

ЗМІНИ ПРОЦЕСІВ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ, АКТИВНОСТІ NO-СИНТАЗНОЇ СИСТЕМИ ТА АРГІНАЗИ У ПІДШЛУНКОВІЙ ЗАЛОЗІ ЩУРІВ ЗА УМОВ СТРЕСУ

©Т. І. Бондарчук, Н. Б. Панасюк, Л. П. Білецька, О. Я. Скларов

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

РЕЗЮМЕ. В експерименті на щурах досліджено вплив водно-імобілізаційного (ВІС) та адреналін-індукованого стресів (АІС) на процеси ліпопероксидації, стан системи L-аргінін/NO-синтаза/нітрогену оксид (NO) та активність аргінази у тканині підшлункової залози (ПЗ). Показано, що обидва види стресу спричинюють посилення процесів ліпопероксидації, зростання активності індукцибельної NO-синтази (iNOS) та зниження активності аргінази. Відзначено, що вираженість змін при ВІС залежить від тривалості стресу, а АІС значно більшою мірою впливає на стан системи L-аргінін/NO-синтаза/NO та активність аргінази, порівняно з ВІС.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: стрес, ліпопероксидація, NO-синтаза, аргіназа, L-аргінін.

Вступ. Дія надзвичайних чинників (у тому числі стресу) на організм людини супроводжується включенням нейроендокринних і метаболічних механізмів, які спрямовані на збереження життєво важливих параметрів гомеостазу. Під впливом стресорів різного характеру (у тому числі емоційних) послідовно активуються симпатoadреналова та гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозна системи, внаслідок чого в крові різко зростає концентрація катехоламінів (адреналіну та норадреналіну) і глюкокортикоїдів. У процес залучається острівцевий апарат ПЗ, що проявляється різким зростанням інкреції інсуліну у відповідь на гіперглікемію, яка виникає внаслідок мобілізації глікогену печінки. Одночасно відбувається перерозподіл кровотоку: він посилюється в м'язовій системі, серці, легенях і мозку, тоді як в органах травної системи (у тому числі ПЗ) – зменшується. Виникає ішемія, внаслідок чого порушується трофіка клітин, наростають процеси ліпопероксидації, посилюється інфільтрація тканини нейтрофілами та макрофагами. У клітинах активується система L-аргінін/NO-синтаза/NO, різко зростає експресія iNOS і, відповідно, продукція NO. Розвиток запального процесу та деструктивні зміни в подальшому можуть призводити до розвитку гострого некрозу залози (первинно-некротичний панкреатит) [3].

Мета дослідження – дослідити зміни процесів ліпопероксидації, системи L-аргінін/NO-синтаза/NO та активності аргінази в ПЗ щурів за умов ВІС і АІС.

Матеріал і методи дослідження. Експерименти проведені на 32 білих безпородних щурах-самцях масою 180 – 240 г і виконані згідно з вимогами Європейської Комісії з нагляду за проведенням лабораторних досліджень з участю експериментальних тварин. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію. У день проведення досліду тварин не годували, забезпечуючи безперешкодний доступ до води.

Експериментальні тварини були поділені на 4 групи: 1 група (n = 8) – інтактні; 2 група (n = 8) –

тварини, яким моделювали ВІС шляхом їх фіксації у пластмасовому тубусі та занурення у воду (t = 23 °C) впродовж 3 год; 3 група (n = 8) – тварини, яким моделювали ВІС впродовж 5 год [13]; 4 група (n = 8) – тварини, яким моделювали стрес шляхом введення адреналіну (натще у дозі 2 мг/кг внутрішньоочеревинно) [2]. Під тіопенталовим знеболюванням (40 мг/кг) щурів декапітували, проводили розтин по білій лінії живота та виділяли ПЗ, оцінювали її макроскопічно та гомогенізували. У гомогенатах досліджували активність процесів ліпопероксидації за вмістом продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-активних продуктів) [9]. Для оцінки системи L-аргінін/NO-синтаза/NO визначали активність NO-синтаз [8] і аргінази [14]; вміст нітрит-аніона [15], концентрацію L-аргініну – у плазмі крові [1]. Результати опрацьовано за методом варіаційної статистики з використанням програмного забезпечення ANOVA з визначенням t-критерію Стьюдента.

Результати й обговорення. Під час забору матеріалу макроскопічне оцінювання ПЗ тварин, які підлягали впливу стресу, не виявило жодних видимих змін.

У гомогенатах тканини ПЗ контрольної групи тварин вміст ТБК-активних продуктів становив $409 \pm 11,4$ мкмоль/г. АІС найбільшою мірою посилював процеси ліпопероксидації: вміст ТБК-активних продуктів зростав при цьому на 20 % (p < 0,05), тоді як при ВІС впродовж 5 год – на 17 %, а при ВІС впродовж 3 год – на 15 %.

Аналіз стану NO-синтазної системи в інтактних тварин продемонстрував майже чотирикратне переважання активності cNOS ($0,48 \pm 0,92$ нмоль/хвхг), над iNOS ($0,12 \pm 0,19$ нмоль/хвхг), що узгоджується з даними літератури щодо домінуючої ролі cNOS за фізіологічних умов [11, 16]. Вміст нітрин-аніона в гомогенаті ПЗ знаходився на рівні $17,7 \pm 0,67$ мкмоль/г, активність аргінази становила $0,31 \pm 0,03$ мкмоль/хвхг. Концентрація L-аргініну в плазмі крові була на рівні $38,6 \pm 5,7$ мкг/мл (табл. 1).

Таблиця 1. Вплив стресу на активність NO-синтазної системи в тканині підшлункової залози щурів ($M \pm m$)

Групи тварин (n = 10)	Нітрит-аніон, мкмоль/г	NOS, нмоль/хвхг	iNOS, нмоль/хвхг	cNOS, нмоль/хвхг	Аргіназа, мкмоль/хвхг	L-аргінін, мкг/мл
Контроль	17,7±0,67	0,61±1,01	0,12±0,19	0,48±0,92	0,31±0,03	38,6±5,7
ВІС 3год	18,8±0,8	0,67±0,83	0,48±0,7*	0,19±0,33*	0,24±0,04	31,5±3,84
ВІС 5год	19±0,81	0,91±1,05*	0,76±1,53*	0,15±0,73*	0,22±0,03	30,7±2,35*
AIC	22,4±1,77*	2,03±1,25*	1,35±1,55**	0,68±1,14	0,18±0,06*	29,8±4,7*

Примітка: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

ВІС впродовж 3 год супроводжувався зростанням активності iNOS майже в 4 рази ($p < 0,05$), тоді як активність cNOS зменшилася в 2,5 рази ($p < 0,05$), а аргінази – на 23 %. При цьому відзначалася тенденція до підвищення вмісту нітрит-аніона в тканині ПЗ та зниження концентрації L-аргініну в плазмі крові (на 18 %).

Зростання тривалості впливу стресу до 5 год призводило до підвищення активності iNOS у 6 разів ($p < 0,01$), зниження активності cNOS у 3 рази ($p < 0,05$) порівняно з показниками інтактних тварин. Активність аргінази знижувалася при цьому на 29 %, а концентрація L-аргініну в плазмі крові – на 20 %.

У клінічних дослідженнях, присвячених впливу емоційного стресу на секреторну функцію шлунка та ПЗ у людей доведено, що вираженість наслідків стресу залежить від його сили та тривалості і супроводжується пригніченням секреторної функції шлунка та ПЗ у міжтравний період і нейрогуморальну фазу секреції; зниженням вивільнення гастрину та кальцитоніну, зміною динаміки гормональних кривих СТГ, кортизолу та альдостерону [7, 18].

Наші дослідження демонструють, що зростання часу дії стресу посилює активність iNOS та збільшує рівень процесів ліпопероксидації у тканині ПЗ, що може призводити до розвитку деструктивних змін і функціональних розладів цього органа. Подібними біохімічними змінами характеризується вплив ВІС на слизову оболонку шлунка та м'язову оболонку товстої кишки [6].

AIC викликав різке зростання активності iNOS у 11 разів ($p < 0,01$), паралельно знижувалася активність аргінази (на 42 %, $p < 0,05$). Активність cNOS була вищою, порівняно з показниками ВІС та інтактних тварин. При цьому відзначалося зростання вмісту нітрин-аніона у гомогенаті ПЗ на 26 % ($p < 0,05$), на 23 % знижувалася концентрація L-аргініну в плазмі крові.

В експериментальних дослідженнях із впливу стресу на слизову оболонку шлунка та товстої кишки показано, що AIC спричинював розвиток структурно-геморагічних ушкоджень слизової оболонки шлунка у вигляді масивних і точкових крововиливів, ерозій і виразок, що супроводжувалося зростанням активності iNOS і нітрит-аніона в цих тканинах [4, 5, 17].

Порівнюючи вплив ВІС та AIC на ПЗ слід зауважити, що останній значно більшою мірою посилював процеси ліпопероксидації, підвищував активність iNOS та знижував – аргінази. Такі зміни насамперед пов'язані з вазоконстрикторним ефектом AIC, порушенням трофіки клітин ПЗ, і, як наслідок, з руйнуванням клітинних мембран. Неспроможність системи антиоксидантного захисту, надмірне продукування вільних радикалів активує внутрішньоклітинний шлях NF- κ B, підвищує концентрацію TNF- α та IL-1 β , IL-8 у плазмі крові, які своєю чергою активують синтез iNOS з наступним внутрішньоклітинним утворенням надмірної кількості NO [10, 12, 20]. Останній взаємодіє з супероксидним аніоном із утворенням пероксинітриту, який спричинює дисфункцію мітохондрій, ушкодження ДНК, активує матричну мієлопероксидазу, полі-АДФ-рибозо-полімеразу, а також циклооксигеназу-2, слугуючи у такий спосіб медіатором синтезу простагландинів E_2 з арахідонової кислоти [19]. Отже і AIC (більшою мірою), і ВІС викликають виражений нітритрооксидативний стрес, який є раннім чинником, що може провокувати розвиток гострого панкреатиту [21].

Висновки. 1. Вираженість змін процесів ліпопероксидації, системи L-аргінін/NO-синтаза/NO та активності аргінази у тканині ПЗ при ВІС залежить від тривалості стресу. 2. ВІС впродовж 5 год у тканині ПЗ посилював процеси ліпопероксидації на 17 %, підвищував активність iNOS у 6 разів, знижував – cNOS (у 3 рази) та аргінази (на 29 %), концентрацію L-аргініну в плазмі крові – на 20 %. 3. Порівняно з ВІС, AIC значно більшою мірою впливав на стан NO-синтазної системи та активність аргінази в тканині ПЗ: активність iNOS зростала в 11 разів, при цьому активність cNOS була в 1,5 рази вищою, порівняно з інтактними тваринами, та в 4 рази – порівняно з ВІС впродовж 5 год; концентрація NO збільшувалася на 20 %, активність аргінази знизилася на 42 %, а концентрація L-аргініну в плазмі крові – на 23 %.

Перспективи подальших досліджень. У механізмах цитопротекції клітин ПЗ суттєву роль відіграють ендогенні простагландини та циклооксигенази. Визначення ролі останніх за умов їх блокування нестероїдними протизапальними препаратами буде подальшим кроком наших досліджень.

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. Язвобразование в слизистой оболочке желудка крыс под влиянием катехоламинов / Н. И. Белостоцкий // Патологическая физиология и экспериментальная медицина. – 1988. – № 1. – С. 24–27.
3. Бузунов А. Ф. Формирование соматических последствий адаптационного синдрома. Цена цивилизации / А. Ф. Бузунов. – М. : Практическая медицина, 2010. – 352 с.
4. Вивчення ролі NO-синтазної системи у слизовій оболонці шлунка щурів за умов впливу нестероїдних протизапальних препаратів на тлі адреналін-індукованого стресу / І. С. Фоменко, Т. І. Бондарчук, Л. П. Білецька [та ін.] // Вісник проблем біології та медицини. 2013. – Вип. 3, Т. 1 (102). – С. 245–249.
5. 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 [та ін.] // Таврійський медико-біологічний вісник. – 2012. – Т. 15, № 3, Ч. 1 (59). – С. 131–134.
6. Ємельяненко В. Ю. Стрес змінює активність NO-ергічної системи у м'язовій оболонці товстої кишки / В. Ю. Ємельяненко, Н. Б. Панасюк, О. Я. Склярів // Таврический медико-биологический вестник. – 2013. – Т. 16, № 1, Ч. 3 (61). – С. 69–72.
7. Кузнецов А. П. Желудочно-кишечный тракт и стресс / А. П. Кузнецов, А. В. Речкалов, Л. Н. Смелышева. – Курган : Изд-во КГУ, 2004. – 254 с.
8. 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.
9. 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.
10. Alderton W. K. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition / W. K. Alderton, C. E. Cooper, R. G. Knowles // Biochem. J. – 2001. – Vol. 357. – P. 593–615.
11. Al-Mufti R. A. Increased nitric oxide activity in rat model of acute pancreatitis / R. A. Al-Mufti, R. C. N. Williamson, R. T. Maathie // Gut. 1998. – №. 43. – P. 564–570.
12. Chronic stress sensitizes rats to pancreatitis induced by cerulean: role of TNF- α / M. G. Bincer, A. A. Bincer-Cosen, D. Richards [et al.] // World Journal of Gastroenterology. – 2010. – Vol. 16, № 44. – P. 5565–5581.
13. 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, № 24. – P. 3145–3155.
14. Geyer J. W. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates / J. W. Geyer, D. Dabish // Anal. Biochem. – 1971. – 39, № 2. – P. 412–417.
15. Green L. C. Analysis of nitrate, nitrite and (1515) nitrate in biological fluids / L. C. Green, A. W. David // Anal. Biochem. – 1982. – Vol. 126. – P. 131–138.
16. Matthew J. di Magno. Nitric oxide pathways and evidence-based perturbations in acute pancreatitis / J. di Magno Matthew // Pancreatology. – 2007. – № 7. – P. 403–408.
17. Nasadyuk C. Thymohehexin exhibits cytoprotective effect in experimental gastric lesions in rats both through the inhibition of inducible nitric oxide synthase and reduction of oxidative mucosal damage / C. Nasadyuk, A. Sklyarov // Regul. Pept. – 2013. – Vol. 80. – P. 50–57.
18. Ovsiannikov V. I. Mechanisms of realization of the pathogenic potential of stress / V. I. Ovsiannikov // Med. Acad. Journ. – 2010. – Vol. 10, № 4. – P. 21–29.
19. 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.
20. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis / P. Mews, P. Phillips, R. Fahmy [et al.] // Gut. – 2002. – Vol. 50. – № 4. – P. 535–541.
21. Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis / Dabrowski A., Konturek S.J., Konturek J.W. [et al.]. // Eur. J. Pharmacol. – 1999. – Vol. 377. – № 1. – P. 1–11.

CHANGES OF LIPID PEROXIDATION PROCESSES, NO-SYNTASE SYSTEM AND ARGINASE ACTIVITY IN PANCREAS OF RATS UNDER THE STRESS CONDITION

©Т. І. Bondarchuk, N. B. Panasyuk, L. P. Biletska, O. Ya. Sklyarov

Danylo Halytsky Lviv National Medical University

SUMMARY. The influence of water-restrained stress (WRS) and epinephrine-induced stress (EIS) on parameters of lipid peroxidation, L-arginine/NO-synthase/nitrogen oxide (NO) and was studied in experiments on rats. It was shown, that both types of stress lead to the enhancement of lipid peroxidation processes, the increase of inducible NO-synthase (iNOS) activity and the decrease of arginase activity. It was noticed, that there is a direct influence of stress duration in WRS model, whereas EIS affects studied parameters of L-arginine/NO-synthase/nitrogen oxide system more intense than WRS.

KEY WORDS: stress, lipid peroxidation, NO-synthase, arginase, L-arginine.