

О.Я.Склярів, О.І. Децик

Зміни активності NO-синтаз та оксидативних процесів при активації 5-HT-рецепторів у шлунку та товстій кишці за умов стрептозотоциніндукованого цукрового діабету

Досліджували активність NO-синтаз, процеси ліпопероксидації, стан ензимів системи антиоксидантного захисту у м'язових оболонках шлунка та товстої кишки, а також концентрацію L-аргініну у плазмі крові за умов двотижневої активації 5-HT4-рецепторів мосапридом при стрептозотоциніндукованому цукровому діабеті. Показано, що розвиток цукрового діабету супроводжується підвищенням активності індукцибельної NO-синтази (iNOS), супероксиддисмутази, вмісту нітрит-аніона та продуктів тіобарбітурової кислоти у м'язових оболонках шлунка та товстої кишки. Активація 5-HT4-рецепторів мосапридом за умов експериментального діабету зменшує активність iNOS, вміст нітрит-аніона та оксидативні процеси у м'язових оболонках шлунка та товстої кишки, підвищує їхню моторно-евакуаторну функцію і не впливає на вміст глюкози у крові.

Ключові слова: активність NO-синтаз, процеси ліпопероксидації, нітрит-аніон, м'язова оболонка шлунка та товстої кишки, стрептозотоциніндукований діабет, 5-HT4-рецептори, мосаприд.

ВСТУП

Цукровий діабет (ЦД) супроводжується порушеннями моторно-евакуаторної функції органів травлення, що зменшує моторику шлунка, тонкої та товстої кишки і, відповідно, подовжує час транзиту та евакуації хімуса [20, 25, 26]. У цих процесах безпосередню участь бере система L-аргінін–NO-синтаза–оксид нітрогену.

За фізіологічних умов у слизовій і м'язовій оболонках травних органів експресуються конститутивні форми NO-синтаз (cNOS) – ендотеліальна (eNOS) та нейрональна (nNOS), які є кальційзалежними та забезпечують біосинтез незначної кількості оксиду нітрогену, який регулює секрецію, моторику, всмоктування, кровообіг, підтримує структуру та функції слизового бар'єра, процес міжклітинної інтеграції, передачу інформації у неадренергічних нехолінергічних

нейронах [14, 17, 24]. nNOS локалізується у мієнтеральних нейронах і синтезує оксид нітрогену, який гальмує моторику [19]. За умов ЦД підвищується активність індукцибельної NO-синтази (iNOS), яка локалізується у ендотеліальних, епітеліальних, імунних клітинах і гладеньких міоцитах травних органів [18], тоді як експресія nNOS у NO-ергічних нейронах знижується [25]. Гіперглікемія викликає розвиток оксидативного стресу та змінює активність ензимів системи антиоксидантного захисту, що впливає на моторно-евакуаторну функцію органів травлення [23].

У регуляції моторики травної системи беруть участь 5-HT4-рецептори, активація яких стимулює виділення ацетилхоліну з мієнтеральних нейронів, що призводить до посилення моторики як верхніх відділів травної системи, так і товстої кишки [12, 13, 16]. У органах травної системи 5-HT4-рецептори знаходяться на мембранах ЕС-клітин,

аферентних нейронах, інтернейронах та еферентних нейронах міжм'язового сплетіння та гладеньких м'язах [10].

Метою нашої роботи було визначення зміни активності NO-синтаз, вмісту нітрит-аніона та процесів ліпопероксидації у м'язових оболонках шлунка та товстої кишки за умов двотижневого введення агоніста 5-НТ4-рецепторів мосаприду при стрептозотиніндукованому діабеті.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на статевозрілих щурах-самцях (n=28) масою 150–170 г, згідно з прийнятими етичними принципами роботи з лабораторними тваринами. Тваринам I (контрольної) групи (n=10) протягом досліду перорально вводили фізіологічний розчин; щурам другої групи (n=10) для моделювання ЦД робили ін'єкцію стрептозотину (60 мг/кг) інтраперитонеально; тваринам III групи (n = 8) протягом 2 тиж на тлі ЦД вводили агоніст 5-НТ4-рецепторів цитрат мосаприду (10 мг/кг; Мосид, Індія) [12]. Через 2 тиж визначали концентрацію глюкози у крові глюкозооксидазним методом з використанням набору реактивів "Lachema" (Чехія). Критерієм розвитку ЦД був рівень глікемії понад 16 ммоль/л порівняно з контрольною групою 6,4–7,0 ммоль/л. Щурів декапітували під уретановим наркозом (1,1 мг/кг).

У гомогенатах м'язової оболонки шлунка та товстої кишки визначали: активність NO-синтаз з використанням НАДФН₂⁺ [5], ліпопероксидацію за вмістом активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК) [6], активність супероксиддисмутази (СОД) – за допомогою реакції відновлення нітротетразолію синього до нітроформазану [7], каталази – з використанням реакції Н₂О₂ з молібдатом амонію [4], вміст стабільного метаболіту оксиду нітрогену нітрит-аніона (NO₂⁻) за допомогою реактиву Гріса [11], концентрацію L-аргініну у плазмі крові – за кольоровою реакцією Сакгаучі за наявності гіпоброміду натрію [1].

Концентрацію білка – за методом Лоурі.

Одержані результати статистично опрацьовані за критерієм t Стьюдента за допомогою програмного забезпечення ANOVA Microsoft Excel 8.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У м'язових оболонках шлунка та товстої кишки контрольних тварин домінувала активність cNOS, активність iNOS була незначною (табл. 1).

За умов гіперглікемії (концентрація глюкози становила 27,6 ммоль/л ± 1,2 ммоль/л) у м'язових оболонках шлунка та товстої кишки активність cNOS виражено не змінювалася, тоді як активність iNOS у м'язових оболонках шлунка підвищувалась у 2,4 раза (P<0,05), у м'язових оболонках товстої кишки – у 2,8 раза (P<0,05). Вміст нітрит-аніона у м'язових оболонках товстої кишки підвищувався на 26 % (P<0,05), а концентрація L-аргініну у плазмі крові зменшувалася з 41,9±4,3 до 28,2 мкг/мл ± 4,99 мкг/мл (на 28 %; P<0,05).

У м'язових оболонках шлунка та товстої кишки підвищувався вміст ТБК-активних продуктів на 17 % (P<0,05) та 52 % (P<0,05) відповідно, паралельно підвищувалась активність СОД – у м'язових оболонках шлунка на 23 %, товстої кишки – на 40 % (P<0,05), що свідчить про активацію оксидативних процесів (табл. 2). Моторно-евакуаторна функція шлунка та товстої кишки знижувалась у 7–10 разів, збільшувався вміст хімуса у їх порожнинах.

Двотижневе введення агоніста 5-НТ4-рецепторів мосаприду призводило до зниження: активності iNOS на 41 % (P<0,05) у м'язовій оболонці шлунка та на 49 % (P<0,05) у м'язовій оболонці товстої кишки; вмісту нітрит-аніона на 22 % (P<0,05) у м'язовій оболонці товстої кишки; продуктів ТБК на 23 % (P<0,05) у м'язовій оболонці товстої кишки та тенденції до зменшення активності СОД у м'язових оболонках, при цьому зміни цих показників були більш виражені у м'я-

Таблиця 1. Зміни активності NO-синтаз (NOS), вмісту нітрит-аніона у м'язових оболонках шлунка та товстої кишки за умов двотижневого введення агоніста 5-HT₄-рецепторів мосаприду на тлі стрептозотоциніндукованого цукрового діабету (M±m)

Серії досліджень	Активність загальної NO-синтази, нмоль/хв·г	Конститутивна NO-синтаза, нмоль/хв·г	Індуцибельна NO-синтаза, нмоль/хв·г	Нітрит-аніон, мкмоль/л
М'язова оболонка шлунка				
Контроль	0,496±0,118	0,369±0,1	0,156±0,038	15,1±1,3
Цукровий діабет	0,654±0,087	0,287±0,085	0,371±0,09*	19,8±1,2
Введення мосаприду на тлі цукрового діабету	0,508±0,088	0,214±0,054	0,219±0,08**	18,6±1,3
М'язова оболонка товстої кишки				
Контроль	0,474±0,064	0,307±0,08	0,168±0,044	16,9±1,7
Цукровий діабет	0,719±0,041	0,244±0,09	0,475±0,09*	21±1,5*
Введення мосаприду на тлі цукрового діабету	0,483±0,01	0,243±0,046	0,24±0,052**	16,3±1,52**

Примітка. Тут і у табл. 2. *P<0,05 порівняно з контролем, **P<0,05 – зі значеннями у тварин з цукровим діабетом.

зовій оболонці товстої кишки. Концентрація L-аргініну у плазмі крові підвищувалася на 19 % (P>0,05). Концентрація глюкози в крові суттєво не змінювалася: (23,1±1,6) ммоль/л.

Отримані результати свідчать, що активація 5-HT₄-рецепторів мосапридом за умов стрептозотоциніндукованої гіперглікемії знижує активності iNOS та оксидативних процесів.

У нормі ендогенний NO інгібує моторику шлунка, тонкої та товстої кишки [15]. Підвищення активності iNOS призводить до значного зменшення моторики [19], тоді як інгібування NO-ергічного блокування гла-

деньких м'язів товстої кишки L-NMMA або L-NNA викликає її посилення [8, 18].

Гіперглікемія супроводжується релаксацією м'язів, при цьому активність iNOS у м'язовій оболонці підвищується, що збільшує вміст нітрит-аніона. Слід відзначити, що частина оксиду нітрогену, який синтезується iNOS, взаємодіє з супероксидним радикалом, що призводить до утворення пероксинітриту, який викликає ендотеліальну дисфункцію, нітрує цитоплазматичні білки, активує процеси ліпопероксидації та спричинює збільшення сорбітолу [3]. Підвищення активності iNOS

Таблиця 2. Вміст ТБК-активних продуктів та активність супероксиддисмутази і каталази у м'язових оболонках шлунка та товстої кишки за умов двотижневого введення агоніста 5-HT₄-рецепторів мосаприду на тлі стрептозотоциніндукованого цукрового діабету (M±m)

Серії досліджень	ТБК-активні продукти, мкмоль/г · тк	Активність супероксиддисмутази, мкмоль НСТ/хв · мг	Активність каталази, мкмоль H ₂ O ₂ /хв · г
М'язова оболонка шлунка			
Контроль	129±9,8	18,9±1,42	0,111±0,006
Цукровий діабет	150,5±11,5*	23,3±3,95	0,143±0,006
Введення мосаприду на тлі цукрового діабету	132,6±3,8	19,9±1,4	0,122±0,01
М'язова оболонка товстої кишки			
Контроль	106,3±16,8	16±2,4	0,148±0,006
Цукровий діабет	161,4±10,4*	22,4±2,7*	0,166±0,011
Введення мосаприду на тлі цукрового діабету	124,8±12,7**	16,8±2,3*	0,160±0,046

при релаксації м'язів також пов'язують зі збільшеним утворенням H_2O_2 та впливом прозапальних цитокінів, які активують експресію mRNA iNOS [21, 23].

Оксид нітрогену, що синтезується iNOS або nNOS, може регулювати функціональний стан гладеньких м'язів травної системи за участю декількох механізмів. З одного боку, оксид нітрогену, що синтезувався у NO-ергічних нейронах мієнтерального плетива, діє як інгібіторний медіатор, а з іншого – він може активувати розчинну гуанілатциклазу, що буде призводити до утворення цГМФ у гладеньких м'язах та їх релаксацію. Оксид нітрогену також може призводити до м'язової релаксації через гіперполяризацію та незалежним від цГМФ механізмом [22].

За умов ЦД збільшується продукція кисневих радикалів і пероксинітриту, які спричиняють розвиток оксидативно-нітративного стресу. Це може бути зумовлено аутоокисненням глюкози, посиленням глікозилюванням клітинних білків, активацією поліолового шляху та зростанням утворення супероксидного радикала у дихальному ланцюзі мітохондрій [21, 23].

Порушення моторики при ЦД може бути зумовлено нітритергічною нейропатією – зниженням активності nNOS внаслідок дегенеративних змін у нітритергічних нейронах або з активацією iNOS гладеньких м'язів органів травлення [2, 9].

Зменшення активності iNOS і процесів ліпопероксидації при активації 5-HT4-рецепторів за умов ЦД свідчить про зниження оксидативно-нітративного стресу. Механізм дії мосаприду може бути пов'язаний як з вивільненням ендogenous ацетилхоліну з еферентних закінчень ентеральних нейронів, так і безпосереднім впливом на 5-HT4-рецептори гладеньких м'язів.

Отримані результати обґрунтовують застосування антагоніста 5-HT4-рецепторів мосаприду при ЦД для покращення моторно-евакуаторної функції та зниження рівня оксидативно-нітративного стресу.

ВИСНОВКИ

1. За умов стрептозотоциніндукованої гіперглікемії підвищувалася активність iNOS, СОД, вміст нітрит-аніона та продуктів ТБК у м'язових оболонках шлунка та товстої кишки, що може викликати зниження тонуусу гладеньких м'язів і порушувати моторно-евакуаторну функцію шлунка та товстої кишки.

2. Активація 5-HT4-рецепторів мосапридом за умов стрептозотоциніндуваного діабету зменшує активність iNOS, СОД, вміст нітрит-аніона та продуктів ТБК у м'язових оболонках шлунка та товстої кишки, та не впливає на вміст глюкози у крові.

3. Застосування агоніста 5-HT4-рецепторів мосаприду може бути рекомендовано для покращення моторно-евакуаторної функції та зниження рівня оксидативно-нітративного стресу у хворих на ЦД.

А.Я. Скляров, О.И. Децик

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ NO-СИНТАЗ И ОКСИДАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ АКТИВАЦИИ 5-HT4-РЕЦЕПТОРОВ В ЖЕЛУДКЕ И ТОЛСТОМ КИШЕЧНИКЕ В УСЛОВИЯХ СРЕПТОЗОЦИНИНДУЦИРОВАННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Исследовали активность NO-синтаз, процессы липопероксидации, состояние энзимов системы антиоксидантной защиты в мышечных оболочках желудка и толстого кишечника, а также концентрацию L-аргинаина в плазме крови в условиях двухнедельной активации 5-HT4-рецепторов мосапридом при стрептозотоцининдуцированном сахарном диабете. Показано, что его развитие сопровождается увеличением активности индуцибельной NO-синтазы в 2,4–2,8 раза, супероксиддисмутазы – 23–40 %, содержания нитрит-аниона и продуктов тиобарбитуровой кислоты (ТБК) – в мышечных оболочках желудка и толстого кишечника, снижением моторно-евакуаторной функции желудка и толстого кишечника. Активация 5-HT4-рецепторов мосапридом в условиях диабета уменьшает активность iNOS на 41–49 %, процессы липопероксидации, содержание нитрит-аниона и продуктов ТБК в мышечных оболочках желудка и толстого кишечника на 23 %, повышает моторно-евакуаторную функцию желудка и толстого кишечника и не влияет на содержание глюкозы в крови.

Ключевые слова: активность NO-синтаз, процессы липопероксидации, нитрит-анион, мышечные оболочки желудка и толстого кишечника, стрептозотоцининдуцированный диабет, 5-HT4-рецепторы, мосаприд.

A. Sklyarov, O. Detsyk

THE CHANGES OF THE ACTIVITY OF NO-SYNTASES AND OXIDATIVE PROCESSES UNDER CONDITIONS OF 5-HT RECEPTORS ACTIVATION IN THE STOMACH AND LARGE INTESTINE IN STREPTOZOCIN-INDUCED DIABETES MELLITUS

We investigated the activity of NO-synthases, lipoperoxidation processes, antioxidant defense enzymes in the muscular layers of stomach and large intestine. The L-arginine concentration in blood plasma was also monitored under conditions of 2-weeks activation of 5-HT₄ receptors by mosaprid in streptozocin-induced diabetes mellitus. We showed that the onset of diabetes mellitus is accompanied by a 2.4-2.8-fold increase in the activity of inducible NO-synthase and a 23-40% increase in the SOD activity. The nitric oxide content and TBA products in the muscular layers of stomach and large intestine were increased, whereas the motor-evacuational function of the stomach and large intestine decreased. Activation of 5-HT₄ receptors by mosaprid under conditions of diabetes mellitus decreased the activity of inducible NO-synthase, the lipoperoxidation processes, nitrite anion content and TBA products in muscular layers of stomach and large intestine by 23%. At the same time, we observed an increase in the motor-evacuational function of stomach and large intestine without affecting the blood sugar level.

Key words: NO-synthase activity, lipoperoxidation processes, nitrite anion, muscular layers of the stomach and large intestine, streptozocin-induced diabetes mellitus, 5-HT₄ receptors, mosaprid.

Danylo Halytsky Lviv National Medical University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Алейникова Т.Л., Рубцева Г.В., Павлова Н.А. Руководство к практическим занятиям по биохимии. – М.: Медицина, 2000. – 128 с.
- Децик О., Фоменко І., Склярів О. Активність NO-синтаз, вміст нітрогену оксиду та процеси ліпопероксидації у шлунку та товстій кишці за умов стрептозотин індукованої гіперглікемії // Експерим. фізіологія та біохімія. – 2011. – 3(55). – С. 7–12.
- Дрель В.Р. Основні механізми виникнення та розвитку діабетичних ускладнень: роль нітративного стресу // Біол. студії. – 2010. – 4. – № 2. – С.141–158.
- Королук М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С.16–19.
- Сумбаев В.В. Ясинская И.М. Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс // Соврем. пробл. токсикологии. – 2000. – № 3. – С.3–7.
- Тимурбулатов М.А., Селезнев Е.И. Метод повышения свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. – 1981. – № 4. – С.209–211.
- Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Там же. – 1991. – № 10. – С.9–13.
- Шадрін О.Г., Гоцуляк С.М., Ципкун А.Г. Індукована скоротлива активність гладеньких м'язів товстого кишечника щура за умов блокади NO-синтази // Фізіол. журн. – 2004. – 50, №4. – С.123–127.
- Cellek S. Point of return for nitrenergic nerves in diabetes: a new insight into diabetic complications // Curr.Farm. Des. – 2004. – 10, № 29. – S.3683–3685.
- De Maeyer J.H., Lefebvre R.A., Schuurkes J.A. 5-HT₄ receptor agonists: similar but not the same // Neurogastroenterol. Motil. – 2008. – 20, № 2. – P.99–112.
- Green L.C., A.W. David. Analysis of nitrate, nitrite and (1515) nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – 126. – P.131–138.
- Inui A., Yoshikawa T., Nagai R., Yoshida N., Ito T. Effects of mosapride citrate, a 5-HT₄ receptor agonist, on colonic motility in conscious guinea pigs // Jpn. J. Pharmacol. – 2002. – 90. – P. 313 – 320.
- Kim H.S., Choi E.J., Park H. The effect of mosapride citrate on proximal and distal colonic motor function in the guinea-pig in vitro // Neurogastroenterol. Motil. – 2008. – 20, № 2. – P.169–176.
- Lanas A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract // Arthritis Res. & Therap. – 2008. – 10 (Suppl 2). – S4.
- Meile T., Glatzle J., Habermann F.M., Kreis M.E., Zittel T.T. Nitric oxide synthase inhibition results in immediate postoperative recovery of gastric, small intestinal and colonic motility in awake rats // Int. J. Colorectal. Dis. – 2006. – 2. – P. 121–129.
- Mine Y., Yoshikawa T., Oku S., Nagai R., Yoshida N., Hosoki K. Comparison of effect of mosapride citrate and existing 5-HT₄ receptor agonists on gastrointestinal motility in vivo and in vitro // J. Pharmacol. Exp. Therap. – 1997. – 283, № 3. – P. 1000–1008.
- Nishio H., Hayashi Y., Terashima S., Takeuchi K. Role of endogenous nitric oxide in mucosal defence of inflamed rat stomach following iodoacetamide treatment // Life Sci. – 2006. – 79, № 16. – P. 1523–1530.
- Onori L., Aggio A., D'Alo S., Muzi P., Cifone M.G., Mellillo G., Ciccocioppo R., Taddei G., Frieri G., Latella G. Role nitric oxide in the impairment of circular muscle contractility of distended, uninflamed mid-colon in TNBS-induced acute distal colitis in rats // World. J. Gastrointestinal. – 2005. – 11, №36. – S.5677–5684.
- Qu Z.D., Thacker M., Baqyanszki P., Bagyánszki M., Epstein M.L., Furness J.B. Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine // Cell Tissue Res. – 2008. – 334, №2. – S.147–161.
- Roszczycki A., Roka R., Varkonyi T.T., Lengyel C., Izbéki F., Lonovics J., Wittmann T. Regional differences in the manifestation of gastrointestinal motor disorders in type 1 diabetic patients with autonomic neuropathy // Z. Gastroenterol. – 2004. – 42, № 11. – S.1295–1300.
- Seven A., Guzel S., Seymen O., Civelek S., Bolayirli M.,

- Yiğit G., Burçak G. Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME in streptozotocin induced diabetic rats: impacts on oxidative stress // *Tohoku J. Exp. Med.* – 2003. – **199**, № 4. – P.205–210.
22. Toda N., Herman A.G. Gastrointestinal function regulation by nitregic efferent nerves // *Pharmacol. Rev.* – 2005. – **57**, № 3. – S.315–338.
23. Van den Oever I., Raterman H.G., Nurmohamed M.T., Simsek S. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus // *Mediators of Inflammation.* – 2010. – Published online, 10.1155/2010/792393.
24. Wallace J.L., Ma L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury // *Exp. Biol. Med.* – 2001. – **226**, № 11. – P. 1003–1015.
25. Zandecki M., Vanden Berghe P., Depoortere I., Geboes K., Peeters T., Janssens J., Tack J. Characterization of myenteric neuropathy in the jejunum of spontaneously diabetic BB–rats // *Neurogastroenterol. Motil.* – 2008. – **20**, №7. – S.818–828.
26. Zhao J., Yang J., Gregersen H. Biomechanical and morphometric intestinal remodeling during experimental diabetes in rats // *Diabetologia.* – 2003. – **46**, № 12. – P. 1688–1697.

Львів. нац. мед. ун-т імені Данила Галицького
E-mail: Sklyarov@meduniv.lviv.ua

Матеріал надійшов до
редакції 14.02.2012