

© Склярів П. О.

УДК 612. 015. 113:(616. 345-018. 25+616. 33/. 34)

Склярів П. О.

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ТА СТАН СИСТЕМИ L-АРГІНІН/NO-СИНТАЗА ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ АКТИВНОСТІ NO-СИНТАЗИ У СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ТОВСТОЇ КИШКИ НА ТЛІ ГІПЕРГАСТРИНЕМІЇ У ЩУРА

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького (м. Львів)

sklyarovp777@gmail.com

Дослідження є фрагментом комплексної між-кафедральної теми Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Клініко-експериментальні обґрунтування моніторингу діагностики та лікування захворювань органів травної системи та гепатопатій», № державної реєстрації 0100U002267.

Вступ. Одним з факторів, що може викликати розвиток канцерогенезу у товстій кишці є гіпергастринемія [4, 9]. Застосування блокаторів протонної помпи (омепразолу, лансопразолу) викликає зростання концентрації гастрину у крові, який з кровоплином досягає епітеліоцитів товстої кишки та проявляє трофічну дію, вплив на процеси диференціації та проліферації клітин у слизовій оболонці товстої кишки (СОТК) [3, 14]. У СОТК гастрин взаємодіє з ССК-2 рецепторами, призводячи до змін моторики, всмоктування, посилює процеси проліферації, що може викликати розвиток канцерогенезу [2, 12]. Прогастрин, амідна форма гастрину та Gly-гастрин стимулюють проліферацію епітеліоцитів товстої кишки [4, 10].

Система L-аргінін/NO-синтаза відіграє значну роль у регуляції фізіологічних процесів у товстій кишці, регулюючи секрецію, транспорт води та електролітів, моторику, цитопротекцію, кровоплин, а також забезпечує міжклітинну інтеграцію та проліферацію [5, 8]. Однак, як змінюється стан системи L-аргінін/NO-синтаза за умов модулювання її активності на тлі гіпергастринемії досліджено недостатньо.

Мета дослідження. Визначити морфологічні зміни слизової оболонки товстої кишки та стан системи L-аргінін/NO-синтаза у ній за умов модулювання активності NO-синтази на тлі гіпергастринемії у щурів.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проведені на 38 щурах масою 180-220 г відповідно до "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (Київ, 2001), які узгоджуються з Європейською конвенцією про захист експериментальних тварин (Страсбург, 1985).

Щури були розділені на 4 групи: перша – контрольна; друга – тварини, яким вводили блокатор

H^+, K^+ -АТФази лансопразол (у дозі 30 мг/кг); третя – тварини, яким вводили лансопразол та прекурсор синтезу нітрогену оксиду L-аргінін (у дозі 300 мг/кг); четверта – тварини, яким вводили лансопразол та блокатор індукційної NO-синтази аміногуанідин (доза 20 мг/кг). Препарати вводились перорально протягом двох тижнів. Забір матеріалу для досліджень проводили під уретановим знечуленням (1,1 мг/кг).

Оцінку стану системи L-аргінін/NO-синтаза визначали за визначенням: вмісту нітрит аніону використовуючи реактив Грися [7], активності NO-синтази [6] у СОТК, та концентрації L-аргініну у плазмі крові за методом [1], концентрацію гастрину у крові визначали застосовуючи набір реактивів фірми MP Biomedicals, LLC (USA).

При гістологічних дослідженнях препарати забарвлювали гематоксилін-еозином. При цьому визначали не тільки якісні зміни, а також проводили морфометричний аналіз компонентів слизової оболонки товстої кишки – площу поперечного перерізу ядер епітеліоцитів, глибину крипт та ширину слизової оболонки. На мікрофотографіях, отриманих на збільшенні $\times 150 - 320$, проводили обведення контурів органодів і обчислення їхніх площ за допомогою програмного забезпечення UTHSCSA ImageTool (USA). Кольорові мікрофотографії отримано за допомогою цифрової фотокамери Olympus C-5050 Zoom (Olympus Europe GmbH, Японія) та мікроскопа Olympus BX-41 (Olympus Europe GmbH, Японія) при збільшенні $\times 150-320$.

Статистичні розрахунки та побудову діаграм проводили за допомогою програми Microsoft Excel, Statistica. Показники розглядали як статистично достовірні при значеннях t , яке відповідало 95% вірогідності або $p < 0,05$. Дані у таблиці подані як середнє та його стандартна похибка ($M \pm m$).

Результати досліджень та їх обговорення. Блокування H^+, K^+ -АТФази лансопразолом протягом двох тижнів призводить до різкого зростання концентрації гастрину в крові до $430 \pm 11,2$ пг/мл ($p < 0,05$), за умов норми – $103 \pm 7,4$ пг/мл, та виражених змін структурних компонентів СОТК: відзначені зміни як стовпчастих поверхневих епітеліоцитів,

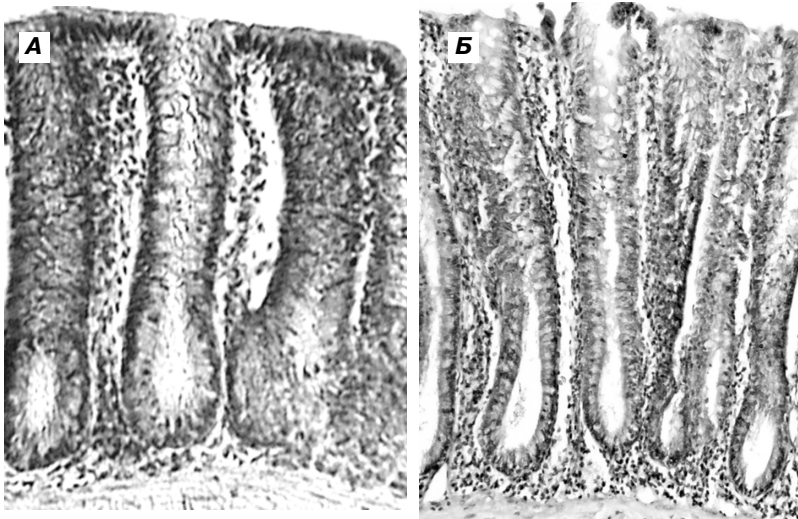


Рис. 1. Мікрофотографія слизової оболонки товстої кишки білих щурів за умов норми (А), за умов блокування H^+ , K^+ -АТФази (Б) лансопразолом. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення х 400.

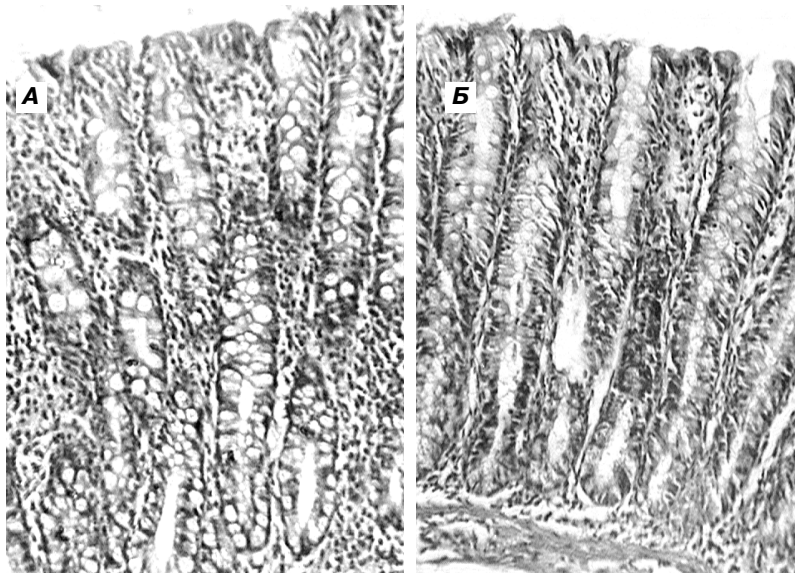


Рис. 2. Мікрофотографія слизової оболонки товстої кишки білих щурів за умов введення L-аргініну (А) та блокування активності iNOS аміногуанідиним (Б) на фоні гіпергастринемії. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення х 120.

так і структури епітеліоцитів крипт, келихоподібних клітин і мікроциркуляторного русла, цілісність одношарового циліндричного епітелію (**рис. 1 А-Б**).

При цьому відзначалось відшарування та десквамація епітеліальних клітин, порушується слизовий бар'єр. Зменшується вміст слизу на поверхні слизової. Це може викликати розвиток запального процесу з подальшим поглибленням процесу та залученням до нього більшої кількості клітин, виникненням набряку. За рахунок зміни клітин проходить розширення просвіту дна крипти. Келихоподібні клітини нагромаджували гранули секрету, мали збільшений розмір та займали значно більшу площу у криптах.

При гіпергастринемії площа поперечного перерізу ядер епітеліоцитів СОТК зростає з $1,76 \pm 0,06$ до $2,01 \pm 0,15$ μm^2 , глибина кишкових крипт підвищилась з $54,4 \pm 1,21$ до $62,4 \pm 4,42$ μm ($p < 0,05$), ширина слизової оболонки – з $122,5 \pm 3,03$ до $139,5 \pm 7,07$ μm ($p < 0,05$), кількість клітин у криптах збільшилась на – 32% ($p < 0,05$), що свідчить про активацію проліферативних процесів.

Гіпергастринемія протягом двох тижнів призводила до зростання вмісту нітрит-аніону (на 25%, $p < 0,05$), при цьому відзначалось підвищення рівня активності загальної NOS (на 28%, $p < 0,05$), активності cNOS (на 26%, $p < 0,05$) в СОТК та зменшення концентрації L-аргініну (на 18%) у плазмі крові. Співставляючи зміни активності NO-синтаз та вмісту нітрит-аніону у СОТК за умов гіпергастринемії спостерігаємо односпрямовані зміни, які свідчать про те, що зростання нітрит-аніону обумовлено підвищенням активності cNOS. Підвищення активності cNOS супроводжувалось тенденцією до зменшення концентрації L-аргініну в плазмі крові, що свідчить про тісний зв'язок між активністю NO-синтаз у СОТК та концентрацією L-аргініну плазми крові.

Гістологічними дослідженнями показано, що СОТК за умов двотижневого введення L-аргініну на фоні гіпергастринемії зберігає свою структуру. Слизовий бар'єр не порушений, келихоподібні клітини структуровані та знаходяться на різних фазах синтезу та виділення секрету. Набряку СОТК не спостерігається. Просвіт та дно крипт знаходяться у

дещо звуженому стані (**рис. 2**). За умов введення L-аргініну на фоні гіпергастринемії глибина кишкових крипт зменшувалась до $50,3 \pm 7,22$ μm , у порівнянні з дією лансопразолу; ширина слизової оболонки суттєво не змінювалась ($142,8 \pm 8,53$ μm); площа поперечного перерізу ядер епітеліоцитів становила $1,87 \pm 0,19$ μm^2 , кількість клітин у криптах була меншою на 11%, у порівнянні з показниками при гіпергастринемії.

Двотижнєве введення L-аргініну на фоні гіпергастринемії не викликало виражених змін вмісту нітрит-аніону та активності NO-синтаз. При цьому активність загальної NO-синтази, активність cNOS та iNOS були на рівні показників при дії лансопразолу

Активність NO-синтаз, вміст нітрит-аніону в СОТК та концентрація L- аргініну в плазмі крові за умов введення L-аргініну та блокування iNOS на тлі гіпергастринемії

Серії досліджень	Нітрит-аніон, мкмоль/л	Активність iNOS, нмоль/хв·г	Активність cNOS, нмоль/хв·г	Активність NOS, нмоль/хв·г	L-аргінін, мкг/мл
Контрольні тварини	16,5 ± 1,58	0,205 ± 0,08	0,49 ± 0,07	0,698 ± 0,06	43,1 ± 2,8
Гіпергастринемія	20,7 ± 1,63 *	0,271 ± 0,08	0,62 ± 0,09*	0,87 ± 0,08*	35,4 ± 2,1 *
Введення L-аргініну на тлі гіпергастринемії	19,8 ± 1,26	0,275 ± 0,07	0,63 ± 0,1	0,89 ± 0,12	40,9 ± 5,09
Інгібування активності iNOS на тлі гіпергастринемії	19,5 ± 0,6	0,261 ± 0,03	0,49 ± 0,06#	0,743 ± 0,04	37,4 ± 8,2

Примітка: * - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками контрольної групи; # - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками при гіпергастринемії; $M \pm m$, $n = 8-10$.

(табл.). Концентрація L-аргініну у плазмі крові була на 15% вищою, ніж при гіпергастринемії.

Те що активність NO-синтаз та вміст нітрит-аніону у СОТК при введенні L-аргініну на тлі гіпергастринемії виражено не змінювались, у порівнянні з показниками при гіпергастринемії, очевидно обумовлено зростанням рівня L-аргініну у крові та клітинах, який є субстратом для NO-синтаз.

Так, попередніми дослідженнями було показано, що підвищення позаклітинної концентрації L-аргініну призводило до посилення продукції нітрогену оксиду індуцибельною та ендотеліальною формами NO-синтаз ендотеліальними клітинами та активованими макрофагами [8]. Слід відзначити, що L-аргінін також метаболізує аргіназа з утворенням орнітину та сечовини, які у свою чергу можуть впливати на синтез нітрогену оксиду iNOS.

Отже, двотижневе введення L-аргініну на тлі гіпергастринемії викликало зменшення глибини кишкових крипт та дещо знижувалась площа поперечного перерізу ядер епітеліоцитів у СОТК, при цьому виражено не змінювалась активність NO-синтаз та вміст нітрит-аніону у СОТК, концентрація L-аргініну в плазмі крові мала динаміку до зростання.

Важливо відзначити те, що дія L-аргініну на розвиток канцеру товстої кишки залежить від стадії – під час стадії ініціації L-аргінін знижує гіперпроліферацію клітин крипт та розвиток колоректального канцеру, під час прогресії – дія L-аргініну є стимулюючою, при цьому L-аргінін є необхідною амінокислотою для росту канцерогенних клітин [8, 11, 16].

За умов двотижневого введення блокатора iNOS аміногуанідину на тлі гіпергастринемії гістологічними дослідженнями показано, що слизовий бар'єр СОТК був не порушений, набряку не спостерігалось. Відстань між криптами не була збільшеною. Келихоподібні клітини знаходились у різних фазах секреторного циклу (рис. 2-Б). При цьому глибина кишкових крипт ($63,9 \pm 6,3$ мкм), ширина слизової оболонки ($141,7 \pm 9,51$ мкм) та площа поперечного перерізу ядер епітеліоцитів були на рівні показників при дії лансопрозолу. Це свідчить про те, що блокування iNOS аміногуанідином не викликало виражених змін структури компонентів СОТК за умов гіпергастринемії.

Двотижневе блокування активності iNOS аміногуанідином на тлі гіпергастринемії не викликало достовірних змін вмісту нітрит-аніону, відзначена тенденція до зменшення активності cNOS, активність iNOS суттєво не змінювалась у СОТК (табл.). До активації iNOS призводить порушення слизового бар'єру, що спричиняє поступлення з порожнини кишки мікробних полісахаридів, мітогенних стимулів, прозапальних цитокінів, або розвиток гіпоксії з подальшим посиленням процесів ліпопероксидації [12, 14].

Отже, за умов двотижневої гіпергастринемії яка є одним з факторів посилення проліферативних процесів у товстій кишці, вплив прекурсора нітрогену оксиду L-аргініну або селективного блокатора NO-синтази на тлі гіпергастринемії спричиняє протективний вплив на стан слизової оболонки товстої кишки.

Висновки.

1. Гіпергастринемія протягом двох тижнів у СОТК викликала порушення слизового бар'єру, нагромадження гранул секрету в келихоподібних клітинах, збільшення їх розміру, кількість клітин у криптах зростала, підвищення вмісту нітрит-аніону (на 25%, $p < 0,05$) відбувалось за рахунок зростання активності cNOS (на 26%, $p < 0,05$), концентрація L-аргініну в плазмі крові зменшувалась.

2. За умов двотижневого введення L-аргініну на фоні гіпергастринемії зменшувались структурні зміни поверхневих епітеліоцитів, келихоподібних клітин, глибина кишкових крипт, порушення слизового бар'єру у СОТК, при цьому виражено не змінювалась активність NO-синтаз та концентрація нітрит-аніону у СОТК, у порівнянні з показниками при гіпергастринемії.

3. Двотижневе блокування iNOS на тлі гіпергастринемії запобігало морфологічним змінам слизового бар'єру, епітеліоцитів та крипт, призводило до тенденції зменшення активності загальної NOS, вмісту нітрит-аніону, у порівнянні з показниками при гіпергастринемії.

Перспективи подальших досліджень. Серед подальших напрямків дослідження перспективним є визначення ролі ендогенних простагландинів та циклооксигенази за умов гіпергастринемії у слизовій оболонці товстої кишки.

Література

1. Алейникова Т. Л. Руководство к практическим занятиям по биохимии / Т. Л. Алейникова, Г. В. Рубцова, Н. А. Павлова – М. : Медицина, 2000. – 128 с.
2. Вплив блокади ССК/гастринових рецепторів на транспортну функцію ободової кишки в умовах тривалої гіпергастринемії / Т. М. Гурленко, О. К. Вороніна, Т. В. Овчарик [та ін.] // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2007. – № 1 (36). – С. 16-21.
3. Кімакович В. Й. Морфологічні зміни слизової оболонки товстої кишки при блокуванні H^+, K^+ -АТФази лансопрозолем та ССК-2 гастринових рецепторів / В. Й. Кімакович, П. О. Складаров, В. І. Ковалишин // Фізіол. журн. – 2009. – Т. 55, №5. – С. 42-48.
4. Кімакович В. Й. Роль гастрину у процесах канцерогенезу товстої кишки / В. Й. Кімакович, П. О. Складаров // Практична медицина. – 2007. – Т. 13, № 1. – С. 138-146.
5. Савка Т. М. Роль оксиду азоту в регуляції транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки в нормі та за умов оцтово-кислого виразкового коліту у щурів / Т. М. Савка, Г. М. Толстанова, Я. М. Савицький // Фізіологічний журнал. – 2010. – Т. 56, № 1. – С. 109-117.
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. Analysis of nitrate, nitrite and $[^{15}N]$ nitrate in biological fluids / L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski [et al.] // Anal. Biochem. – 1982. – Vol. 126, № 1. – P. 131-138.
8. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease / G. Wu, F. W. Bazer, T. A. Davis [et al.] // Amino Acids. – 2009. – Vol. 37. – P. 153-168.
9. Circulating gastrin concentrations in patients at increased risk of developing colorectal carcinoma / A. C. Paterson, F. A. Macrae, C. Pizzey [et al.] // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2014. – Vol. 29, №3. – P. 480-486.
10. Gastrin : from pathophysiology to cancer prevention and treatment / G. Maddalo, Y. Spolverato, M. Rugge, F. Farinati // Eur. J. Cancer. Prev. – 2014. – Vol. 23, №4. – P. 258-263.
11. Grabon W. Arginina-podstawowy aminokwas w procesie nowotworzenia / W. Grabon // Postepy Hig. Med. Dosw. – 2006. – Vol. 60. – P. 483-489.
12. Oncogenic rats induces gastrin gene expression in colon cancer / H. Nakata, S. L Wang., C. Chung [et al.] // Gastroenterol. – 1998. – Vol. 115. – P. 1144-1153.
13. Pacher P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J. S. Beckman, L. Liaudet // Physiol. Rev. – 2007. – Vol. 87, № 1. – P. 315-424.
14. Potential role of endocrine gastrin in the colonic adenoma carcinoma sequence / S. A. Watson, T. M. Morris, D. F. McWilliams [et al.] // Br. J. Cancer. – 2002. – Vol. 87, №5. – P. 567-573.
15. Roles of nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of dextran sulfate sodium-induced rat colitis / Y. Aoi, S. Terashima, M. Ogura [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. – 2008. – Vol. 59, №2. – P. 315-336.
16. The effects of L-arginine on crypt cell hyperproliferation in colorectal cancer / Q. Ma, K. E. Williamson, D. O'Rourke [et al.] // J. Surg. Res. – 1999. – Vol. 81. – P. 181-188.

УДК 612.36-018.25:615.355

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ТА СТАН СИСТЕМИ L-АРГІНІН/NO-СИНТАЗА ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ АКТИВНОСТІ NO-СИНТАЗИ У СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ТОВСТОЇ КИШКИ НА ТЛІ ГІПЕРГАСТРИНЕМІЇ У ЩУРА Складаров П. О.

Резюме. Досліджено морфологічні зміни та стан системи L-аргінін/NO-синтаза у слизовій оболонки товстої кишки за умов введення L-аргініну або блокування активності індукційної NO-синтази на тлі гіпергастринемії у щурів. Відзначено, що гіпергастринемія викликана двотижневим введенням блокатора H^+, K^+ -АТФази лансопрозола викликала у СОТК порушення слизового бар'єру, нагромадження гранул секрету в келихоподібних клітинах, збільшення їх розміру, кількість клітин у криптах зростала, зростання вмісту нітрит-аніону (на 25 %, $p < 0,05$) за рахунок підвищення активності cNOS (на 26 %, $p < 0,05$), концентрація L-аргініну у плазмі крові незначно зменшувалась. Вплив прекурсора нітрогену оксиду L-аргініну або блокування індукційної NO-синтази спричиняє протективний вплив на стан слизової оболонки товстої кишки.

Ключові слова: гіпергастринемія, нітрогену оксид, NO-синтаза, товста кишка.

УДК 612.36-018.25:615.355

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ L-АРГИНИН/NO-СИНТАЗА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ АКТИВНОСТИ NO-СИНТАЗЫ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ НА ФОНЕ ГИПЕРГАСТРИНЕМИИ У КРЫС Складаров П. А.

Резюме. Изучены морфологические изменения и состояние системы L-аргинин/NO-синтаза в слизистой оболочке толстой кишки (СОТК) при введении L-аргинина или блокировании активности индукционной NO-синтазы на фоне гипергастринемии у крыс. Отмечено, что гипергастринемия, вызванная двухнедельным введением блокатора H^+, K^+ -АТФаза лансопрозола, вызывала в СОТК нарушение слизистого барьера, нагромаждение гранул секрета в бокаловидных клетках, увеличение их размера, количество клеток в криптах росло, увеличивалось содержание нитрит-аниона (на 25 %, $p < 0,05$) за счет повышения активности cNOS (на 26 %, $p < 0,05$), концентрация L-аргинина в плазме крови незначительно уменьшалась.

Влияние прекурсора нитрогена оксида L-аргинина или блокирование индуцибельной NO-синтазы оказывает протективный эффект на состояние слизистой оболочки толстой кишки.

Ключевые слова: гипергастринемия, нитрогена оксид, NO- синтаза, толстая кишка.

UDC 612.36-018.25:615.355

Morphological Changes and the Status of L-Arginine/NO-Synthase System under the Conditions of Modeling of NO-Synthase Activity in the Mucous Membrane of the Colon on the Background of Hypergastrinemia in the Rat

Sklyarov P. O.

Abstract. One of the factors that may cause cancerogenesis of the colon is hypergastrinemia. The application of proton pump blockers (omeprazole, lansoprazole) results in the increase of gastrin concentration in blood, which with the blood flow reaches colonic epitheliocytes and exerts trophic effect, affects processes of differentiation and proliferation of cells in the mucous membrane of the colon (MMC).

Morphological changes and the status of L-arginine/NO-synthase system in the mucous membrane of the colon under the conditions of L-arginine administration or blockage of inducible NO-synthase activity on the background of hypergastrinemia in rats were studied.

The studies were conducted on 38 rats weighing 180-220 g accordingly to "General ethical principles on experiments on animals". Animals were divided into 4 groups: the first – control; the second – animals, administered blocker of H^+,K^+ -ATP-ase lansoprazole (in dose 30 mg/kg); the third – animals, administered lansoprazole and precursor of nitric oxide synthesis L-arginine (in dose 300 mg/kg); the fourth – animals, administered lansoprazole and blocker of inducible NO-synthase aminoguanidine (dose 20 mg/kg). The drugs were administered perorally during two weeks.

It was noted that hypergastrinemia, caused by two weeks treatment with H^+,K^+ -ATP-ase blocker lansoprazole caused the alteration of mucous barrier in colonic mucosa, accumulation of granules of secrets in goblet cells, increase of the area of transversal slice of epitheliocytes nuclei from 1.76 ± 0.06 to $2.01 \pm 0.15 \mu m^2$, depth of colonic crypts from 54.4 ± 1.21 to $62.4 \pm 4.42 \mu m^2$ ($p < 0.5$), width of mucous membrane – from 122.5 ± 3.03 to $139.5 \pm 7.07 \mu m^2$ ($p < 0.05$), number of cells in crypts for 32% ($p < 0.05$), what states about the activation of proliferative processes.

Under the conditions of two weeks treatment with L-arginine on the background of hypergastrinemia the decrease of structural changes of superficial epitheliocytes and goblet cells, depth of colonic crypts, alteration of mucous barrier in colonic mucosa was noted, at that NO-synthase activity and concentration of nitrite anion in colonic mucosa did not change significantly compared to the indices in hypergastrinemia.

Two weeks blockage of iNOS on the background of hypergastrinemia prevented morphological changes of the mucous barrier, epitheliocytes and crypts, caused tendency to decrease of total NOS activity, nitrite-anion content compared to indices in hypergastrinemia.

Hence, under the conditions of two weeks hypergastrinemia, which is one of the factors enhancing proliferative processes in the colon, the influence of nitric oxide precursor L-arginine or selective blocker of NO-synthase on the background of hypergastrinemia causes protective effect on the status of the colonic mucosa.

Keywords: hypergastrinemia, nitric oxide, NO-synthase, colon.

Рецензент – проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 04. 03. 2015 р.