

УДК 612.34.015.113:612.014.484].015.6

Т.І. Бондарчук

ВПЛИВ ВІТАМІНІВ С ТА Е НА ПРОЦЕСИ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ ТА АКТИВНІСТЬ NO-СИНТАЗНОЇ СИСТЕМИ В ПІДШЛУНКОВІЙ ЗАЛОЗІ ЩУРІВ НА ТЛІ АДРЕНАЛІН-ІНДУКОВАНОГО СТРЕСУ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Резюме. В експериментах досліджено вплив вітамінів (віт.) С та Е на процеси ліпопероксидації та активність NO-синтазної системи в підшлунковій залозі щурів на тлі адреналін-індукованого стресу. Встановлено, що віт. С за цих умов більшою мірою знижував вміст ТБК-активних продуктів і активність супероксиддисмутази порівняно з віт. Е, тоді як віт. Е чинив вираженіший вплив на зниження активності загальної NOS, eNOS і вмісту NO₂ у тканині підшлункової залози

порівняно з віт. С; активність iNOS ці вітаміни зменшували однаковою мірою. Спільна дія віт. С і Е на тлі адреналін-індукованого стресу знижувала активність загальної NOS та iNOS, а також вміст NO₂ більшою мірою порівняно із самостійним уведенням кожного з вітамінів, проте сумації їх впливу на досліджувані процеси не спостерігалось.

Ключові слова: вітамін С, вітамін Е, ліпопероксидація, супероксиддисмутаза, NO-синтазна система.

Вступ. Дія стресових чинників на організм людини активує розвиток оксидативних процесів: різко посилюється генерація активних форм кисню та радикалів жирних кислот, які чинять свою пошкоджувальну дію на перебіг клітинних реакцій і стан ДНК, порушують цілісність мембран клітин (ендотеліальних, секреторних, епітеліоцитів тощо), що призводить до формування деструктивних ушкоджень органів і підшлункової залози (ПЗ) у тому числі. При цьому відбувається зростання процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), змінюється активність компонентів системи антиоксидантного захисту (АОЗ) (як ферментативних – супероксиддисмутази (СОД), каталази, глутатіонпероксидази тощо), так і неферментативних – віт. С та Е [4]. Активовані нейтрофіли та моноцити, які інфільтрують тканину ПЗ, є джерелом продукції не лише активних форм кисню, а й прозапальних цитокінів (ІЛ-1b, ІЛ-8, ІFN-γ) і факторів росту (TNF-α), які активують синтез індукцйбельної NO-синтази (iNOS) з подальшим внутрішньоклітинним утворенням надмірної кількості нітрит-аніона NO₂ [12]. Останній взаємодіє із супероксидним аніоном з утворенням пероксинітриду, який порушує функції внутрішньоклітинних білків, плазматичної мембрани та мембран органел, структуру ДНК ацинарних і протокових клітин, острівців підшлункової залози [19].

Віт. С та Е відіграють важливу роль у регуляції механізмів цитопротекції, АОЗ і забезпеченні структурно-функціональної цілісності компонентів клітин. З джерел літератури відомий їх антиоксидантний та протизапальний вплив при окиснювальному ушкодженні клітин крові, нейро-, гепато- та нефротоксичних станах, експериментальному діабеті, експериментальній виразці шлунка та виразковому коліті. Вони запобігають розвитку окиснювального стресу, а у випадку його виникнення – зменшують активність його перебігу [6, 13].

Мета дослідження. Дослідити самостійну та поєднану дії віт. С та Е на процеси ПОЛ, актив-

ність системи АОЗ та L-аргінін / NO-синтази / NO₂ у тканині ПЗ щурів за умов адреналін-індукованого стресу (АІС).

Матеріал і методи. Дослідження проведені на 50 білих безпородних щурах-самцях масою 180-240 г і виконані згідно з правилами, передбаченими Європейською Комісією по нагляду за проведенням лабораторних досліджень з участю експериментальних тварин. Щури утримувалися на стандартному раціоні віварію. У день проведення досліду тварин не годували, забезпечуючи безперешкодний доступ до води.

Експериментальні тварини розподілені на п'ять груп: 1-ша група – інтактні, 2-га група – тварини, яким моделювали стрес шляхом уведення адреналіну (натще у дозі 2 мг/кг в/о) [2]; 3-тя група – щури, яким на тлі дії адреналіну вводили віт. С (ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», м. Харків, Україна) (в/о у дозі 200 мг/кг) [24]; 4-та група – щури, яким на тлі дії адреналіну вводили віт. Е (α-токоферол, «Sigma», USA) (в/м у дозі 150 мг/кг) [15]; 5-та група – щури, яким на тлі дії адреналіну одночасно вводили віт. С та Е у вищевказаних дозах. Препарати вводилися за півгодини до ін'єкції адреналіну. Через 24 години після уведення адреналіну під тіопенталовим знеболенням (40 мг/кг) щурів декапітували, проводили розтин по білій лінії живота та виділяли ПЗ, промивали її фізіологічним розчином і гомогенізували. У гомогенатах досліджували активність процесів ліпопероксидації за вмістом продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-активних продуктів) [8]; активність СОД [9]; активність NO-синтаз [7]; вміст NO₂ [17]. У плазмі крові визначали концентрацію L-аргініну [1]. Результати опрацьовано за методом варіаційної статистики з використанням програмного забезпечення ANOVA з визначенням t-критерію Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення. У тканині ПЗ АІС спричинював зростання вмісту ТБК-активних продуктів з 401±21,3 до 482,5±27,7 мкмоль/г (на 20 %, p<0,05) та активності СОД з 23,3±2,56 до 34,7±2,41 мкмоль/хв·мг (на 49 %,

$p < 0,05$). Посилення процесів ПОЛ виникає через зниження активності всіх ланок (ферментативних і неферментативних) АОЗ і в подальшому призводить до ушкодження тканини внаслідок руйнування клітинних мембран активними формами кисню [20].

Самостійна дія вітамінів на тлі АІС спричинювала зменшення процесів ліпопероксидації та зниження активності СОД. Так, введення віт. С на тлі АІС зменшувало вміст ТБК-активних продуктів на 20 % ($p < 0,05$) та активність СОД на 32 % ($p < 0,05$), тоді як віт. Е – на 20 % і 10 % відповідно. Отже, віт. С чинив вираженіший антиоксидантний ефект порівняно з віт. Е, що, ймовірно, пов'язано з різною локалізацією та механізмом дії цих вітамінів. Подібний ефект віт. С проявляв на тлі АІС у слизовій оболонці шлунка (СОШ) та товстої кишки [3]. Це можна пояснити як прямою антиоксидантною дією, що полягає у зв'язуванні активних форм кисню (супероксидного радикала, синглетного кисню, гідроксильного радикала (ОН \cdot), пероксинітриту (ONOO \cdot); гідрогену пероксиду (H $_2$ O $_2$), гіпохлоридної кислоти (HOCl)) у водній фазі клітини, так і опосередкованим антиоксидантним впливом віт. С, який спрямований на взаємодію з відновленим глутатионом, підтримання антиоксидантної функції віт. Е, а також відновлення N-нітрозоречовин [23]. Проте з джерел літератури відомо, що введення шурам віт. С на тлі деструктивних ушкоджень ПЗ, викликаних токсичною дією дихлориду дибутилолова викликало підвищення активності СОД і зниження вмісту ТБК-активних продуктів [10].

При спільному введенні віт. С та Е на тлі АІС не спостерігалось суматції їх ефектів на процесі ПОЛ: вміст ТБК-активних продуктів знижувався з $482,5 \pm 27,7$ до $435,9 \pm 10,7$ мкмоль/г (на 10 %). Аналогічні результати отримані в роботах по впливу цих вітамінів на процеси ліпопероксидації в СОШ щурів [5]. Активність СОД становила $32,7 \pm 1,8$ мкмоль/хв \cdot мг, досягнувши рівня СОД при АІС. У літературі є дані щодо посилення антиоксидантних процесів у тканині ПЗ на тлі поєднаної дії віт. С та Е [14].

АІС чинив суттєвий вплив на показники системи L-аргінін / NO-синтази / NO $_2$. За цих умов відзначалося трикратне зростання активності зага-

льної NOS ($p < 0,01$), активність iNOS підвищувалась у вісім разів ($p < 0,01$), а eNOS – на 31 % ($p > 0,05$) порівняно з показниками в інтактних тварин (табл.). Вміст NO $_2$ у тканині ПЗ зростав на 26 % ($p < 0,05$), за цих умов концентрація L-аргініну в плазмі крові знижувалася на 30 % ($p < 0,05$). Отримані нами результати збігаються з даними літератури і свідчать про те, що зростання активності iNOS, NO $_2$ та, відповідно, пероксинітриту свідчить про розвиток нітрозоксидативного стресу, що є одним із факторів розвитку деструктивних ушкоджень при стресі [21].

Уведення віт. С на тлі АІС зменшувало активність загальної NOS на 26 %, а активність iNOS – на 35 % ($p < 0,05$). Вміст NO $_2$ зменшився на 20 %, а концентрація L-аргініну в плазмі крові підвищилася на 32 % порівняно із самостійним впливом адреналіну. Отримані результати свідчать, що віт. С не тільки проявляє виражений антиоксидантний вплив, а й гальмує активність iNOS. У СОШ, за умов експериментальної виразки, віт. С знижував експресію iNOS, двох ключових прозапальних цитокінів – IL-1 β і TNF- α та активність NF κ B-сигнальної системи [11]. Інший механізм пов'язують із регуляторним впливом цього вітаміну на активність низки ферментів – ЦОГ-2, аденілатциклаз, tRAN-синтази, результатом чого є зниження експресії iNOS [22].

Віт. Е на тлі АІС більшою мірою (порівняно з віт. С) знижував активність загальної NOS – на 36 % ($p < 0,05$). При цьому активність eNOS зменшилася майже вдвічі, а iNOS – на 33 % ($p < 0,05$). На 25 % ($p < 0,05$) зменшився вміст NO $_2$ у тканині ПЗ, тоді як концентрація L-аргініну в плазмі крові підвищилася на 25 % порівняно із самостійним впливом адреналіну. Такий ефект віт. Е на активність NOS можна пояснити тим, що, з одного боку, вбудовуючись у ліпідний шар мембран клітин, він у такий спосіб зменшує ступінь деструктивних ушкоджень клітин, а з іншого – може зв'язувати пероксинітрит, синглетний кисень та інші молекули-радикали. Інший механізм дії віт. Е може бути пов'язаний з інгібуванням активності ЦОГ-2, IL-6, TNF- α [16, 18, 25, 26].

Поєднана дія віт. С і Е на тлі АІС призводила до зниження активності загальної NOS на

Таблиця

Вплив вітамінів С та Е на активність NO-синтазної системи в тканині підшлункової залози щурів на тлі адреналін-індукованого стресу (M \pm m)

Групи тварин (n = 10)	NOS нмоль/хв \cdot г білка	eNOS нмоль/хв \cdot г білка	iNOS нмоль/хв \cdot г білка	Нітрит-аніон мкмоль/л	L-аргінін мкг/мл
Інтактні	0,692 \pm 0,17	0,51 \pm 0,09	0,182 \pm 0,1	17,8 \pm 0,78	38,1 \pm 3,07
АД	2,07 \pm 0,15**	0,669 \pm 0,1	1,4 \pm 0,19**	22,5 \pm 1,6*	26,6 \pm 3,42*
АД + віт. С	1,53 \pm 0,13#	0,657 \pm 0,21	0,91 \pm 0,11#	18 \pm 2,16	35,2 \pm 2,2
АД + віт. Е	1,33 \pm 0,29#	0,38 \pm 0,18	0,94 \pm 0,19#	18,9 \pm 1,57	33,2 \pm 7,9
АД + віт. С + віт. Е	1,43 \pm 0,19#	0,63 \pm 0,2	0,83 \pm 0,21#	17,9 \pm 1,95#	32,5 \pm 6,28

Примітка. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ порівняно з показниками інтактних тварин; # - $p < 0,05$ порівняно з показниками при АІС

30 % ($p < 0,05$) та iNOS – на 41 % ($p < 0,05$). Активність eNOS залишалася при цьому на рівні показників при АІС. Вміст NO_2 у тканині ПЗ знизився на 31 % ($p < 0,05$), а концентрація L-аргініну в плазмі крові зросла на 22 %.

Висновки

1. У тканині підшлункової залози адреналін-індуковані зміни супроводжувалися зростанням вмісту ТБК-активних продуктів, активності супероксиддисмутази, індукцйбельної NO-синтази і вмісту NO_2 , при цьому концентрація L-аргініну в плазмі крові зменшувалася.

2. Вітамін С на тлі адреналін-індукованого стресу більшою мірою знижував вміст ТБК-активних продуктів і активність супероксиддисмутази порівняно з вітаміном Е; спільна дія цих вітамінів на тлі адреналін-індукованого стресу не викликала сумарних ефектів на процеси пероксидного окиснення ліпідів і активність ферментів антиоксидантного захисту.

3. Вітамін Е на тлі адреналін-індукованого стресу чинив вираженіший вплив на зниження активності загальної NO-синтази, ендотеліальної NO-синтази і вмісту NO_2 у тканині підшлункової залози порівняно з вітаміном С, тоді як активність індукцйбельної NO-синтази ці вітаміни зменшували однаковою мірою.

4. Спільна дія вітамінів С і Е на тлі адреналін-індукованого стресу знижувала активність загальної NO-синтази та індукцйбельної NO-синтази, а також вміст NO_2 більшою мірою порівняно із самостійним уведенням кожного з вітамінів, концентрація L-аргініну в плазмі крові зростала.

Перспективи подальших досліджень. До чинників, що можуть викликати порушення функціонального стану ПЗ, належить гострий стрес. Потребує поглибленого дослідження вивчення самостійної та поєднаної дії вітамінів-антиоксидантів (С і Е) на тлі водно-імобілізаційного стресу з оцінкою зміни активності аргінази та стану системи гідрогену сульфїду.

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 // Патол. физиол. и эксперим. мед. – 1988. – № 1. – С. 24-27.
3. Вплив вітаміну С на антиоксидантні та цитопротекторні процеси у органах травної системи за умов експериментальної виразки шлунка / І.Б. Грюк, Н.Р. Шамро, В.С. Журомський [та ін.] // Эксперим. та кліні. фізіол. і біохімія. – 2010. – № 2 (50). – С. 50-56.
4. Скляр О.Я. Основи гастроентерології / О.Я. Скляр, Є.Р. Косий, Є.Я. Скляр. – Львів, Кварт, 2011. – 289 с.
5. Скляр О.Я. Поєднана дія вітамінів Е та С на антиоксидантні та цитопротекторні механізми при експериментальній виразці шлунка / О.Я. Скляр, В.С. Журомський // Эксперим. та кліні. фізіол. та біохімія. – 2009. – № 2. – С. 21-26.

6. Скляр О. Я. Роль NO-синтазної системи та процесів ліпопероксидації в цитопротекторних механізмах за умов ульцерогенного коліту / О.Я. Скляр, Н.Б. Панасюк, О.Р. Джура // Эксперим. та кліні. фізіол. та біохімія. – 2009. – № 1. – С. 38-45.
7. 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. токсикол. – 2000. – № 3. – С. 3-7.
8. Тимурбулатов М. А. Метод повышения свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / М. А. Тимурбулатов, Е.И. Селезнев // Лаб. дело. – 1981. – № 4. – С. 209-211.
9. Чевари С. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте / С. Чевари, Т. Андял, Я. Штрэнгер // Лаб. дело. – 1991. – № 10. – С. 9-13.
10. Ascorbic acid alleviates pancreatic damage induced by dibutyltin dichloride (DBDC) in rats / Xin-Liang Lu, Yan-Hua Song, Yan-Biao Fu [et al.] // Yonsei Med. J. – 2007. – Vol. 46, № 6. – P. 1028-1034.
11. Ascorbic acid attenuates aspirin-induced gastric damage: role of inducible nitric oxide synthase / P.C. Konturek, J. Kania, E.G. Hahn [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. – 2006. – Vol. 57, suppl. 5. – P. 125-136.
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 J. of Gastroenterology. – 2010. – Vol. 16, № 44. – P. 5565-5581.
13. Combined vitamins (C and E) and insulin improve oxidative stress and pancreatic and hepatic injury in alloxan diabetic rats / K. Hamden, M.A. Boujbiha, H. Masmoudi [et al.] // Biomed Pharmacother. – 2009. – Vol. 63, № 2. – P. 95-99.
14. Comparison of antioxidative and antifibrotic effects of α -tocopherol with those of tocotrienol-rich fraction in a rat model of chronic pancreatitis / F. Jiang, Z. Liao, L.H. Hu [et al.] // Pancreas. – 2011. – Vol. 40, № 7. – P. 1091-1096.
15. Effect of various doses of palm vitamin E and tocopherol on aspirin-induced gastric lesions in rats / K. Jaarin, M.T. Gapor, M.I. Nafeeza [et al.] // Int. J. Exp. Pathol. – 2002. – Vol. 83, № 6. – P. 295-302.
16. Garg M.C. Effect of vitamin E supplementation on diabetes induced oxidative stress in experimental diabetes in rats / M.C. Garg, D.P. Chaudhary, D.D. Bansal // Indian J. Exp Biol. – 2005. – Vol. 43, № 2. – P. 177-180.
17. 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.
18. Li X.C. α -Tocopherol treatment ameliorates chronic pancreatitis in an experimental rat model induced by trinitrobenzene sulfonic acid / X.C. Li, X.L. Lu, H.H. Chen // Pancreatol. – 2011. – Vol. 11, № 1. – P. 5-11.
19. Matthew J. di Magno. Nitric oxide pathways and evidence-based perturbations in acute pancreatitis / J. di Magno Matthew // Pancreatol. – 2007. – № 7. – P. 403-408.
20. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors / V. Mollace, C. Muscoli, E. Masini [et al.] // Pharmacol Rev. – 2005. – Vol. 57, № 2. – P. 217-252.
21. Role of endogenous nitric oxide in mucosal defense of inflamed rat stomach following iodoacetamide treatment / H. Nishio, Y. Hayashi, S. Terashima [et al.] // Life Sciences. – 2006. – Vol. 79, № 16. – P. 1523-1530.
22. Smith G.V. The effect of ascorbic acid on Helicobacter pylori induced cyclooxygenase 2 expression and prostaglandin E₂ production by gastric epithelial cells in vitro / G.V. Smith, M.J.G. Farthing // Helicobacter. – 2005. – Vol. 10, № 1. – P. 83-89.

23. Sroka Z. Low-molecular antioxidant compounds of natural origin / Z. Sroka, A. Gamian, W. Cisowski // Postepy Hig. Med. Dosw. – 2005. – № 59. – P. 34-41.
24. The effects of methidathion on lipid peroxidation and some liver enzymes: role of vitamins E and C / L. Altuntas, N. Delibas, M. Demirci [et al.] // Arch. Toxicol. – 2002. – Vol. 76, № 8. – P. 470-473.
25. Vitamin E alters inflammatory gene expression in alcoholic chronic pancreatitis / T.H. Monteiro, C.S. Silva, L.M. Cordeiro Simões Ambrosio [et al.] // J. Nutrigenet Nutrigenomics. – 2012. – Vol. 5, № 2. – P. 94-105.
26. Vitamin E protects against stress-induced gastric mucosal lesions in rats more effectively than vitamin C / Y. Ohta, Y. Imai, S. Kaida [et al.] // Biofactors. – 2010. – Vol. 36, № 1. – P. 60-69.

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНОВ С И Е НА ПРОЦЕССЫ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ И АКТИВНОСТЬ NO-СИНТАЗНОЙ СИСТЕМЫ В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ КРЫС НА ФОНЕ АДРЕНАЛИН-ИНДУЦИРОВАННОГО СТРЕССА

Т.И. Бондарчук

Резюме. В экспериментах на крысах изучено влияние витаминов С и Е на процессы липопероксидации и активность NO-синтазной системы поджелудочной железы на фоне адреналин-индуцированного стресса. Установлено, что витамин С в этих условиях в большей степени снижал содержание ТБК-активных продуктов и активность супероксиддисмутазы в сравнении с витамином Е, тогда как витамин Е осуществлял более выраженное влияние на снижение активности общей NOS, eNOS и содержания NO₂ в ткани поджелудочной железы в сравнении с витамином С; активность iNOS эти витамины уменьшали в одинаковой степени. Совместное действие витаминов С и Е на фоне адреналин-индуцированного стресса снижало активность общей NOS и iNOS, а также содержание NO₂ больше, чем каждый из витаминов в отдельности, но суммации их влияния на изучаемые процессы не наблюдалось.

Ключевые слова: витамин С, витамин Е, липопероксидация, супероксиддисмутазы, NO-синтазная система.

INFLUENCE OF VITAMINS C AND E ON LIPID PEROXIDATION PROCESSES AND THE ACTIVITY OF NO-SYNTASE SYSTEM IN PANCREAS OF RATS WITH THE EPINEPHRINE-INDUCED STRESS

Т.И. Bondarchuk

Abstract. Influence of vitamins (Vit) C and E on the lipid peroxidation processes and activity of NO-synthase system in the pancreas of rats with the epinephrine-induced stress was studied. It was ascertained that Vit C decreased TBA-active products content as well as superdismutase activity more than Vit E under the same conditions. However the decrease of general NOS, eNOS activities and the content of NO₂⁻ was more considerable in group with Vit E as compared to the action of Vit C. Both vitamins decreased the activity of iNOS equally. Combined action of Vit C and E under condition of epinephrine-induced stress reduced activity of general NOS and iNOS and the content of NO₂⁻ more substantially from those treated with Vit independently, however there was no summation of their effects on studied processes.

Key words: vitamin C, vitamin E, lipid peroxidation, superoxide dismutase, NO-synthase system.

Danylo Halytskyi National Medical University (Lviv)

Рецензенти: проф. І.Ф. Мещишен

доц. К.М. Хлус

Buk. Med. Herald. – 2014. – Vol. 18, № 2 (70). – P. 14-17

Надійшла до редакції 19.02.2014 року