

МОДЕЛЮВАННЯ АКТИВНОСТІ NO-СИНТАЗНОЇ СИСТЕМИ ГІДРОГЕНСУЛЬФІДОМ НАТРІЮ У СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ КОЛІТУ

Н. Денисенко*, Ю. Федевич, О. Склярів

*Кафедра біологічної хімії, Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького
вул. Пекарська, 69, Львів 79010, Україна
e-mail: denysenko.natalka@gmail.com*

Гідрогену сульфід викликає значний інтерес серед науковців, оскільки він як один із газових медіаторів володіє вазодилатуючими, антиоксидантними та протизапальними властивостями. Деякі сучасні підходи до пошуку нових, більш ефективних і безпечних лікарських засобів базуються, в тому числі, і на включенні молекули гідрогену сульфід у структуру сполуки. Проте у високих концентраціях сірководень може інгібувати ензими дихального ланцюга шляхом зв'язування атомів заліза цитохромів, викликаючи ураження слизових оболонок, нервової системи й органів кровотворення. Для дослідження впливу гідрогену сульфід на розвиток запалення у товстій кишці ми використали натрію гідрогенсульфід, який вводили у дозах 1 мг/кг та 10 мг/кг. Дослідження проводили на нелінійних щурах, експериментальний коліт моделювали шляхом введення розчину оцтової кислоти у товсту кишку. Для оцінки розвитку запалення проводили макроскопічне дослідження слизової оболонки товстої кишки, визначали площу запалення й індекс структурно-геморагічних ушкоджень, активність мієлопероксидази. Щоб оцінити вплив натрію гідрогенсульфід на NO-синтазну систему, визначали активність ізоформ NO-синтази (iNOS, cNOS), вміст L-аргініну у слизовій оболонці товстої кишки та пероксинітриту в сироватці крові щурів. Було встановлено наявність цитопротекторних властивостей натрію гідрогенсульфід у дозі 1 мг/кг та прозапального ефекту, обумовленого введенням дози 10 мг/кг.

Ключові слова: гідрогенсульфід натрію, NO-синтаза, експериментальний коліт.

У регуляції процесів цитопротекції та ульцерогенезу значну роль відіграють так звані газові медіатори, до яких належать нітрогену (II) оксид (NO) і гідрогену сульфід (H_2S). Значна кількість фізіологічних процесів, таких як регуляція кровоплину, секреція залоз, моторика, міжклітинна комунікація регулюється за участі NO [12]. Відомо, що ульцерогенез у товстій кишці (ТК) супроводжується різким зростанням його синтезу і за таких умов NO перетворюється на високотоксичні радикали, зокрема, на пероксинітрит [10]. H_2S бере активну участь у механізмах захисту слизової оболонки ТК (СОТК) від чинників агресії, діючи як вазодилататор, нейромодулятор [8]. Окрім цього, H_2S володіє антиоксидантною, антиапоптичною та протизапальною дією, знижує адгезію лейкоцитів до ендотелію не лише у травному тракті, але й у інших органах [11, 13].

Нещодавніми дослідженнями показано існування взаємозв'язку між синтезом H_2S та NO в органах травної системи. Зокрема, доведено, що H_2S знижує експресію iNOS [9]. Проте механізми зазначеного взаємозв'язку і його роль у регуляції цитопротекції та ульцерогенезу в ТК залишаються малодослідженими.

Крім того, H_2S вводиться до складу певних нестероїдних протизапальних засобів (НПЗЗ) (АТВ-346, АТВ-348) та похідних 4-тіазолідинону (Les-5054, Les-5055), щоб зменшити їх ульцерогенний ефект [14, 3].

Метою даного дослідження було встановити зміни системи L-аргінін/NO-синтаза/NO, продукції NO й активності мієлопероксидази за умов введення різних доз NaSH.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на нелінійних статевозрілих щурах обох статей масою 200-220 г з дотриманням вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Тварин утримували на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води і тривалістю світлового дня 12 год. За добу до експерименту щурів повністю обмежили в їжі, залишивши доступ до води. Щурів було поділено на шість груп по 10 тварин у кожній: 1 група - контрольна (інтактні щури), тваринам 2 та 3 груп вводили NaSH у дозах 1 мг/кг (2 група) та 10 мг/кг (3 група). Щурам 4, 5, 6-ї груп моделювали експериментальний коліт (ЕК) з використанням оцтової кислоти [7]. Тваринам 5-ї групи вводили NaSH у дозі 1 мг/кг, а тваринам 6-ї групи – у дозі 10 мг/кг за 1 годину до моделювання ЕК. Досліджувану сполуку вводили у формі водного розчину (об'єм – 1 мл) внутрішньошлунково. Через добу після моделювання ВК здійснювали евтаназію.

Для біохімічного дослідження СОТК за допомогою скальпеля відсепарували, гомогенізували в охолоджену 0,9% розчині натрію хлориду у співвідношенні 1:5 при швидкості обертів гомогенізатора 3000 об/хв. Для осадження грубодисперсних залишків клітин гомогенати центрифугували при 1600 g ($t=0...-4$ °C).

В отриманих супернатантах визначали активність NO-синтази (NOS) за накопиченням новосинтезованого L-цитруліну [2], мієлопероксидази (МПО) [6], L-аргініну за реакцією Сакагучі [1]. У сироватці крові визначали вміст пероксинітриту [5]. Абсорбцію вимірювали на біохімічному аналізаторі StatFax 1904 (США).

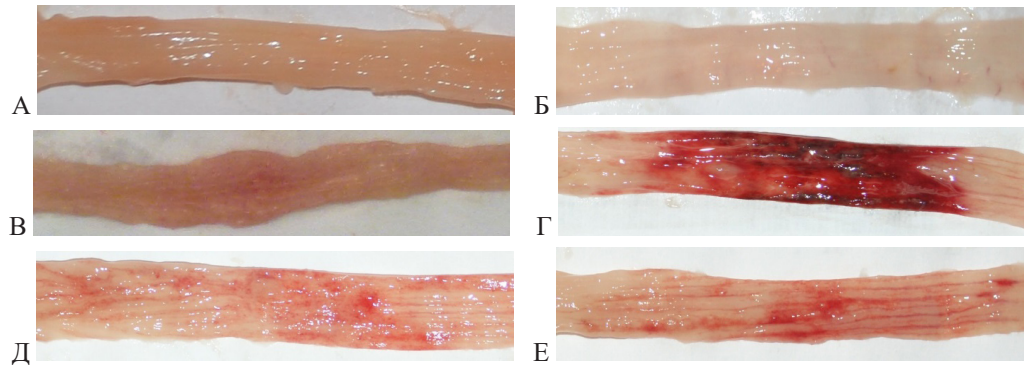
Статистичний аналіз здійснювали за допомогою програми OriginPro 7.0. Дані представлені як середнє арифметичне (M) та стандартне відхилення (m), достовірність визначали за допомогою t-критерію Стьюдента, оскільки розподіл, визначений за допомогою тесту Шапіро-Вілка, виявився нормальним.

Результати і їхнє обговорення

При введенні NaSHу дозі 1 мг/кг жодних деструктивних ушкоджень не спостерігали, проте при введенні NaSHу дозі 10 мг/кг відзначали ерозивні ушкодження СОТК (див. рисунок, Б, В). Зокрема, при введенні NaSH у дозі 10 мг/кг площа ушкоджень СОТК становила $0,6 \pm 0,1$ мм², а індекс СГУ – $2 \pm 0,2$ порівняно з контролем. Моделювання ЕК зумовило появу ушкоджень площею $12,4 \pm 3,3$ мм² та індексом СГУ $11,3 \pm 2,0$. Встановлено, що при введенні NaSHу дозі 1 мг/кг площа ушкоджень СОТК знизилася на 33 % ($P \leq 0,05$), а індекс СГУ – на 38 % ($P \leq 0,01$) порівняно з ЕК. Збільшення дози NaSH у 10 разів зумовило схожий вплив, проте менш виражений і статистично недостовірний – площа ушкоджень становила $11,1 \pm 3,4$, а індекс СГУ – $11,7 \pm 2,6$.

При ВК спостерігалось різке зростання (у 5,6 разу порівняно з контролем, $P \leq 0,001$) активності одного з маркерів запалення – МПО – ензиму, що міститься в нейтрофілах і використовує пероксид водню для продукції гіпохлорит-аніона, який зумовлює неспецифічний антибактеріальний захист [6]. Відтак, МПО можна вважати свого роду ензимом антиоксидантного захисту. В результаті введення NaSH у дозі 1 мг/кг спостерігалось

зниження активності МПО на 21 % ($P \leq 0,05$), у дозі 10 мг/кг – зростання у 3,2 разу ($P \leq 0,001$) порівняно з контролем (див. таблицю). Введення NaSH на тлі ЕК зумовило зниження активності МПО у 5-й групі на 21 % ($P \leq 0,05$) та зростання активності МПО на 19 % ($P \leq 0,05$) у 6-й групі порівняно з ЕК.



Макроскопічні зміни СOTК при введенні NaSH на тлі ЕК: А – контроль; Б – NaSH 1 мг/кг; В – NaSH 10 мг/кг; Г – ЕК; Д – NaSH 1 мг/кг + ЕК; Е – NaSH 10 мг/кг + ЕК

Відомо, що активність iNOS зростає при накопиченні прозапальних цитокінів [9]. Введення NaSH у дозі 1 мг/кг суттєво не вплинуло на зміну активності iNOS, проте у дозі 10 мг/кг вона зростала в 4,1 разу ($P \leq 0,001$) порівняно з контролем (див. таблицю). Спостерегалось різке її зростання у групі ЕК – у 4,3 разу ($P \leq 0,001$) порівняно з контролем. Введення NaSH на тлі ЕК у дозі 1 мг/кг зумовило зниження активності iNOS на 46 % ($P \leq 0,001$), а при дозі 10 мг/кг її активність достовірно не змінилась.

Введення обох доз NaSH зумовлювало зниження активності cNOS – у 2-й групі на 20 % ($P \leq 0,05$), а у 3-й групі – на 49 % ($P \leq 0,01$) порівняно з контролем. У групі з ЕК спостерегалось зниження активності cNOS – на 29 % ($P \leq 0,001$) порівняно з контролем. Введення NaSH у дозі 1 мг/кг на тлі коліту підвищувало активність cNOS на 25 % ($P \leq 0,05$), а у дозі 10 мг/кг – знижувало на 41 % ($P \leq 0,05$) порівняно з ЕК.

Субстратом для NOS є амінокислота L-аргінін, вміст якої у СOTК змінювався. Концентрація L-аргініну на тлі введення NaSH змінювалась відповідно до змін активності NOS – у 2-й групі вона не змінювалась, у 3-й – знижувалася на 23% ($P \leq 0,05$) порівняно з контролем. Моделювання ЕК призводило до зниження концентрації L-аргініну на 27 % ($P \leq 0,001$) порівняно з контролем. Введення NaSH у дозі 10 мг/кг на тлі ЕК зумовило зниження на 34 % ($P \leq 0,05$) порівняно з ЕК (див. таблицю).

Зміни активності МПО, iNOS, cNOS, концентрації L-аргініну у СOTК і пероксинітриту в сироватці крові щурів за умов введення NaSH

Показник	1 група (контроль)	2 група (NaSH 1 мг/кг)	3 група (NaSH 10 мг/кг)	4 група (ЕК)	5 група (NaSH 1 мг/кг + ЕК)	6 група (NaSH 10 мг/кг + ЕК)
МПО, МО / мгбілка	4,75±1,7	3,76±0,5	15,3±1,8***	26,5±2,6***	20,9±5,7	31,5±8,5
iNOS, нмоль L-цитруліну / хв·мгбілка	162±44	152±16	665±76***	702±136***	380±83###	827±11
cNOS, нмоль L-цитруліну / хв·мгбілка	677±108	545±94	349±62**	482±32***	604±163	283±22
L-аргінін, кмоль / л	95±23,7	97±8,2	73±11,7*	69±11,4***	72±14,2	46±11,9#
Пероксинітрит, кмоль / л	10,7±2,9	10,5±2,7	26,8±2,2**	27,4±4,7***	25,4±5,0	28,7±7,6

Примітка: $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**), 0,001 (***) порівняно з контролем; $P \leq 0,05$ (#), 0,001 (###) порівняно з ЕК.

Концентрація нітрит-аніона за умов введення NaSH змінювалась таким чином: у 2-й групі мала тенденцію до зростання, проте достовірно не змінювалась, у 3-й групі знижувалася на 55 % порівняно з контролем (див. таблицю). Моделювання ЕК зумовлювало зростання концентрації нітрит-аніону в 3,2 разу порівняно з контролем, введення NaSH у дозі 1 мг/кг спричинило її зниження на 76 %, а у дозі 10 мг/кг 75 % порівняно з ЕК (див. таблицю).

Введення NaSH у дозі 1 мг/кг не впливало на концентрацію пероксинітриту в сироватці крові, тоді як дозування 10 мг/кг зумовило зростання вмісту пероксинітриту у 2,5 разу ($P \leq 0,001$) порівняно з контролем. Моделювання ЕК спричинило зростання концентрації пероксинітриту у 2,6 разу ($P \leq 0,001$) порівняно з контролем, тоді як введення NaSH на тлі коліту не зумовило статистично достовірних змін, проте мало тенденцію до зростання при дозі 10 мг/кг і зниження при дозі 1 мг/кг порівняно з групою ЕК у сироватці крові щурів.

Висновки

1. Введення щурам з експериментальним колітом NaSH у дозі 1 мг/кг проявляло цитопротекторну дію, знижувало активність МПО, iNOS, підвищувало вміст L-аргініну та знижувало продукцію пероксинітриту в сироватці крові.

2. У дозі 10 мг/кг NaSH викликало прозапальні зміни у СОТК щурів на тлі коліту, що проявлялося зростанням активності МПО та iNOS, зниженням вмісту L-аргініну та зростанням концентрації пероксинітриту в сироватці крові.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Голиков П. П., Матвеев С. Б., Пахомова Г. В. Динамика экскреции конечного продукта оксида азота и нитрита с мочой при перитоните // Клини. Лаб. Диагностика. 1999. №9. С. 17-18.
2. Раваева М. Ю., Чуян Е. Н. Изменение активности системы синтеза оксида азота под действием низкоинтенсивного миллиметрового излучения // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. 2011. Т. 24 (63). №4. С. 201-210.
3. Фоменко І. С. Системи нітрогену оксиду та гідрогену сульфїду у механїзмах ушкодження слизової шлунка та товстої кишки : автореф. дис. д-ра біол. наук: 03.00.04. К, 2016. 40 с.
4. Фоменко І. С., Бондарчук Т. І., Білецька Л. П. та ін. Вивчення ролі NO-синтазної системи у слизовій оболонці шлунка щурів за умов впливу нестероїдних протизапальних препаратів на тлі адреналін-індукованого стресу // Вісник проблем біології та медицини. 2013. Т. 3. № 1(102). С. 245-249.
5. Alnahsbandi A. A., Al-Nimer S. M., Alhassani A. N. High serum peroxynitrite level is an early effect of chronic cigarette smoking. // Saudi J. Health Sci. 2012. Vol. 1. Issue 3. P. 139-143.
6. Bradley P. P., Christensen R. D., Rothstein G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation // Blood. 1982. Vol. 60. P. 618-622.
7. Fedorak R. N., Empey L. R., MacArthur C., Jewell L. D. Misoprostol provides a colonic mucosal protective effect during acetic acid-induced colitis in rats // Gastroenterol. 1990. Vol. 98. №3. P. 615-625.
8. Kolluru G. K., Shen X., Bir S. C., Kevil C. G. Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection // Nitric Oxide. 2013. Vol. 35. P. 5-20.
9. Kolluru G. K., Shen X., Kevil C. G. A tale of two gases: NO and H₂S, foes or friends for life? // Redox Biol. 2013. Vol. 1. P. 313-318.

10. *Lanas A.* Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract // *Arthritis Res. Ther.* 2008. Vol. 2. №10. P. 4.
11. *Liu L., Cui J., Song Ch.-J.* et al. H₂S-Releasing Aspirin Protects against Aspirin-Induced Gastric Injury via Reducing Oxidative Stress // *PLoS ONE.* 2012. № 7.
12. *Lundberg J.O., Weitzberg E.* Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract // *Gut.* 2013. Vol. 62. P. 616-626.
13. *Predmore B. L., Lefer D. J., Gojon G.* Hydrogen Sulfide in Biochemistry and Medicine // *Antioxid. Redox. Signal.* 2012. Vol.17. P. 119-140.
14. *Wallace J. L.* Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs // *Trends Pharmacol. Sci.* 2007. Vol. 28. Issue 10. P. 501-505.

*Стаття: надійшла до редакції 19.06.16
доопрацьована 1.09.16
прийнята до друку 5.09.16*

МОДЕЛИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ NO-СИНТАЗНОЙ СИСТЕМЫ ГИДРОГЕНСУЛЬФИДОМ НАТРИЯ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС ПРИ УСЛОВИЯХ КОЛИТА

Н. Денисенко*, Ю. Федевич, А. Скляр

*Кафедра биологической химии
Львовский национальный медицинский университет
имени Данила Галицкого
ул. Пекарская, 69, Львов 79010, Украина
e-mail: denysenko.natalka@gmail.com*

Сульфид водорода вызывает значительный интерес среди ученых, поскольку он как один из газовых медиаторов обладает вазодилатирующими, антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. Некоторые современные подходы к поиску новых, более эффективных и безопасных лекарственных средств базируются в том числе и на включении молекулы сульфида водорода в структуру соединения. Однако в высоких концентрациях сероводород может ингибировать ферменты дыхательной цепи путем связывания атомов железа цитохромов, вызывая поражения слизистых оболочек, нервной системы и органов кроветворения. Для исследования влияния сульфида водорода на развитие воспаления в толстой кишке нами был использован ангироденсульфид натрия, который вводили в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг. Исследования проводили на нелинейных крысах, экспериментальный колит моделировали путем введения раствора уксусной кислоты в толстую кишку. Чтобы оценить развитие воспаления, проводили макроскопическое исследование слизистой оболочки толстой кишки, определяли площадь воспаления и индекс структурно-геморрагических повреждений, активность миелопероксидазы. Чтобы оценить влияние гидрогенсульфида натрия на NO-синтазную систему, определяли активность изоформ NO-синтазы (iNOS, cNOS), содержание L-аргинина в слизистой оболочке толстой кишки и пероксинитрита в сыворотке крови крыс. Было установлено наличие цитопротекторных свойств гидрогенсульфида натрия в дозе 1 мг/кг и провоспалительного эффекта, обусловленного введением дозы 10 мг/кг.

Ключевые слова: гидрогенсульфид натрия, NO-синтаза, экспериментальный колит.

**NO-SYNTHASE ACTIVITY MODELLING BY SODIUM HYDROGENSULFIDE
IN RAT'S COLON MUCOSA IN CONDITIONS OF COLITIS****N. Denysenko*, Yu. Fedevych, A. Sklyarov**

*Department of Biological Chemistry
Danylo Halytsky Lviv National Medical University
69, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine
e-mail: denysenko.natalka@gmail.com*

Hydrogen sulfide generates significant interest among scientists because it, as one of the gas mediators, has vasodilator, antioxidant and anti-inflammatory properties. Some current approaches to find new, more effective and safe medicines are also based on the inclusion of the molecule of hydrogen sulfide in the structure of the compound. However, high concentrations of hydrogen sulfide can inhibit enzymes of the respiratory chain by binding iron atoms in cytochromes, causing lesions of the mucous membranes, nervous system and the blood. We used sodium of hydrogen, which was administered in doses 1 mg / kg and 10 mg / kg to investigate the influence of hydrogen sulfide on the development of inflammation in the colon. The study was conducted in nonlinear rats, experimental colitis was modeled by introducing a solution of acetic acid in the colon. Macroscopic study of the mucous membrane of the colon, determination of the area of inflammation and indexstructure-bleeding injuries, activity of myeloperoxidase was used for evaluation of colon mucosa inflammation. the activity of isoforms of NO synthase (iNOS, sNOS), the content of L-arginine in the mucosa of the colon and peroxynitrite in serum of rats was determined to find the impact of sodium hydrogensulfide on NO-synthase system. The presence of cytoprotective properties of sodium hydrogen sulfide at a dose 1 mg/kg and proinflammatory effects caused by administration of a dose of 10 mg/kg was found.

Keywords: sodium hydrogen sulfide, NO-synthase, experimental colitis.