

ВПЛИВ НЕСТЕРОЇДНИХ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ НА СТАН СИСТЕМИ NO-СИНТАЗА/АРГІНАЗА У ТОВСТІЙ КИШЦІ ЗА УМОВ СТРЕСУ

©І. С. Фоменко, В. Ю. Ємельяненко, Н. Б. Панасюк, Л. П. Білецька, О. Я. Склярів

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

РЕЗЮМЕ. Досліджено вплив різних за механізмом дії нестероїдних протизапальних препаратів на стан системи NO-синтаза/аргіназа та процеси ліпопероксидації у слизовій (СОТК) та м'язовій (МОТК) оболонках товстої кишки за умов водно-імобілізаційного стресу. Показано, що стрес викликає зростання активності індукцибельної NO-синтази (iNOS) у СОТК та МОТК, при цьому активність аргінази знижується; паралельно підвищуються процеси ліпопероксидації. Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2, ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ виявило особливості зміни активності iNOS та eNOS. **КЛЮЧОВІ СЛОВА:** стрес, виразковий коліт, нестероїдні протизапальні препарати.

Вступ. Стрес є одним з факторів, що викликає розвиток виразкового коліту [9, 11]. Механізм дії стресу викликає вазоконстрикцію, ішемію та підвищує процеси ліпопероксидації, посилює інфільтрацію слизової оболонки товстої кишки (СОТК) нейтрофілами та макрофагами, що викликає деструктивні uszkodження СОТК та активує моторику товстої кишки [11, 13].

Відомо, що вплив нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) на тлі стресу є одним з чинників, що зумовлюють значне погіршення перебігу захворювання [5, 14].

Система NO-синтаза/аргіназа займає провідне місце у підтримці морфофункціонального стану товстої кишки. Слід відзначити, що за фізіологічних умов у товстій кишці активність конститивних ізоформ NO-синтази (сNOS) – нейрональної (nNOS) та ендотеліальної (eNOS) є невеликою, а продукція нітрогену оксиду (NO) – незначна. NO бере участь у підтриманні цілісності епітеліального бар'єру, відповідного рівня кровотоку, процесах транспорту води та електролітів, бактерицидній дії по відношенню до мікроорганізмів, процесах міжклітинної комунікації, нейротрансмісії у ентеральних нейронах, регуляції моторики [3]. L-аргінін є субстратом для NO-синтази, і, відповідно, синтезу NO та аргінази, яка продукує орнітин та сечовину.

Гіпоксія, зростання проникності слизового бар'єру СОТК, дія цитокінів та бактеріальних ліпополісахаридів призводять до різкого зростання експресії індукцибельної NO-синтази (iNOS) та продукції NO, а також до значного посилення процесів ліпопероксидації [8, 12].

Запальні uszkodження товстої кишки супроводжуються різким зростанням активності прозапальних ензимів – індукцибельної NO-синтази (iNOS), циклооксигенази-2 (ПГЕ2), 5-ліпооксигенази (5-ЛОГ), і, відповідно, підвищенням синтезу нітрогену оксиду, простагландинів групи E2 та лейкотрієнів (лейкотрієну B4) [4].

Мета досліджень. Оцінити зміни системи NO-синтаза/аргіназа та процеси ліпопероксидації у товстій кишці за умов дії нестероїдних протизапальних препаратів ні тлі стресу.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження проводили на 58 білих щурах масою 180–200 г, згідно з вимогами етики, передбаченими положеннями Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей. 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.

Стрес моделювали шляхом іммобілізації тварин у пластмасовому боксі з подальшим їх триманням у воді протягом п'яти годин – водно-імобілізаційний стрес (ВІС) [6]. Після цього тварин декапітували на тлі тіопенталового знеболювання. Виділяли товсту кишку, механічно відділяли слизову оболонку і м'язово-серозну частину, які гомогенізували.

Тварини були поділені на п'ять груп: перша (контрольна) – тваринам вводили плацебо (0,1 мл 0,9 % розчину натрію хлориду інтраперитонеально); друга – тварини, яким моделювали ВІС; третя – тварини, яким вводили блокатор ЦОГ-1 SC-560 у дозі 10 мг/кг; четверта – тварини, яким вводили блокатор ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксен 10 мг/кг; п'ята – тварини, яким вводили блокатор ЦОГ-2 целекоксиб у дозі 10 мг/кг; шоста – тварини, яким вводили 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".

Для оцінки системи NO-синтаза/аргіназа у гомогенатах слизової та м'язової оболонок товстої кишки визначали активність NO-синтази за методом [1]; вміст нітрит-аніона – за допомогою реактиву Грісса [8], активність аргінази – за [7]. Для оцінки процесів ліпопероксидації визначали вміст ТБК-активних продуктів [2].

Статистичну обробку експериментальних результатів проводили з використанням прикладної програми ANOVA "Statistica". Статистично достовірними вважали розбіжності при $p < 0,05$.

Результати й обговорення. У інтактних тварин як у COTK, так і MOTK домінувала активність cNOS ($4,91 \pm 0,94$ та $3,26 \pm 0,9$ нмоль/хв·г відповідно), тоді як рівень активності iNOS був незначним. Активність аргінази становила $0,38 \pm 0,08$ мкмоль/хв·мг. Вміст нітрит-аніона за умов норми становив $17,6 \pm 1,3$ мкмоль/л, вміст ТБК-активних продуктів

у COTK досягав $240,7 \pm 5,0$ мкмоль/г·тк, у MOTK – $107,2 \pm 10,3$ мкмоль/г·тк (табл. 1).

За умов ВІС як у COTK, так і у MOTK різко зростала активність iNOS – у 4,6 у COTK та 6 разів у MOTK ($P < 0,01$) та знижувалась активність cNOS (на 65 % та 34 %, відповідно) та активність аргінази (на 42 % ($P < 0,05$), та 16 % відповідно); підвищувався рівень ТБК-активних продуктів на 15–22 % ($P < 0,05$), що свідчить про активування процесів ліпопероксидації. Слід зазначити, що макроскопічно деструктивних змін COTK при дії ВІС не спостерігалось.

Таблиця 1. Вплив нестероїдних протизапальних препаратів на активність системи NO-синтаза/аргіназа та процеси ліпопероксидації у товстій кишці

| Серії досліджень | Товста кишка | ТБК-активні продукти мкмоль/г·тк | Нітрит аніон мкмоль/г | iNOS нмоль /хв·г | cNOS нмоль /хв·г | Аргіназа мкмоль/хв·мг |
|------------------|--------------|----------------------------------|-----------------------|------------------|------------------|-----------------------|
| Контроль | слизова об. | $240,7 \pm 5$ | $17,6 \pm 1,3$ | $0,23 \pm 0,08$ | $0,49 \pm 0,09$ | $0,38 \pm 0,08$ |
| | м'язова об. | $107,2 \pm 10,3$ | $16,5 \pm 1,17$ | $0,18 \pm 0,04$ | $0,33 \pm 0,09$ | $0,31 \pm 0,02$ |
| ВІС | слизова об. | $277,4 \pm 6$ | $20,5 \pm 1,1$ | $1,05 \pm 0,2$ | $0,17 \pm 0,06$ | $0,18 \pm 0,03$ |
| | м'язова об. | 131 ± 5 | $19,1 \pm 1,12$ | $1,07 \pm 0,18$ | $0,22 \pm 0,09$ | $0,26 \pm 0,06$ |
| ВІС+SC-560 | слизова об. | $284 \pm 3,5$ | $20 \pm 2,4$ | $0,80 \pm 0,16$ | $0,39 \pm 0,03$ | $0,31 \pm 0,05$ |
| | м'язова об. | $128,2 \pm 7,9$ | $19 \pm 0,8$ | $0,54 \pm 0,09$ | $0,23 \pm 0,02$ | $0,22 \pm 0,03$ |
| ВІС + Напроксен | слизова об. | $277,1 \pm 7,3$ | $18,2 \pm 1,7$ | $0,54 \pm 0,23$ | $0,30 \pm 0,09$ | $0,22 \pm 0,04$ |
| | м'язова об. | $129,6 \pm 3,5$ | $18,6 \pm 1,18$ | $0,46 \pm 0,12$ | $0,24 \pm 0,16$ | $0,19 \pm 0,07$ |
| ВІС + Целекоксиб | слизова об. | $282,7 \pm 6,6$ | $18,5 \pm 1,3$ | $1,2 \pm 0,24$ | $0,48 \pm 0,18$ | $0,24 \pm 0,05$ |
| | м'язова об. | $124,5 \pm 5$ | $18,4 \pm 1,2$ | $1,41 \pm 0,23$ | $0,45 \pm 0,11$ | $0,24 \pm 0,08$ |
| ВІС + 2A5DHT | слизова об. | $276,5 \pm 6,3$ | $17 \pm 0,8$ | $0,82 \pm 0,35$ | $0,47 \pm 0,23$ | $0,27 \pm 0,08$ |
| | м'язова об. | $128 \pm 3,5$ | $18 \pm 1,58$ | $0,72 \pm 0,14$ | $0,44 \pm 0,16$ | $0,26 \pm 0,08$ |

Блокування ЦОГ-1 на тлі стресу викликало зниження активності iNOS – у COTK на 22 % ($P < 0,05$), у MOTK – на 50 % ($P < 0,05$); активність cNOS та аргінази достовірно не змінювалась.

Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксеном викликало різке зниження активності iNOS – у COTK на 49 % ($P < 0,05$), у MOTK – на 57 % ($P < 0,05$). За цих умов відзначено зростання активності cNOS у COTK на 81 % ($P < 0,05$). Достовірних змін активності аргінази, вмісту нітрит-аніона та ТБК активних продуктів не було виявлено, порівняно з відповідними показниками тварин за умов дії стресу.

Блокування ЦОГ-2 целекоксибом на тлі стресу не змінювало активності iNOS у COTK та викликало тенденцію до підвищення у MOTK, активність cNOS у COTK та MOTK зростала. Активність аргінази та вміст ТБК-активних продуктів у COTK та MOTK виражено не змінювались.

Вплив блокатора ЦОГ-2/5-ЛОГ на тлі стресу не змінював вміст ТБК-активних продуктів, нітрит-аніона, активності аргінази, тоді активність iNOS знижувалась, порівняно з показниками при дії стресу та впливу целекоксибу на тлі стресу.

Отримані результати свідчать про особливості дії різних НПЗП на тлі стресу на стан системи NO-

синтаза/аргіназа та процеси ліпопероксидації у товстій кишці.

Висновки. 1. Стрес викликає різке зростання активності iNOS та вмісту ТБК активних продуктів, а також зниження активності аргінази у слизовій та м'язовій оболонках товстої кишки.

2. Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксеном на тлі стресу знижує активність iNOS, тоді як вміст ТБК активних продуктів та активність аргінази достовірно не змінювались у COTK та MOTK.

3. Блокування ЦОГ-2 целекоксибом на тлі стресу не викликало достовірних змін активності iNOS, аргінази та вмісту ТБК активних продуктів, активність cNOS зростала у COTK та MOTK у порівнянні з відповідними показниками при стресі, тоді як одночасне блокування ЦОГ-2/5-ЛОГ призводило до зниження активності iNOS, порівняно з блокуванням ЦОГ-2 на тлі стресу.

Перспективи подальших досліджень. Для оцінки ролі системи NO-синтаза/аргіназа та ендогенних простагландинів необхідно визначити вплив нестероїдних протизапальних препаратів за умов дії стресу на тлі експериментального коліту.

ЛІТЕРАТУРА

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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. – № 2. – P. 297–306.
5. Interaction between selective cyclooxygenase inhibitors and capsaicin sensitive afferent sensory nerves in pathogenesis of stress-induced gastric lesions. Role of oxidative stress / S. Kwiecień, P. C. Konturek, Z. Sliwowski [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. – 2012. – 63, №2. – P. 143–151.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Lanás A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract / A. Lanás // Arthritis Research & Therapy. – 2008. – Vol. 10, № 2. – P. 1–6.
11. Larauche M. Corticotropin releasing factor signaling in colon and ileum: regulation by stress and pathophysiological implications. / M. Larauche, C. Kiank, Y. Tache // J. Physiol. Pharmacol. – 2009. – Vol. 60, Suppl 7. – P. 33–46.
12. Lundberg J. O., Weitzberg E. Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract. // Gut. – 2013. – Vol. 62. – № 4. – P. 616–629.
13. Scaldaferrì F. Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis / F. Scaldaferrì, C. Fiocchi // J. Dig. Dis. – 2007. – Vol. 8. – P. 171–178.
14. Wallace J. L. NSAID gastropathy and enteropathy: distinct pathogenesis likely necessitates distinct prevention strategies / J.L.Wallace // Br. J. Pharmacol. 2012. – Vol.165. – N 1. – P. 67–74.

INFLUENCE OF NONSTEROIDAL ANTIINFLAMMATORY DRUGS ON THE STATE OF NO-SYNTASE/ARGINASE IN THE COLON UNDER CONDITIONS OF STRESS

©I. S. Fomenko, V. Yu. Yemelyanenko, N. B. Panasyuk, L. P. Biletska, O. Ya. Sklyarov

Danylo Halytsky Lviv National Medical University

SUMMARY. The influence of different nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the state of NO-synthase/arginase system and lipid peroxidation processes in mucosal and muscular layers of the colon under conditions of water immobilisation stress was investigated. It was shown that stress induces the increase of inducible NO-synthase (iNOS) in the mucosal and muscular layer of the colon, at that arginase activity decreased; simultaneously processes of lipid peroxidation decreased. The blockage of COX-1/COX-2, COX-2 and COX-2/5-LOX revealed the peculiarities of changes of iNOS and cNOS activity.

KEY WORDS: stress, uncerative colitis, nonsteroidal anti-inflammatory drugs.