transcriptional effects of heterotypic chronic stress on colonic motor function. / B. K. Choudhury, X.-Z. Shi, S. K. Sarna. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2009. – Vol. 296. – N 6. – G. 1238-1247.
9. Effects of melatonin on the expression of iNOS and COX-2 in rat models of colitis/ Dong W.G., Mei Q., Yu J.P. [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2003. – Vol. 9. – № 6. – P. 1307–1311.
10. Gastric mucosal damage in water immersion stress: Mechanism and prevention with GHRP-6 / Shu Guo, Qian Gao, Qing Jiao [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2012. – Vol. 18. – N 24. – P. 3145–3155.
11. 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.
12. Induction of nitric oxide synthase in colonic smooth muscle from patients with toxic megacolon / Mourelle M., Casellas F., Guarner F. [et al.] // Gastroenterology. – 1995. – Vol. 109. – N 5. – P. 1497-1502.
13. Konturek P.C. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options / P.C. Konturek, T. Brzozowski, S.J. Konturek // J. Physiol. Pharmacol. – 2011. – Vol. 62. – N 6. – P. 591-599.
14. Lanás A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract / A. Lanás // Arthritis Research & Therapy. – 2008. – Vol. 10, № 2. – P. 1–6.

15. Nitric oxide affects mammalian distal colonic smooth muscle by tonic neural inhibition / Middleton S.J., Cuthbert A.W., Shorthouse M. [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 1993. – Vol.108. – N 4. – P. 974-979.

16. Peripherally administered CRF stimulates colonic motility via central CRF receptors and vagal pathways in conscious rats / Tsukamoto K., Nakade Y., Mantyh C. [et al.] // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* - 2006. – Vol. 290. - R1537–1541.

17. Role of nitric oxide in the impairment of circular muscle contractility of distended, uninflamed

mid-colon in TNBS-induced acute distal colitis in rats / Onori L., Aggio A., D'Alo' S. [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11. – N 36. – P. 5677-5684.

18. Role of stress in functional gastrointestinal disorders. Evidence for stress-induced alterations in gastrointestinal motility and sensitivity / Monnikes H., Tebbe J.J., Hildebrandt M. [et al.] // *Dig Dis.* – 2001. – Vol. 19. – N 3. – P. 201-211.

19. Scaldaferrri F. Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis / F. Scaldaferrri, C. Fiocchi // *J. Dig. Dis.* – 2007. – Vol. 8. – P. 171–178.