

УДК 612.015.113:616.33-002.44]-019-084

О.П. Хаврона

ВПЛИВ ПОДВІЙНОГО ІНГІБІТОРУ ЦОГ-2/5-ЛОГ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ СИСТЕМИ L-АРГІНІН/NO У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ВИРАЗЦІ ШЛУНКА

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

Резюме. Значне поширення виразкової хвороби шлунка зумовлює пошук нових ефективних гастропротективних засобів, які б володіли антиоксидантними властивостями. Встановлено, що розвиток захворювання супроводжується дисбалансом у системі L-аргінін-NO, що проявляється активацією NO-синтазного шляху метаболізму L-аргініну і супроводжується надмірним утворенням оксиду азоту. Доведено, що застосування

подвійного інгібітору ЦОГ-2/5-ЛОГ нормалізує порушення в системі L-аргінін/NO, що вказує на антиоксидантні та цитопротекторні властивості досліджуваної речовини.

Ключові слова: L-аргінін, оксид азоту, аргіназа, NO-синтаза, подвійний інгібітор ЦОГ-2/5-ЛОГ.

Вступ. Значне поширення виразкової хвороби шлунка, а також наявність ульцерогенного впливу на органи травного каналу більшості сучасних нестероїдних протизапальних препаратів [14] зумовлює пошук нових лікарських засобів із гастропротекторними властивостями. Останнім часом значний інтерес викликають дослідження препаратів, які є інгібіторами прозапальних ферментів, що спричинюють активацію та підвищення кількості медіаторів запальних процесів. Одним із таких інгібіторів є дарбуфелон – нестероїдний протизапальний препарат, який здатний інгібувати одночасно циклооксигеназу-2 (ЦОГ-2) і 5-ліпооксигеназу (ЛОГ-5). Дарбуфелон створений з метою досягнення протизапального ефекту класичних нестероїдних протизапальних препаратів, але дозволяє уникнути побічних дій останніх [7].

На сьогоднішній день досить інтенсивно вивчається участь оксиду азоту (NO) у патогенезі захворювань органів травного каналу [8]. Показано, що за фізіологічних умов оксид азоту є унікальним модулятором багатьох фізіологічних процесів у шлунково-кишковому тракті, діє як ендогенний медіатор, відповідає за підтримання цілісності та відновлення тканин, виявляє гастропротекторні властивості, запобігаючи ураженню слизових оболонок від різноманітних пошкоджувальних чинників [13, 18]. Результати останніх досліджень дали можливість припустити, що активація синтази оксиду азоту (NO-синтази) і надмірна кількість NO проявляє як захисні, так і цитотоксичні властивості і є однією з причин розвитку виразки шлунка, хронічного гастриту, онкопатології, бактеріальних гастроентеритів [9]. Але на даний момент не існує єдиної думки щодо участі різних ланок системи оксиду азоту в механізмах розвитку і загоєння уражень слизових оболонок травного каналу щурів.

Мета дослідження. Вивчити вплив подвійного інгібітору ЦОГ-2/5-ЛОГ на функціонування системи L-аргінін/NO у сироватці крові щурів при експериментальній виразці шлунка (ЕВШ).

Матеріал і методи. Експерименти проводилися на 40 нелінійних статевозрілих щурах-

самцях масою 180-220 г. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. Експериментальну виразку шлунка викликали інтраперитонеальним введенням адреналіну (у дозі 2 мг/кг) методом Н.І. Белостоцького [3]. Тварин розподілено на три групи: I – 7 інтактних щурів, II – 13 щурів з ЕВШ, III – 20 щурів, яким вводили 2-аміно-5-(3,5-дитертбутил-4-гідроксibenзиліден)-тіазол-4-ідин (2A5DHT) у дозі 10 мг/кг, який за своєю структурою ідентичний селективному блокатору ЦОГ-2/5-ЛОГ дарбуфелону. Речовину вводили перорально за 30 хвилин до моделювання виразки. Декапітацію проводили через 24 години після введення адреналіну на тлі уретанового знеболення згідно з вимогами біоетики. Для дослідження використовували сироватку крові, яку одержували шляхом центрифугування негепаринізованої цільної крові при 1000 об/хв упродовж 15 хв. Активність NO-синтаз визначали за методом Сумбаєва В.В. [12], вміст нітрит-аніона – за методом Green L.C. [17], концентрацію L-аргініну – за методом Храмова В.А. [1], активність аргінази – за методом Geyer J.W. [15]. Одержані результати статистично опрацьовані за t-критерієм Стьюдента за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 8.0.

Результати дослідження та їх обговорення. Відомо, що обмін L-аргініну може здійснюватися в організмі шляхом окисного перетворення за участю NOS до NO та L-цитруліну і неокисного – за участю аргінази до сечовини та орнітину. Співвідношення між цими ензимами забезпечує в клітинах певний фізіологічний пул L-аргініну, а також генерацію активних форм азоту [10].

Оксид азоту належить до активних метаболітів кисню. При патологічних станах NO, що утворюється в надмірній кількості, має виражену цитотоксичну дію внаслідок утворення пероксинітриту – продукту взаємодії NO та супероксиданіон-радикала, здатного до деструкції практично всіх компонентів клітини [4]. Оскільки оксид азоту – потужний вазодилататор, надмірні кількості NO можуть призводити до значного розслаблення судин слизових оболонок травного кана-

Таблиця

Зміна показників системи L-аргінін/ NO у сироватці крові щурів при ЕВШ за умов блокування ЦОГ-2/5-ЛОГ (M±m)

Показники	1-ша група (контроль)	2-га група (ЕВШ)	3-тя група (ЕВШ+дарбуфелон)
NO ₂ , мкмоль/л	15,30±2,19	26,42±0,93*	19,82±1,60**
L-аргінін, мкмоль/мл	42,90±8,01	29,31±2,16*	36,62±3,93**
Аргіназа, мкмоль/хв мг	0,32±0,05	0,19±0,06*	0,22±0,04
iNOS, мкмоль/хв мг	11,07±2,89	135,40±20,67*	80,81±12,62**
eNOS, мкмоль/хв мг	30,60±6,04	28,71±5,09	42,44±8,04**

Примітка. * Розбіжності достовірні при порівнянні з показником контролю; ** з показником при ЕВШ (P<0,05)

лу, унаслідок чого порушується їх кровопостачання, що може бути однією з причин розвитку деструктивних уражень [20].

Концентрація нітрит-аніона, який є кінцевим метаболітом пероксинітриду, відображає рівень останнього в сироватці крові. Встановлено, що рівень нітрит-аніона зростає у групі тварин з ЕВШ у 1,7 раза порівняно з контролем (табл.). Проте концентрація нітрит-аніона в групі тварин, яким уводили подвійний інгібітор ЦОГ-2/5-ЛОГ, порівняно з тваринами 2-ї групи, знижувалася в 1,2 раза, що вказує на протекторну дію 2A5DHT.

Одним із можливих механізмів зниження синтезу NO є зменшення клітинного пулу субстрату NOS – L-аргініну [19]. L-аргінін є проміжною сполукою синтезу сечовини, багатьох білків та оксиду азоту (II), який за необхідності виконує функцію антиоксидантного захисту [2, 6, 11, 16]. Визначення концентрації вільного L-аргініну дало змогу оцінити його витрати на синтез NO (табл.1). Встановлено, що у тварин 2-ї групи вміст L-аргініну знизився в 1,5 раза порівняно з контролем. Виявлене нами зниження може бути наслідком порушення надходження його до клітини або активацією аргінази [5]. Уведення 2A5DHT призводило до підвищення вмісту L-аргініну в сироватці крові щурів майже до рівня контрольних величин.

Оскільки L-аргінін є субстратом NOS та аргінази, було важливо дослідити як змінюється співвідношення окисного та неокисного шляхів метаболізму цієї амінокислоти при патологічному процесі. Фізіологічна роль аргінази і її участь у численних метаболічних перетвореннях свідчить, що вона належить до важливої ланки в розвитку багатьох патологічних станів організму. У наших дослідженнях при ЕВШ активність аргінази знижується в 1,7 раза (табл. 1). Отримані результати показують, що за умов ЕВШ пригнічується неокисний шлях метаболізму L-аргініну. Цікаво, що введення подвійного інгібітору ЦОГ-2/5-ЛОГ вірогідно не змінювало активності аргінази, вона залишалася майже на рівні величин при ЕВШ.

Визначали активність ізоферментів NO-синтази – ендотеліальної та індуцибельної NO-

синтаз (табл. 1). Виявлено, що активність iNOS зростала у 12,2 раза у тварин 2-ї групи порівняно з контролем. Проте при подвійному блокуванні ЦОГ-2/5-ЛОГ активність iNOS знижується в 1,7 раза. Результати свідчать про високий вміст прозапальних цитокінів, які стимулюють активність даного ферменту, особливо у тварин 2-ї групи та зниження їх концентрації при пригніченні запалення.

Активність eNOS у тварин 2-ї групи достовірно не відрізнялася від контрольних величин, проте при застосуванні подвійного інгібітору ЦОГ-2/5-ЛОГ зростала і навіть перевищувала контрольні величини. Імовірно, введення цієї речовини сприяє активації eNOS, за рахунок чого мала б зростати вазодилатація і покращуватися живлення тканин. Можливо, така зміна є відображенням адаптації клітин до вазоконстрикції, що супроводжує запалення.

Висновки

1. Показано, що розвиток експериментальної виразки шлунка супроводжується дисбалансом у системі L-аргінін-NO, що проявляється порушенням співвідношення NO-синтазного та аргіназного метаболізму L-аргініну на тлі активації окисного шляху, що експериментально підтверджується підвищенням активності iNOS на тлі одночасного зниження активності аргінази. Відповідно до цього виявлено зростання вмісту NO та зниження L-аргініну.

2. Застосування подвійного інгібітору ЦОГ-2/5-ЛОГ сприяє нормалізації порушень у системі L-аргінін/NO за умов ЕВШ, що супроводжувалося зниженням активності iNOS, вмісту нітрогену оксиду та зростання вмісту L-аргініну. Це вказує на антиоксидантні та цитопротекторні властивості досліджуваної речовини.

Перспективи подальших досліджень. У подальших дослідженнях планується застосовувати для лікування експериментальної виразкової хвороби інші препарати (інгібітори прозапальних ензимів, регуляторні пептиди) та провести порівняльну характеристику їх дії на метаболічні порушення, які виявлені при досліджуваній патології.

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. Алмакаева Л.Г. Аргинин и его применение в медицине и фармации / Л.Г. Алмакаева, Е.В. Литвинова // Ліки України. – 2011. – № 1 (5) – С. 23-26.
3. 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.
4. Бродяк І.В. Особливості метаболізму L-аргініну в лейкоцитах крові за умов експериментального цукрового діабету / І.В. Бродяк, Н.О. Сибірна // Фізіол. ж. – 2008. – Т. 54, № 1. – С. 63-68.
5. Вплив L-аргініну на функціональну активність ендотелію за умов експериментального цукрового діабету / В. Сагач, О. Присяжна, М. Ткаченко [та ін.] // Фізіол. ж. – 2005. – Т. 51, № 2. – С. 3-7.
6. Галкин Б.Н. Антиоксидические свойства аргинина / Б.Н. Галкин // Современ. пробл. токсикол. – 2003. – № 1. – С. 80-86.
7. Зіменковський Б.С. 4-гіазолідони. Хімія, фізіологічна дія, перспекиви / Б.С. Зіменковський, Р.Б. Лесик. – Вінниця: НОВА КНИГА, 2004. – 106 с.
8. Максимович Я. Оксид азоту в патогенезі виразки шлунка / Я. Максимович, О. Дробінська, Ю. Гавриленко // Вісн. Київ. Нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка. Серія «Біологія». – 2007. – № 49-50. – С. 73-75.
9. Максимович Я.С. Роль ізоформ синтази оксиду азоту в ульцерогенезі / Я.С. Максимович, О.В. Дробінська, Л.І. Остапченко // Фізика живого. – 2008. – Т. 16, № 1. – С. 130-134.
10. Перетятко Ю.В. Особливості аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму L-аргініну в лейкоцитах периферичної крові щурів за хронічного рентгенівського опромінення / Ю.В. Перетятко, Н.О. Сибірна // Укр. біохім. ж. – 2009. – Т. 81, № 2. – С. 40-48.
11. Степанов Ю.М. L-аргинин: свойства, применение в медицине, токсичность и аргинин-индуцированное поражение поджелудочной железы / Ю.М. Степанов, И.В. Твердохлеб, О.Ю. Сиренко // Сучасна гастроентерол. – 2012. – № 3 (65). – С. 63-70.
12. Сумбаев В.В. Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс / В.В. Сумбаев, И.М. Ясинская // Современ. пробл. токсикол. – 2000. – № 3. – С. 3-7.
13. Склярів О.Я. Роль NO-синтазної системи та процесів ліпопероксидації в цитопротекторних механізмах за умов ульцерогенного коліту / О.Я. Склярів, Н.Б. Панасюк, О.Р. Джура // Експерим. та клініч. фізіол. та біохімія. – 2009. – № 1. – С. 38-45.
14. Щокіна К.Г. Експериментальне обґрунтування раціонального вибору сучасних і перспективних препаратів з протизапальною дією: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фарм. наук: 14.03.05/ Національний фарм. університет. – Харків, 2006. – 20 с.
15. Geyer J.W. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates / J.W. Geyer, D. Dabich // Anal. Biochem. – 1971. – Vol. 39, № 2. – P. 412-417.
16. Granic V.G. Metabolism of L-arginine (A Review) / V.G. Granic // Pharmaceutical Chemistry J. – 2003 – Vol. 37, № 3. – P. 111-138.
17. Green L.C. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids / L.C. Green, A.V. David, J. Glogowski // Analytical Biochemistry. – 1982. – Vol. 126. – P. 131-138.
18. Central ghrelin gastroprotection involves nitric oxide/prostaglandin cross-talk / V. Sibilia, F. Pagani, G. Rindi [et al.] // British J. of Pharmacology. – 2008. – № 154 (3). – P. 688-697.
19. Crowell J. Is inducible nitric oxide synthase a target for chemoprevention? / J. Crowell, V. Steele, C. Sigman // Mol. cancer therap. – 2003. – № 2. – P. 815-823.
20. 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.

ВЛИЯНИЕ ДВОЙНОГО ИНГИБИТОРА ЦОГ-2/5-ЛОГ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ L-АРГИНИН/NO В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЯЗВЕ ЖЕЛУДКА

О.П. Хаврона

Резюме. Значительное распространение язвенной болезни желудка обуславливает поиск новых эффективных гастропротективных средств, владеющих антиоксидантными свойствами. Установлено, что развитие заболевания сопровождается дисбалансом в системе L-аргинин/NO, что проявляется активацией NO-синтазного пути метаболизма L-аргинина и сопровождается чрезмерным образованием оксида азота. Показано, что использование двойного ингибитора ЦОГ-2/5-ЛОГ нормализует нарушения в системе L-аргинин/NO, что указывает на антиоксидантные и цитопротекторные свойства исследуемого вещества.

Ключевые слова: L-аргинин, оксид азота, аргиназа, NO-синтаза, двойной ингибитор ЦОГ-2/5-ЛОГ.

INFLUENCE OF THE DUAL COX-2/5-LOG INHIBITOR ON THE ACTIVITY OF L-ARHININ/NO SYSTEM IN RAT'S BLOOD WITH EXPERIMENTAL ULCER OF THE STOMACH

O.P. Khavrona

Abstract. A large spread of stomach ulcer causes the search for new effective gastroprotective drugs, which would possess antioxidant properties. It is established that the disease is accompanied by the imbalance in the system L-arginin/NO. This is manifested by the activation of the NO-synthase pathway of L-arginine and is accompanied by excessive formation of nitric oxide. It is proved that the use of dual inhibitor COX-2/5-LOG normalizes deviation in the L-arginin/NO system. This shows antioxidant and cytoprotective properties of the substance.

Key words: L-arginine, nitric oxide, arginase, NO-synthase, COX-2/5-LOG inhibitor.

Danylo Halytskyi National Medical University (Lviv)

Рецензент – проф. І.Ф. Мещишен

Buk. Med. Herald. – 2014. – Vol. 18, № 2 (70). – P. 249-251

Надійшла до редакції 24.02.2014 року