

І.С. Фоменко, Т.І. Бондарчук, Л.П. Білецька, Н.Б. Панасюк, О.Я. Склярів

Показники NO-синтазної системи у слизовій оболонці шлунка щурів за умов стресу та пригнічення циклооксигенази

У дослідях на щурах з модельованим водно-імобілізаційним стресом вивчено вплив нестероїдних протизапальних препаратів різного генезу на морфологічний стан слизової оболонки шлунка та зміни показників NO-синтазної (NOS) системи. Показано, що введення неселективного інгібітора циклооксигенази – напроксену на тлі стресу у щурів потенціувало розвиток структурно-геморагічних уражень слизової оболонки шлунка, при цьому активність обидвох ізоформ NOS (індуцибельної та конститутивної) знижувалась, а процеси ліпопероксидації залишалися на рівні показників при водно-імобілізаційному стресі. Показано переваги використання H_2S -зв'язаного нестероїдного протизапального препарату АТВ-346, він за умов стресу демонстрував знижену гастротоксичність. Проте показники NO-синтазної системи за умов його дії доводять домінуючий вплив базової молекули (напроксену) у регуляції функціонування NOS. Введення інгібітора подвійної дії ЦОГ/ЛОГ, сполуки 2A5DHT, зменшувало структурно-геморагічні ушкодження порівняно з впливом напроксену; при цьому активність індуктибельної NOS залишалася значно вищою.

Ключові слова: нестероїдні протизапальні препарати, стрес, оксид азоту, слизова оболонка шлунка.

ВСТУП

Виразкова хвороба шлунка виникає внаслідок дисбалансу чинників агресії та захисних механізмів. Серед перших чільне місце посідають нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), гострий і хронічний стрес.

Механізм дії усіх НПЗП полягає у інгібуванні циклооксигенази (ЦОГ), відповідальної за синтез простагландинів [2]. Саме з інгібуванням синтезу останніх пов'язують підвищену гастротоксичність НПЗП, адже простагландини у фізіологічних концентраціях мають гастропротективну дію. НПЗП реалізують свій вплив, взаємодіючи з двома ізоформами ЦОГ: ЦОГ-1 – ензимом, що конститутивно експресується у більшості тканин та ЦОГ-2, експресія якого значно зростає при запаленні. Більшість існуючих НПЗП (аспірин, диклофенак, напроксен тощо) неселективно пригнічують обидві ізоформи ензиму, внаслідок чого фізіологічні ефекти

простагландинів, що продукуються ЦОГ-1, нівелюються і, як наслідок, розвивається виразка шлунка [6].

Одним із напрямків пошуку нових НПЗП – створення засобів, спроможних одночасно інгібувати ЦОГ та ліпооксигеназу (ЛОГ). Найперспективнішим є створення НПЗП зі зв'язаним сульфідом водню (H_2S). Найкраще описаним із існуючих нині H_2S -зв'язаних НПЗП є АТВ-346, що у попередньо проведених дослідженнях на тваринах виявив протизапальні властивості, притаманні напроксену й не чинив побічних ефектів, які мають НПЗП [15].

Стрес – ще один із факторів ульцерогенезу слизової оболонки шлунка (СОШ), що пояснюється впливом комбінації чинників, серед яких провідним є катехоламіни. За таких умов зростає експресія як NO-синтаз (NOS), так і ЦОГ-2. Часто пацієнти з больовими синдромами, що приймають НПЗП,

© І.С. Фоменко, Т.І. Бондарчук, Л.П. Білецька, Н.Б. Панасюк, О.Я. Склярів

потрапляють у стресову ситуацію, внаслідок чого поєднуються дії двох чинників ульцерогенезу й ризик розвитку виразкової хвороби, ускладненої кровотечами та перфораціями, значно зростає [8].

Мета нашої роботи – дослідити вплив різних за механізмом дії НПЗП: неселективного ЦОГ – інгібітора напроксену, H_2S -зв'язаного НПЗП АТВ-346 та інгібітора подвійної ЦОГ-2/5-ЛОГ активності, сполуки 2-аміно-5-(3,5-дитертбутил-4-гідроксибензилден)-тіазол-4-один (2A5DHT), яка за своєю структурою ідентична селективному блокатора ЦОГ-2/5-ЛОГ дарбуфелону, на процеси ліпопероксидації та стан NOS-системи у СОШ за умов водно-імобілізаційного стресу (ВІС) у щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження виконано на 42 щурах згідно з міжнародними умовами проведення експериментів з лабораторними тваринами. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію. Для проведення досліду їх не годували, забезпечували безперешкодний доступ до води.

Тварин було розподілено на 5 груп. До I групи ввійшли інтактні щури, до II – щури, яким модельованим ВІС (імобілізація тварин у пластиковому контейнері, після чого останній занурювали вертикально у воду при $23 \pm 0,5^\circ C$ до рівня мечоподібного відростка упродовж 5 год) [14]. Тваринам III, IV і V груп на тлі ВІС вводили напроксен, АТВ-346 і 2A5DHT відповідно в дозі 10 мг/кг *per os* за 30 хв до моделювання стресу. Забір матеріалу для досліджень проводили під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг).

У гомогенатах СОШ визначали активність NOS [3], аргінази [7], у плазмі крові – L-аргініну [1]. Процеси ліпопероксидації аналізували за вмістом продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК) [4].

Оцінку площі та ступеня структурно-геморагічних змін СОШ проводили методом планіметрії [13]. Диференційно макроско-

пічно ураження СОШ оцінювали в балах: 1) наявність гіперемії – 2 бали; 2) наявність нальоту і дрібних крововиливів – 4 бали; 3) наявність нальоту та поверхневої ерозії – 6 балів; 4) глибока ерозія або кілька ерозій – 8 балів; 5) наявність виразки – 10 балів; 6) наявність виразки, ерозій, крововиливів – 12 балів.

Результати оброблено з використанням пакету Statistika 7,0 ANOVA з апостеріорним попарним порівнянням груп.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під дією ВІС у тварин розвивалися гострі структурно-геморагічні ураження (СГУ) СОШ, представлені глибокими ерозіями, виразками, крововиливами. Середня площа СГУ поверхні СОШ становила $31,5 \pm 7,1$ мм², індекс деструктивних ушкоджень – $5,2 \pm 0,6$ бала (рис.1). Введення напроксену за 30 хв до моделювання ВІС потенціувало розвиток СГУ, площа ушкоджень зростала у 2,5 раза ($P < 0,01$). У разі введення АТВ-346 цей показник був суттєво нижчим (на 27 %) порівняно з дією напроксену, проте на 82 % вищим, ніж за умов ВІС. При подвійному інгібуванні ЦОГ-2/5-ЛОГ сполукою 2A5DHT площа ушкодження становила $36,5 \pm 6,2$ мм², а індекс – $4,8 \pm 0,6$ бала, тобто ці показники були практично на рівні значень ВІС.

У контрольних тварин активність загальної NOS становила $5,7 \pm 2,3$, iNOS – $1,58 \pm 0,73$ та cNOS – $4,13 \pm 1,48$ нмоль/хв·г, активність аргінази – $0,35 \pm 0,07$ мкмоль/хв·г, а концентрація L-аргініну в плазмі крові – $39,7 \pm 4,8$ мкмоль/мл, що узгоджується з даними літератури про домінуючу регульовальну роль cNOS/NO за фізіологічних умов [13].

При дії ВІС різко зростала активність NOS порівняно з контрольними значеннями: загальна зростала майже вдвічі ($P < 0,05$), cNOS змінювалася незначно, водночас активність iNOS підвищувалася майже у 5 разів ($P < 0,05$). При цьому знижувалась активність аргінази у 2,7 раза ($P < 0,05$), а концентрація

L-аргініну на 23 % ($P < 0,05$; табл. 1). Водночас вміст ТБК-активних продуктів збільшився на 33 % ($P < 0,01$), вказуючи на активування процесів ліпопероксидації.

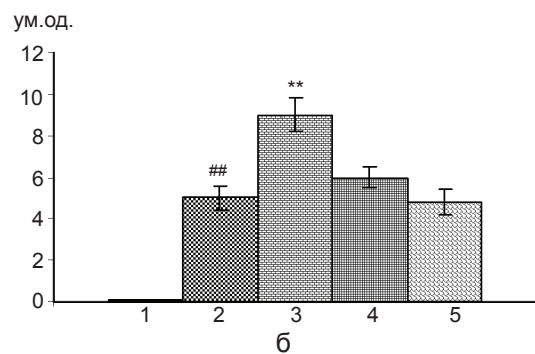
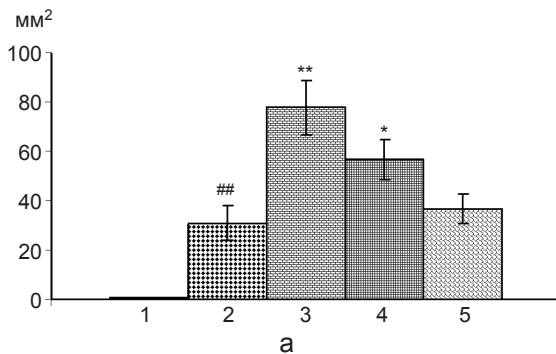
Напроксен спричинював зниження активності NOS у 2,1 раза ($P < 0,05$) порівняно зі значеннями при ВІС, при цьому знижувалась активність обидвох ізоформ ферменту (iNOS у 1,9 раза; $P < 0,05$; cNOS у 2,2 раза; $P < 0,05$). Активність аргінази залишалась значно нижчою, ніж у інтактних тварин. Показники системи NOS при введенні АТВ-346 на тлі ВІС змінювались подібно до дії напроксену, що свідчить про домінуючий вплив напроксенового ядра молекули АТВ-346 на активність NOS, тоді як ефект H_2S істотно не проявлявся.

Подвійне інгібування ЦОГ-2/5-ЛОГ змінювало активність NOS не суттєво, порівняно з ВІС. Проте слід зазначити, що активність аргінази дещо зростала. Вміст ТБК-активних продуктів проявляв тенденцію до зниження, оскільки 2A5DHT, імовірно, має антиоксидантні властивості.

Аналізуючи отримані результати, варто відзначити, що ульцерогенна дія стресу має комплексний характер – у механізми її розвитку залучені різні чинники, які здійснюють регуляцію функціонування організму на рівні ЦНС, системи гіпоталамус-гіпофіз-кора надниркових залоз, а також на клітинному та молекулярному рівнях [5]. Так, вплив стресу супроводжується стимуляцією паравентри-

кулярного ядра гіпоталамуса, що впливає на продукцію слизу, об'єм шлункового соку, його кислотність. Зростає продукція стрес-гормонів (катехоламінів, глюкокортикоїдів). Катехоламіни чинять вазоконстрикторну дію, зумовлюючи порушення кровотоку, ішемію слизової оболонки гастродуоденальної зони та, як наслідок, розвиток оксидативного стресу [8]. При цьому адреналін опосередковано підвищує секрецію гідрохлоридної кислоти, стимулюючи вивільнення гастрину. Глюкокортикоїди, в свою чергу, посилюють біосинтез гістаміну, впливають на секрецію пепсину та гідрохлоридної кислоти. Водночас вони інгібують фосфоліпазу A_2 , що відповідає за вивільнення арахідонової кислоти, яка є субстратом для синтезу простагландинів.

Оксид азоту, що синтезується конститутивними ізоформами NOS (cNOS), за умов "стресової" виразки здійснює такі захисті ефекти, як підтримання відповідного рівня кровотоку (зниження вазоконстрикції, спричиненої катехоламінами), регуляція моторики, активування синтезу протективних білків HSP70 [9]. Проте гіпоксія при стресі призводить до різкого підвищення експресії iNOS, що відповідає за продукцію NO, який за умов оксидативного стресу взаємодіє з активними радикалами кисню і стає джерелом таких радикалів, як нітроксил ($NO\cdot$), пероксинітрит ($ONOO\cdot$) тощо, котрі посилюють ушкодження клітини.



Площа та індекс структурно-геморагічних ушкоджень слизової оболонки шлунка шурів: 1 – контроль (інтактні тварини); 2 – водно-імобілізаційний стрес; 3 – напроксен і водно-імобілізаційний стрес; 4 – АТВ-346 і водно-імобілізаційний стрес; 5 – 2A5DHT і водно-імобілізаційний стрес. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ порівняно з показниками при водно-імобілізаційному стресі; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ порівняно з показниками інтактних тварин

У наших дослідженнях показано, що при ВІС активується iNOS, унаслідок чого метаболізм L-аргініну змістився в бік оксидативного шляху. Водночас активуються процеси ліпопероксидації, про що свідчить збільшення вмісту ТБК-активних продуктів.

Використання НПЗП за умов стресу призводить до сумування ульцерогенних ефектів цих двох чинників деструктивних ушкоджень СОШ. Механізм гастротоксичної дії традиційних НПЗП, до яких належить напроксен, полягає у інгібуванні синтезу простагландинів.

У наших дослідженнях застосування напроксену на тлі ВІС супроводжувалося зростанням площі СГУ СОШ. При цьому слід відмітити зниження активності iNOS, що свідчить про тісний взаємозв'язок NOS і циклооксигеназної системи. Раніше було показано, що простагландини є активаторами NOS [12]. Таким чином, однією з причин зниження активності iNOS є інгібування синтезу простагландинів.

Створення H₂S-зв'язаних НПЗП – актуальний напрямок пошуку нових засобів, позбавлених гастротоксичності. Нещодавно було показано цитопротективні властивості H₂S, який у фізіологічних концентраціях

бере активну участь у механізмах захисту СОШ від факторів агресії, діючи як вазодилататор, нейромодулятор [16]. Окрім цього, H₂S властива антиоксидантна, антиапоптична та протизапальна дія у органах травного тракту [10]. Виявлено, що введення НПЗП, як неселективних, так і інгібіторів ЦОГ-2 у переважній більшості випадків супроводжується інгібуванням цистатіонін β-синтази та цистатіонін γ-ліази, ферментів, відповідальних за синтез H₂S. Таким чином, фізіологічні цитопротективні ефекти останнього суттєво знижуються, що може бути однією з причин розвитку гастропатій при вживанні НПЗП. Найкраще описаним із існуючих нині H₂S-зв'язаних НПЗП є АТВ-346, який створено на основі напроксену.

У дослідах на моделі ВІС нами було показано знижену гастротоксичність АТВ-346, що полягала у зменшенні площі та індексу СГУ. Проте показники NOS-системи були на рівні таких при дії напроксену. Це свідчить про домінуючий вплив базової молекули НПЗП у регуляції функціонування NOS. Разом з тим рівень процесів ліпопероксидації у СОШ за умов дії АТВ-346 залишався достатньо високим. Імовірно досліджувана доза препарату забезпечувала вивільнення

Зміни активності NO-синтаз (NOS), аргінази та ТБК-активних продуктів у слизовій оболонці шлунка за умов впливу нестероїдних протизапальних препаратів на тлі водно-імобілізаційного стресу

Схема досліджу	ТБК-активні продукти, нмоль/хв · г	NOS, нмоль/хв · г		Аргіназа, мкмоль/хв · г	L-Аргінін, мкг/мл
		індуцибельна	конститутивна		
Контроль (інтактні тварини)	209,8±8,9	0,158±0,073	0,413±1,048	0,35±0,07	39,7±4,8
Водно-імобілізаційний стрес	277,9±5,6 [#]	0,761±0,204 [#]	0,372±0,119	0,13±0,04 [#]	30,7±2,35 [#]
Напроксен і водно-імобілізаційний стрес	281,0±6,0	0,391±0,18 ^{**}	0,165±0,104 ^{**}	0,14±0,05	34,4±9,0
АТВ-346 і водно-імобілізаційний стрес	273,3±1,8 ^{**}	0,306±0,122 ^{**}	0,24±0,083	0,26±0,09 ^{**}	28,3±3,5
2A5DHT і водно-імобілізаційний стрес	273,0±6,55	0,762±0,166	0,735±0,113	0,24±0,04	32,1±4,2

* P<0,05, ** P<0,01 порівняно з показниками при водно-імобілізаційному стресі; [#]P<0,05, ^{##}P<0,01 порівняно з інтактними тваринами.

H_2S , що використовувався на здійснення цитопротекторних ефектів, наприклад інгібуванням адгезії лейкоцитів або підвищенням виділенням факторів росту.

Іншим перспективним напрямком досліджень є вивчення нових НПЗП, спроможних одночасно інгібувати ЦОГ і ЛОГ. Теоретично за умов інгібування циклооксигеназного шляху обміну арахідонової кислоти НПЗП її метаболізм зміщується в бік ліпооксигеназного шляху. Таким чином, інгібування синтезу простагландинів, спричинює посилення синтезу лейкотрієнів, які, в свою чергу, можуть брати участь в ушкодженні СОШ, індукуючи мікросудинні порушення, вазоконстрикцію судин, посилюючи руйнування слизового бар'єра та стимулюючи секрецію гідрохлоридної кислоти, а також продукування прозапальних цитокінів. Препарати, що спроможні одночасно блокувати ЦОГ і ЛОГ можуть мати численні переваги над ЦОГ-інгібіторами, оскільки маючи більший спектр протизапальної активності, вони, ймовірно не мають побічних ефектів, притаманних НПЗП. Окремі представники цього класу НПЗП (лінкофелон, тепоксалін) вже нині добре зарекомендували себе у клінічних дослідженнях [11].

Ми використали структурний аналог дарбуфелону, сполуку 2A5DHT, що добре зарекомендувала себе як протизапальний засіб, позбавлений побічних ефектів. У дослідженнях на моделі ВІС у СОШ щурів нами показано зниження площі та індексу СГУ за умов дії 2A5DHT порівняно з напроксеном, проте вищими, ніж при впливі лише ВІС. При цьому активність іNOS залишалася високою (на рівні значень при ВІС), а активність аргінази зростала.

ВИСНОВКИ

1. Введення неселективного інгібітора ЦОГ напроксену на тлі ВІС у щурів потенціувало розвиток структурно-геморагічних уражень СОШ, що проявлялося у збільшенні площі та індексу ушкоджень. При цьому активність

обох ізоформ NOS знижувалась, а показники процесів ліпопероксидації залишалися на рівні таких у разі стресу.

2. H_2S -зв'язаний НПЗП АТВ-346 демонстрував знижену гастротоксичність, що полягала у зменшенні площі та індексу структурно-геморагічних уражень. Проте спостерігався домінуючий вплив базової молекули НПЗП у регуляції функціонування NOS.

3. Введення інгібітора подвійної дії ЦОГ/ЛОГ, сполуки 2A5DHT, спричинювало зменшення структурно-геморагічних ушкоджень порівняно зі впливом напроксену. При цьому активність іNOS залишалася значно вищою, ніж за умов впливу напроксену (на рівні значень при ВІС).

И.С. Фоменко, Т.И. Бондарчук, Л.П. Билецкая, Н.Б. Панасюк, А.Я. Склярів

ПОКАЗАТЕЛИ NO-СИНТАЗНОЙ СИСТЕМЫ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА КРЫС В УСЛОВИЯХ СТРЕССА И УГНЕТЕНИЯ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ

В опытах на крысах с моделированным водно-иммобилизационным стрессом, изучено влияние нестероидных противовоспалительных препаратов разного генеза на морфологическое состояние слизистой оболочки желудка и показатели NO-синтазной (NOS) системы. Показано, что введение крысам неселективного ингибитора циклооксигеназы – напроксена на фоне стресса потенцирует развитие структурно-геморрагических повреждений слизистой оболочки желудка и снижает активность обеих изоформ (индуцибельной – iNOS и конститутивной) NOS. При этом показатели процессов липопероксидации оставались на уровне таковых при водно-иммобилизационном стрессе. В работе обоснованы преимущества использования H_2S -связанного нестероидного противовоспалительного препарата АТВ-346, так как в условиях стресса он продемонстрировал низкую гастротоксичность. Тем не менее в условиях его действия доминирующее влияние было базовой молекулы (напроксена) в регуляции функционирования NOS. Введение ингибитора двойного действия ЦОГ/ЛОГ – соединения 2A5DHT вызывало уменьшение структурно-геморрагических изменений и значительное повышение активности iNOS в сравнении с влиянием напроксена.

Ключевые слова: нестероидные противовоспалительные препараты, стресс, оксид азота, слизистая оболочка желудка.

**I.S. Fomenko, T.I. Bondarchuk, L.P. Biletska,
N.B. Panasyuk, A.Ya. Sklyarov**

PARAMETERS OF NO SYNTHASE SYSTEM OF GASTRIC MUCOSA IN RATS UNDER STRESS CONDITIONS AND INHIBITION OF CYCLOOXYGENASE

In experiments on rats with modeled water-restrained stress, the influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs of different genesis on morphological status of gastric mucosa and changes of NO-synthase system parameters have been studied. Administration of nonselective cyclooxygenase inhibitor naproxen in the water-restrained stress model in rats potentiated the increase of severity of damage of gastric mucosa. At the same time, the activity of both inducible and constitutive isoforms of NO-synthase decreased. The parameters of lipoperoxidation remained at the level observed during water-restrained stress. It was shown the advantages of the use of H₂S-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug ATB-346, which are associated with its cytoprotective effect of the drug manifested by a decreased total area of gastric damage. However, parameters of lipoperoxidation and NO-synthase system did not differ substantially from those in the group treated with naproxen, indicating the prevalence of parent molecule (naproxen) in regulation of function of NO-system. Administration of dual COX/LOX inhibitor, the compound 2A5DHT, caused a decrease of gastric damage as compared to the effect of naproxen. The activity of iNOS remained much higher than under condition of the naproxen action.

Key words: NSAIDs, stress, nitric oxide, gastric mucosa.

D. Halytskyi National Medical University, Lviv, Ukraine

REFERENCES

1. Alejnikova TL, Rubtsova GV, Pavlova NA. Manuals for practical lessons in biochemistry. Moscow: Medicine; 1988:239 p.
2. Sklyarov AYa, Fomenko IS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, mechanisms of their action, peculiarities of use. Practical medicine. 2007; **14**(3): 123-132.
3. Sumbajev VV, Jasinskaja IM. The influence of DDT on the activity of nitric oxide synthase in liver, lungs and brain of rats. Modern problems of toxicology. 2000; **3**: 3-7.
4. Timirbulatov RA, Seleznev EI. Method for increasing the intensity of free radical oxidation of lipid-containing components of the blood and its diagnostic significance. Lab. Delo. 1981; **4**: 209-117.
5. Bhatia V, Tandon RK. Stress and the gastrointestinal tract. Journal of gastroenterology and hepatology. 2005; **20**: 332-339.
6. Coruzzi G, Venturi N, Spaggiari S. Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond. ACTA BIOMED. 2007; **78**: 96-110.
7. Geyer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. Anal. Biochem. 1971; **39**(2): 412-417.
8. Kwiecien S, Konturek PC, Sliwowski Z, Mitis-Musiol M, Pawlik MW, Brzozowski B, et al. Interaction between selective cyclooxygenase inhibitors and capsaicin sensitive afferent sensory nerves in pathogenesis of stress-induced gastric lesions. Role of oxidative stress. J. Physiol. Pharmacol. 2012; **63**(2): 143-151.
9. Lanas A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. Arthritis Research & Therapy. 2008; **10** (2): 4.
10. Liu L, Cui J, Song Ch-J, Bian J-S, Sparatore A, Del Soldato P, Wang X-Yu, Yan Ch-D. H₂S-Releasing Aspirin Protects against Aspirin-Induced Gastric Injury via Reducing Oxidative Stress. PLOS ONE. 2012; **7**(9): 46301.
11. Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Reboul P. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. Ann Rheum Dis. 2003; **62**: 501-509.
12. Mollace V, Muscoli C, Masini E et al. Modulation of Prostaglandin Biosynthesis by Nitric Oxide and Nitric Oxide Donors. Pharmacol. Rev. 2005; **57**: 217-252.
13. Nasadyuk C, Sklyarov A. Thymohexin exhibits cytoprotective effect in experimental gastric lesions in rats both through the inhibition of inducible nitric oxide synthase and reduction of oxidative mucosal damage. Regulatory Peptides. 2013; **180**: 50-57.
14. Takagi KY, Kayuya Y, Watanabe K. Studies on drugs for peptic ulcer. A reliable method for producing stress ulcers in rats. Chem Pharm Bull. 1964; **12**: 465-472.
15. Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, Cirino G. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346). British Journal of pharmacology. 2010; **159**: 1236-1246.
16. Wallace JL, Dickey M, McKnight W, Martin GM. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. The FASEB Journal. 2007; **21**: 4070-4076.

*Львів. нац. мед. ун-т ім. Данила Галицького
E-mail: biochemistry@meta.ua*

*Матеріал надійшов
до редакції 08.08.2013*