

УДК 577.12+612.015.1

Я. С. Максимович, М. В. Миленко, О. В. Дробінська, Л. І. Остапченко

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

**АКТИВНІСТЬ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ
ТА ВМІСТ ПЕРОКСИНІТРИТУ У КЛІТИНАХ
СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЩУРІВ
ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ СТРЕСОВОЇ ВИРАЗКИ**

Досліджено активність синтази оксиду азоту та рівень пероксинітриду у клітинах слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментальної моделі стресової виразки. За умов дії стресового чинника активність синтази оксиду азоту зростає, що призводить до збільшення кількості пероксинітриду та супроводжується формуванням виразкових дефектів. Ступінь ураженості слизової оболонки шлунка залежить від тривалості дії пошкоджувального фактора. Показано, що оксид азоту залучений до складних патогенетичних механізмів виразкоутворення.

I. S. Maksymovych, M. V. Mylenko, O. V. Drobinska, L. I. Ostapchenko

Taras Shevchenko Kyiv National University

**NITRIC OXIDE SYNTHASE ACTIVITY AND PEROXYNITRITE
CONTENT IN CELLS OF RAT'S MUCOUS COAT OF STOMACH
UNDER EXPERIMENTAL STRESS-INDUCED ULCER**

Nitric oxide synthase activity in gastric mucosal cells as well as peroxynitrite generation in experimental stress-induced gastric ulcer formation in rats were studied. There was made the conclusion that nitric oxide synthase activity is growing during the stress. It causes increasing of peroxynitrite' production and ulcer formation. It was established that destructive gastric mucosal damages depend on stress' duration. It was determined that nitric oxide is involved in complex pathogenetic mechanisms of ulceration.

Вступ

У шлунково-кишковому тракті за нормальних умов *NO* бере участь у регуляції тонуусу гладеньких м'язів, зокрема, впливає на перистальтику кишечника, евакуаторну функцію шлунка та антральну моторику [2]. Крім того, *NO* як вторинний месенджер є модулятором секреції кислоти та слизу шлунка, залученим у процеси кровопостачання органів травлення. За фізіологічних умов оксид азоту діє як ендогенний медіатор, який відповідає за підтримання цілісності та відновлення тканин, виявляє гастропротекторні властивості, попереджуючи ураження слизової оболонки шлунка від різноманітних шкідливих факторів (етанолу, мінеральних і жовчних кислот тощо) [16; 19].

Однак високі концентрації *NO* – одна з причин розвитку багатьох хвороб шлунково-кишкового тракту, зокрема, пептичної виразки, хронічного гастриту, раку, бактеріальних гастроентеритів, а також гострих і хронічних запалень кишечника [5]. Відомо, що під час стресу збільшується кількість *NO* у клітинах слизової оболонки шлунка за рахунок активації *NO*-синтази. Його надлишок унаслідок зв'язування із залізо- та сірковмісними речовинами блокує утворення АТФ у мітохондріях, синтез ДНК та поділ

клітин [1]. За умов розвитку запалення активуються процеси ліпоксидзації на фоні зниження функціонування системи антиоксидантного захисту, що призводить до накопичення супероксид-радикала. У результаті взаємодії O^{2-} з NO утворюється високоактивний сильний окисник – пероксинітрит ($ONOO^-$), що виявляє значну цитотоксичну дію [15]. $ONOO^-$ може взаємодіяти з білками, ліпідами, вуглеводами та ДНК і через механізми окислення та нітрозилування змінювати структуру та функції цих компонентів, що призводить до оксидативного пошкодження тканин [3].

Але на сьогоднішній день у літературі немає однозначних даних щодо участі пероксинітриту у процесах ушкодження слизової оболонки шлунка у динаміці розвитку стрес-індукованих виразок. Тому мета даної роботи – оцінити активність NO -синтази та рівень пероксинітриту у гомогенаті клітин слизової оболонки шлунка щурів при розвитку стрес-індукованої виразки.

Матеріал і методи досліджень

Експерименти проведені на нелінійних білих щурах-самцях масою 250–280 г. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію. За добу до проведення експерименту тварини мали доступ лише до води. Експериментальну модель стресової виразки відтворювали шляхом занурення знерухомлених щурів у воду температурою $+23\text{ }^\circ\text{C}$ до рівня мечоподібного відростка груднини [20]. Візуально досліджували стан слизової оболонки шлунка, активність NO -синтази [12] та вміст пероксинітриту (флуоресцентний метод: спектрофлуорометр RF-1501 Shimadzu (Японія)) [4] за умов впливу стресового чинника протягом 0,5, 1, 2 та 3 годин. Вміст нітрит-іона у гомогенаті клітин слизової оболонки шлунка за умов розвитку стрес-індукованої виразки вимірювали за допомогою спектрофотометра, використовуючи реактив Грісса. Вміст білка у загальній фракції клітин слизової оболонки шлунка визначали методом Бредфорд [8]. Отримані результати порівнювали з даними, одержаними від контрольної групи тварин. Статистичну обробку результатів та побудову графіків проводили методами варіаційної статистики з використанням t -критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Активність NO -синтази у динаміці розвитку стрес-індукованих виразкових уражень слизової оболонки шлунка щурів статистично достовірно підвищується на 54, 234 та 485 % (30 хв., 1, 2 год. відповідно), досягаючи максимальних значень за тригодинного впливу стресового фактора (підвищення активності ферменту на 670 %) порівняно з контрольною групою тварин (рис. 1).

Підвищення активності NO -синтази призводить до накопичення оксиду азоту у тканині слизової оболонки шлунка (рис. 2).

Пошкоджувальна дія оксиду азоту проявляється через декілька механізмів, оскільки токсичним агентом може виступати як сам NO , так і продукти його перетворення. Внутрішньоклітинні мішені оксиду азоту – плазматичні мембрани та білки, що відповідають за транспорт речовин та передачу сигналу, мітохондрії, ядра тощо [6]. Оксид азоту, володіючи високою спорідненістю до залізо- і сірковмісних речовин, активно зв'язується з гемами (гемоглобіну, цитохромів тощо) та $Fe-S$ центрами (аконітаза, рибонуклеотидредуктазний комплекс) різних білків і у великих кількостях блокує важливі внутрішньоклітинні процеси, зокрема, утворення АТФ (які інгібують гліцеральдегід-фосфатдегідрогеназу та аконітазу) та синтез ДНК і поділ клітини (які інактивують рибонуклеотидредуктазний комплекс, необхідний для синтезу нуклеотидів). Крім того, NO може спричинювати розриви спіралей ДНК, утворення міжланцюгових зшивок

тощо, що є додатковим фактором загибелі клітини [9; 13]. Оскільки оксид азоту – доволі потужний вазодилатар, надмірні кількості *NO* можуть призводити до значного розслаблення судин слизової оболонки шлунка, унаслідок чого порушується її кровопостачання, що може бути однією з причин розвитку деструктивних уражень [11].

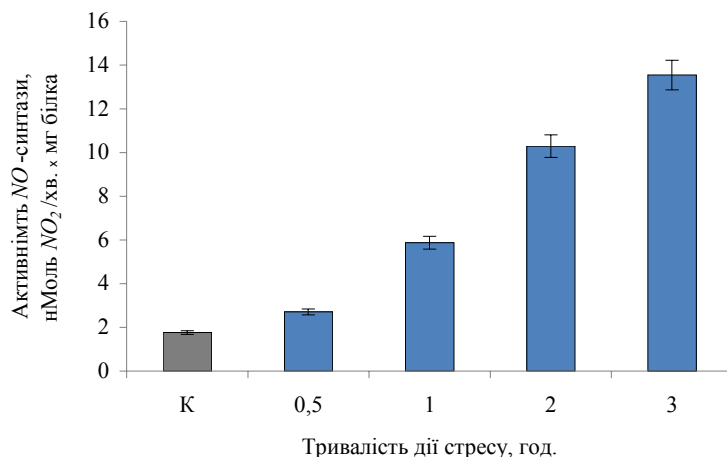


Рис. 1. Активність *NO*-синтази у слизовій оболонці шлунка щурів за умов дії стресового чинника: *K* – контроль, 0,5–3 – час вимірювання (год.); * – $p < 0,05$ відносно контролю (інтактні тварини)

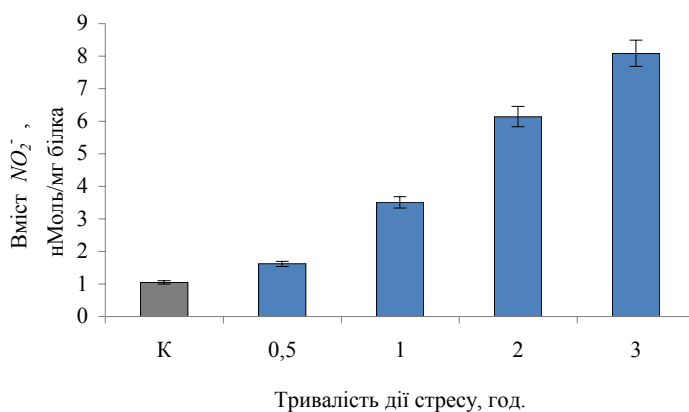


Рис. 2. Вміст нітрит-іона у гомогенаті клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов розвитку стрес-індукованої виразки: *K* – контроль, 0,5–3 – час вимірювання (год.); * – $p < 0,05$ відносно контролю (інтактні тварини)

Із літературних джерел відомо, що при запаленні спостерігається підвищення вмісту супероксиданіона ($O_2^{\cdot-}$). Такі процеси сприяють утворенню пероксинітриту – високотоксичної сполуки, що здатна ініціювати вільнорадикальні реакції [10]. Ці процеси можуть бути залученими до формування нейродистрофічних дефектів при ульцерогенезі, що було нами підтверджено при візуальному дослідженні слизової оболонки шлунка щурів.

Ми провели дослідження вмісту пероксинітриту за умов розвитку стрес-індукованих уражень слизової оболонки шлунка щурів. У результаті проведених досліджень встановлено, що за 1, 2, 3-годинної дії стресу вміст пероксинітриту у слизовій оболонці шлунка збільшувався відповідно на 20, 33 та 47 % порівняно з контрольною групою тварин (рис. 3).

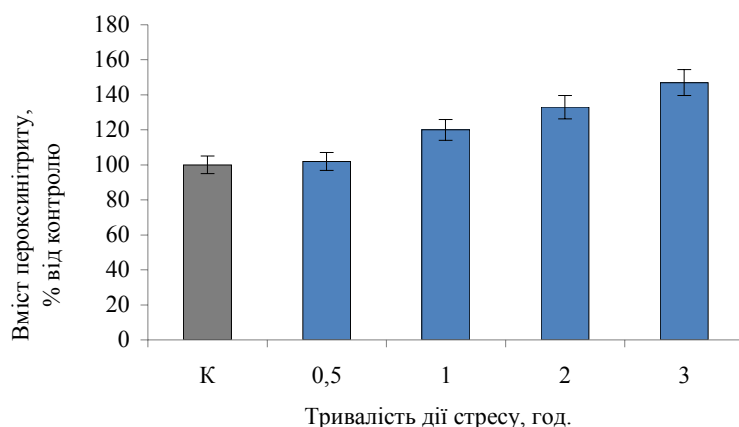


Рис. 3. Вміст пероксинітриту у гомогенаті клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов стресової моделі виразки: К – контроль; 0,5–3 – час вимірювання (год.)

Пероксинітрит, взаємодіючи з ліпідами, може спричинювати пероксидацію останніх, утворення нітротирозину при взаємодії $ONOO^-$ з тирозиновими залишками білків порушує їх функції, унаслідок чого відбуваються зміни клітинного метаболізму на всіх рівнях [17]. Показано, що формування пероксинітриту – основний шлях метаболізму NO . Кількість його залежить *in vivo* від релятивного надходження оксиду азоту та супероксид аніона у тканини, причому концентрації обох вільнорадикальних сполук мають бути приблизно однаковими [14]. Є відомості про те, що пероксинітрит стимулює колагеназу нейтрофілів людини (матричну металопротеїназу-8, MMP-8), яка відіграє важливу роль у руйнуванні та перебудові тканин як у фізіологічних умовах, так і при розвитку запалення та інфекції. Крім активації MMP-8, пероксинітрит легко інактивує тканинний інгібітор MMP та інгібітор протеїнази (еластази нейтрофілів) у плазмі крові людини. Таким чином, $ONOO^-$ прискорює пошкодження тканин і спричинює розвиток різних патологічних станів організму шляхом активації циклооксигенази, ключового ферменту синтезу простагландинів, які є сильними медіаторами запалення [22]. Крім того, за тривалої дії $ONOO^-$ на гладком'язові клітини судин спостерігається втрата останніми здатності нормально реагувати на фізіологічні подразники, внаслідок чого настає незворотна релаксація міоцитів. Такі процеси можуть призводити до порушення регіонарного кровотоку, що є ушкоджуючим фактором при ульцерогенезі [18].

Незважаючи на існування потужних тканинних механізмів детоксикації, у тому числі взаємодії $ONOO^-$ з тіолами та функціональними групами спиртів, $ONOO^-$ активує полі-(АДФ-рибозо)-синтазу і викликає зменшення кількості аденіндинуклеотидів (НАД⁺) та АТФ [21]. Слід зазначити, що за певних умов (наприклад, при нестачі коферменту ВН4) сама NO -синтаза продукує одночасно і NO , і супероксид, який теж є сильним окисником із високою реакційною здатністю [7].

Таблиця

Нейродистрофічні ураження слизової оболонки шлунка за дії стресу

Тривалість дії стресу, год	0,5	1	2	3
Кількість виразок	1 виразка в 1 шлунку	1,3 ± 0,28	5,0 ± 0,98	10,5 ± 1,7
Площа виразок, мм ²	2	2,2 ± 0,31	8,4 ± 1,78	17,7 ± 3,5

Цитотоксичні властивості оксиду азоту та продуктів його перетворення (пероксинітриту) було нами підтверджено при візуальному дослідженні слизової оболонки шлунка у динаміці розвитку стрес-індукованих уражень. За 30-хвилинного впливу

стресового фактора лише у одного щура з 10 виявилися 2 виразки загальною площею 2 мм², однак слизова оболонка при цьому була гіперемована. Збільшення тривалості дії стресового фактора призводило до зростання ступеня ураження тканин шлунка (табл.).

Висновки

За умов розвитку стресу підвищується активність синтази оксиду азоту. Це призводить до накопичення оксиду азоту у тканинах шлунка. Підвищення активності *NO*-синтази також супроводжується утворенням пероксинітриту. Показано участь *ONOO⁻* у процесах ушкодження слизової оболонки шлунка у динаміці розвитку стрес-індукованих виразок. Зі збільшенням тривалості дії стресу зростає вміст даного високоактивного окисника у гомогенаті клітин слизової оболонки шлунка щурів. Відповідно зростає і ступінь ураженості тканин шлунка. Отже, пошкоджувальна дія пероксинітриту підтверджується розвитком уражень слизової оболонки шлунка.

Бібліографічні посилання

1. **Брюне Б.** Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонистические сигнальные пути / Б. Брюне, К. Сандау, А. фон Кнетен // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 7–С. 966–975.
2. **Дорофейчук В. Г.** Нарушение сбалансированности факторов агрессии и защиты желудочного сока при обострении язвенной болезни / В. Г. Дорофейчук, Л. Г. Комарова, И. Б. Макарова // Педиатрия. – 1984. – № 7. – С. 40–42.
3. **Кіселик І. О.** Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології / І. О. Кіселик, М. Д. Луцик, Л. Ю. Шевченко // Лабораторна діагностика. – 2001. – № 3. – С. 43–45.
4. **Клебанов Г. И.** Изменение активности супероксиддисмутазы и содержания пероксинитрита в перитонеальных макрофагах, подвергнутых облучению *He-Ne* лазером / Г. И. Клебанов, Е. А. Полтанов, А. Н. Осипов // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 12. – С. 1623–1630.
5. **Маеда Х.** Оксид азота и кислотные радикалы при инфекции, воспалении и раке / Х. Маеда, Т. Акаике // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 1007–1019.
6. **Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций** / С. Я. Проскуряков, С. И. Бикетов, А. И. Иванников и др. // Иммунология. – 2000. – № 4. – С. 9–20.
7. **Реутов В. П.** *NO*-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота / В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 1029–1040.
8. **Шоно Н. И.** Метод определения белка по Бредфорд: область применения, преимущества, недостатки / Н. И. Шоно, Е. М. Баскаева // Лаб. дело. – 1980. – № 4. – С. 4–7.
9. **Boucher J. L.** Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for *L*-arginine utilization / J. L. Boucher, C. Moali, P. Tenu // Cell. Mol. Life Sci. – 1999. – Vol. 55. – P. 1015–1028.
10. **Dudzinski D. M.** Life history of eNOS: Partners and pathways // Cardiovascular Research. – 2007. – Vol. 5. – P. 247–260.
11. **Experimental** study on mechanism and protection of stress ulcer produced by explosive noise / G. S. Liu, Y. X. Huang, S. W. Li et al. // World J. Gastroenterology. – 1998. – Vol. 4, N 6. – P. 519–523.
12. **Hevel J. M.** Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein / J. M. Hevel, K. A. White, M. A. Marletta // J. Biol. Chem. – 1991. – Vol. 266. – P. 22789–22791.
13. **Interferon** (IFN)-alpha activation of human blood mononuclear cells *in vitro* and *in vivo* for nitric oxide synthase (NOS) type 2 mRNA and protein expression: possible relationship of induced NOS₂ to the anti-hepatitis C effects of IFN-alpha *in vivo* / A. I. Sharara, D. J. Perkins, M. A. Misukonis et al. // J. Exp. Med. – 1997. – Vol. 9, N 3. – P. 1495–1502.

14. **John P.** Crow dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species // Nitric Oxide: Biology and Chemistry. – 1997. – Vol. 1, N 2. – P. 145–157.
15. **Lamarque D.** Role of oxygen-derived metabolites in the rat gastric mucosal injury induced by nitric oxide donors / D. Lamarque, B. J. R. Whittle // European Journal of Pharmacology. – 1995. – Vol. 277. – P. 187–194.
16. **Martin M. J.** New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract / M. J. Martin, M. D. Jimenez, V. Motilva // Current Pharmaceutical Design. – 2001. – Vol. 7. – P. 881–908.
17. **Pfeiffer S.** Lack of tyrosine nitration by peroxynitrite generated at physiological *pH* / S. Pfeiffer, B. Mayer // The Journal of Biological Chemistry. – 1998. – Vol. 273, N 42. – P. 27280–27285.
18. **Role** of nitric oxide and peroxynitrite anion in lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats / Jun-Lin Zhou, Guo-Hua Jin, Yi-Ling Yi et al. // World J. Gastroenterol. – 2003. – Vol. 9, N 6. – P. 1318–1322.
19. **Roles** of inducible nitric oxide synthase in the development and healing of experimentally induced gastric ulcers / M. Tatemichi, T. Ogura, N. Sakurazawa et al. // Int. J. Exp. Path. – 2003. – Vol. 84. – P. 213–220.
20. **Takagi K.** Experimental stress and ulceration / K. Takagi, S. Okabe // Jpn. J. Pharmacol. – 1968. – Vol. 18. – P. 918–924.
21. **Uric acid**, a natural scavenger of peroxynitrite in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis / D. C. Hooper, S. Spitsin, R. B. Kean et al. // Medical Sciences. – 1998. – Vol. 95. – P. 675–680.
22. **Xia Y.** Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages / Y. Xia, J. L. Zweier // Medical Sciences. – 1997. – Vol. 94. – P. 6954–6958.

Надійшла до редакції 20.02.2009