УДК 612.79-015-092.18-092.9:615.916’175

Д. О. Хміль, В. О. Костенко
ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

РОЛЬ NO-СИНТАЗИ І АРГІНАЗИ У МЕХАНІЗМАХ ДЕЗОРГАНІЗАЦІЇ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ ШКІРИ ЩУРІВ ЗА УМОВ НАДЛИШКОВОГО НАДХОДЖЕННЯ В ОРГАНІЗМ НІТРАТУ НАТРІЮ

У експерименті на 35 білих щурах досліджено вплив інгібіторів NO-синтази і аргінази на показники деполімеризації колагену та протеоглiканів і біомеханічні властивості шкіри за умов 30-денної інтоксикації нітратом натрію. Виявлено, що селективне пригнічення індуцибельної NO-синтази аміногуанідином за умов експерименту зменшує колагеноліз та деполімеризацію протеоглiканів у дермі, підвищує міцність та еластичність шкіри, що вказує на патогенетичне значення цього ізоферменту у процесі дезорганізації сполучної тканини шкіри та порушенні її біомеханічних властивостей. Пригнічення аргінази L-норваліном за умов експерименту збільшує у тканинах шкіри колагеноліз та деполімеризацію протеоглiканів, зменшує її міцність та еластичність, що свідчить про дерматопротекторні властивості ферментів аргіназного шляху метаболізму L-аргініну.

Ключові слова: інтоксикація нітратами, NO-синтаза, аргіназа, сполучна тканина, колагеноліз, деполімеризація протеоглiканів, шкіра.

Робота є фрагментом НДР «Роль активних форм кисню, системи оксиду азоту та транскрипційних факторів у механізмах патологічного системогенезу», № держреєстрації 0114U004941.

Основним білком сполучної тканини шкіри, що забезпечує її пружність і еластичність, є колаген. Ця макромолекула має унікальний амінокислотний склад – 33% гліцину і близько 20% амінокислот проліну і оксипроліну. Саме збільшення концентрації останнього в тканинах розцінюється як маркер колагенолізу, оскільки лише до 1% оксипроліну знаходиться у вільному вигляді [8].

Іншим важливим компонентом сполучної тканини шкіри є протеоглiкани – високомолекулярні агрегати, що складаються з глікозаміногліканів (ГАГ) і білкового кора, об'єднаних трисахаридною ланкою [3]. Вони забезпечують такі характеристики шкіри як гідратація, міцність на стиск, здатність деформуватися і долати деформацію, відновлювати свій гідратований стан. Це також сприяє правильній організації колагенових волокон (упаковці молекул тропоколагену в фібрили) і обмежує їхнє зростання в довжину [8].

Нещодавно показано, що надлишкове утворення оксиду азоту (NO) з екзогенних попередників (нітратів, нітритів) значно змінює спрямованість фізіологічних ефектів цієї молекули, обумовлює розвиток окисно-нітративного стресу [4, 6]. Останній викликає дезорганізацію сполучної тканини, зокрема, кісток [2].

В останні роки виявлено, що патогенез окисно-нітративного стресу може бути пов'язаний з порушенням механізму авторегуляції рівня NO в тканинах («цикл оксиду азоту»), що призводить до надмірної активації індуцибельної NOS (iNOS) і дисфункції аргіназного метаболічного шляху, який конкурує з NO-синтазним за субстрат – L-аргінін [4,10].

Проте механізми дезорганізації сполучної тканини шкіри ссавців, залежні від функціональної активності NOS і аргінази, залишаються нез’ясованими.

Метою роботи було вивчення впливу інгібіторів NOS і аргінази на показники деполімеризації колагену та протеоглiканів і біомеханічні властивості шкіри щурів за умов 30-денної інтоксикації нітратом натрію.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження були проведені на 35 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-220 г у 5-ти серіях дослідів: у першій необхідні показники вивчали у інтактних тварин (контрольна серія), у другій – після відтворення 30-денної інтоксикації нітратом натрію, у третій, четвертій і п’ятій – тваринам поряд з призначенням нітрату натрію вводили відповідно селективний інгібітор нейрональної NOS (nNOS) – 7-нітроіндазол (7-NI), селективний інгібітор iNOS – аміногуанідин (AG), а також неселективний інгібітор аргінази – L-норвалін.

Нітрат натрію призначали внутрішньошлунково за допомогою зонда в дозі 200 мг/кг маси тіла у вигляді водного розчину. Інгібітори NOS і аргінази (всі виробництва фірми “Sigma-Aldrich, Inc.”, США) вводили внутрішньоочеревинно, починаючи з 15-ї доби інтоксикації, у дозах: 7-NI і AG – відповідно 30 мг/кг та 20 мг/кг (2 рази на тиждень) [1], L-норвалін – 10 мг/кг (через день) [5]. Тварин декапітували під ефірним наркозом. Стан колагену і протеоглiканів визначали за вмістом в гомогенаті шкіри вільного оксипроліну (ВО) [7] і гексуронових кислот (ГК) [9]. Біомеханічні характеристики шкіри оцінювали на підставі дослідження розривного навантаження і відносного подовження стандартного зразка шкіри спини (5 × 2 см).

Отримані дані обробляли варіаційно-статистичним методом з використанням критерію Ст'юдента.

Результати дослідження та їх обговорення. Введення нітрату натрію протягом 30 діб (див. табл.) підвищує вміст у тканинах шкіри ВО та ГК відповідно на 66,5% (p<0,001) та у 2,4 рази (p<0,001), що вказує на суттєву активацію у дермі процесів колагенолізу та деполімеризації ГАГ. При цьому знижуються величини розривного навантаження та відносного подовження зразків шкіри – на 19,1% (p<0,001) та 16,5% (p<0,001), що свідчить про зниження механічної міцності шкіри та її еластичності.

Таблиця

Вплив інгібіторів NOS і аргінази на маркери дезорганізації сполучної тканини шкіри та її тензометричні характеристики за умов надлишкового надходження нітрату натрію у організм щурів (M+m, n=35)

Показники	Серії дослідів				
	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію (30 діб)			
		Контроль	+ 7-NI	+ AG	+ L-норвалін
ВО, мкмоль/г	4,00±0,24	6,66±0,16 *	7,11±0,16 *	3,83±0,17 **	7,82±0,16 */**
ГК, мкмоль/г	20,82±2,88	50,08±1,69 *	45,83±2,8 *	26,94±2,34 **	55,31±1,19 */**
Розривне навантаження, Н	83,9±0,7	67,9±1,4 *	71,1±1,8 *	77,8±1,4 */**	60,7±1,6 */**
Відносне подовження,%	18,2±0,6	15,2±0,2 *	14,8±0,5 *	18,0±0,2 **	12,1±0,3 */**

Примітки: * – p<0,05 у порівнянні з даними інтактних щурів; ** – p<0,05 у порівнянні з даними другої серії.

Введення 7-NI за умов експерименту не позначається на концентрації ВО та ГК у тканинах шкіри щурів у порівнянні з даними другої серії. Проте застосування AG зменшує у шкірі вміст цих сполук – відповідно на 42,5% (p<0,001) та 46,2% (p<0,001). Це підкреслює роль iNOS у активації колагенолізу та деполімеризації протеогліканів у дермі за умов надлишкового надходження нітрату натрію у організм щурів.

Застосування L-норваліну за умов експерименту підвищує у дермі вміст ВО та ГК – відповідно на 17,4% (p<0,001) та 10,4% (p<0,05) у порівнянні з даними другої серії.

Отримані результати віддзеркалюють роль аргінази як протектора сполучної тканини, що регулює синтез колагену та протеогліканів у дермі та запобігає їхню деполімеризацію [12].

Все це закономірно призводить до змін тензометричних параметрів шкіри. Так, призначення AG збільшує розривне навантаження та відносне подовження – відповідно на 14,6% (p<0,001) та 18,4% (p<0,001), що свідчить про зростання механічної міцності шкіри та її еластичності. Застосування L-норваліну, навпаки, зменшує розривне навантаження та подовження зразків шкіри – на 10,6% (p<0,01) та 20,4% (p<0,001) у порівнянні з даними другої серії, що свідчить про зменшення механічної міцності та еластичності шкіри щурів.

Відомо, що саме аргіназний шлях метаболізму L-аргініну постачає поліаміни – важливі регулятори біосинтезу білка та клітинної проліферації [11].

Висновки

1. Селективне пригнічення iNOS за умов надлишкового надходження нітрату натрію, на відміну від nNOS, зменшує колагеноліз та деполімеризацію протеогліканів у дермі, підвищує міцність та еластичність шкіри, що вказує на патогенетичне значення цього ізоферменту у процесі дезорганізації сполучної тканини шкіри щурів та порушенні її біомеханічних властивостей.
2. Пригнічення аргінази L-норваліном за умов експерименту збільшує у тканинах шкіри колагеноліз та деполімеризацію протеогліканів, зменшує її міцність та еластичність, що свідчить про дерматопротекторні властивості ферментів аргіназного метаболічного шляху.

Список літератури

1. Bogdanov A. V. Mehanizmyi dizregulyatsii nitroksidergichnoy sistemyi v tkanyah parodonta kryis pri izbyitochnom postuplenii nitrata i ftorida natriya / A. V. Bogdanov, Yu. M. Grishko, V. A. Kostenko // Wiad Lek. – 2016. – Vol. 69, No.3 (Pt. 2). – P. 457-461.
2. Dolzhkova K. P. Vplyv pryhnichennia ta induktsii NO-syntaz na biokhimichnyi sklad kistkovoi tkanyny nyzhnoi shchelepy pry vidtvorenni yii perelomu na tli khronichnoi intoksykatsii nitratom natriiu / K. P. Dolzhkova, V. O. Kostenko // Problemy ekolohii ta medytsyny. – 2010. – T. 14, No. 1–2. – S. 35–38.
3. Zimnitskiy A. N. Glikozaminoglikanyi v biohimicheskih mehanizmah adaptatsii organizma k nekotoryim fiziologicheskim i patologicheskim sostoyaniyam / A. N. Zimnitskiy, S. A. Bashkatov //– M.: Farmatsevticheskiy byulleten, - 2004. – 235 s.

4. Kostenko V. O. Mekhanizmy autorehuliatsii utvorennia oksydu azotu v orhanizmi ssavtsiv ta yikh porushennia pry rozvytku patolohichnykh protsesiv / V. O. Kostenko, N. V. Soloviova, O. V. Kovalenko [ta in.] // Aktualni problemy suchasnoi medytsyny: Visn. Ukrainskoi med. stomatol. akademii. – 2011. – T.11, No.3. – C. 150-154.
5. Nahorniak I. V. Rol arhinazy u mekhanizmakh porushen vilnoradykalnykh protsesiv ta funktsii slynnykh zaloz shchuriv za umov dii metylovoho efiru metakrylovoi kysloty / I. V. Nahorniak, V. O. Kostenko // Aktualni problemy suchasnoi medytsyny: Visn. Ukrainskoi med. stomatol. akademii. – 2015. – T. 15, No.2. – C. 191-194.
6. Reutov V. P. Mehanizm antiradikalnoy zaschityi kletok i organizma v tselom zalozhen v tsiklicheskoy organizatsii teh metabolicheskih protsessov, kotoryie sopryazhenyi s obrazovaniem svobodnyih radikalov / V. P. Reutov // Patofiziologiya i farmatsIya: shlyahi IntegratsIYi : tezi dop. VII nats. kongr. patofiziologiv Ukrayini z mIzhnarodnoyu uchastyu (5-7 zhovtnya 2016 r.). – Harkiv: Vid-vo NFaU, -2016. –191 s.
7. Tetyanets S. S. Metod opredeleniya svobodnogo oksiprolina v syivorotke krovi / S. S. Tetyanets // Labor. delo. – 1985. – No.1. – S. 61-62.
8. Tseluyko S. S. Morfofunktsionalnaya harakteristika dermyi kozhi i eYo izmeneniya pri starenii / S. S. Tseluyko, E. A. Malyuk, L. S. Korneeva [i dr.] // Byull. fiziol. i patol. dyihaniya. – 2016. – No. 60. – S. 111-116.
9. Sharaev P. N. Metod opredeleniya glikozaminoglikanov v biologicheskih zhidkostyah / P. N. Sharaev, V. N. Pishkov, N. I. Soloveva [i dr.] // Lab. delo. – 1987. – No.5. – S.330-332.
10. Akimov O. Ye. Functioning of nitric oxide cycle in gastric mucosa of rats under excessive combined intake of sodium nitrate and fluoride / O. Ye. Akimov, V. O. Kostenko // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 88, No.6. – P. 70-75.
11. Moinard C. Polyamines: metabolism and implications in human diseases / C. Moinard, L. Cynober, J. P. de Bandt // Clin. Nutr. – 2005. – Vol. 24, No.2. – P. 184-197.
12. Wu G. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease / G. Wu, F.W. Bazer, T.A. Davis [et al.] // Amino Acids. – 2009. – Vol. 37, No.1. – P. 153-168.

Реферати

РОЛЬ NO-СИНТАЗЫ И АРГИНАЗЫ В МЕХАНИЗМЕ ДЕЗОРГАНИЗАЦИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ КОЖИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ИЗБЫТОЧНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ В ОРГАНИЗМ НИТРАТА НАТРИЯ

Хмиль Д. А., Костенко В. А.

В эксперименте на 35 белых крысах исследовано влияние ингибиторов NO-синтазы и аргиназы на показатели деполимеризации коллагена и протеогликанов, а также биомеханические свойства кожи в условиях 30-дневной интоксикации нитратом натрия. Выявлено, что селективное ингибирование индуцибельной NO-синтазы аминогуанидином в условиях эксперимента уменьшает коллагенолиз и деполимеризацию протеогликанов в дерме, повышает прочность и эластичность кожи, что указывает на патогенетическое значение этого изофермента в процессе дезорганизации соединительной ткани кожи и нарушении её биомеханических свойств. Ингибирование аргиназы L-норвалином в условиях эксперимента увеличивает в тканях кожи коллагенолиз и деполимеризацию протеогликанов, уменьшает её прочность и эластичность, что свидетельствует о дерматопротекторном действии ферментов аргиназного метаболического пути.

Ключевые слова: интоксикация нитратами, NO-синтаза, аргиназа, соединительная ткань, коллагенолиз, деполимеризация протеогликанов, кожа.

Стаття надійшла 9.03.2017 р.

ROLE OF NO-SYNTHASE AND ARGINASE IN MECHANISMS OF SKIN CONNECTIVE TISSUE DISRUPTION IN RATS EXPOSED TO EXCESSIVE SODIUM NITRATE INTAKE

Khmil' D. O., Kostenko V. O.

This experiment was designed to study the effects of NO-synthase and arginase inhibitors on the indicators of collagen and proteoglycans depolymerization in the skin, as well as its biomechanical properties in 35 white Wistar male rats exposed to excess sodium nitrate intake for 30 days. It has been found out that selective inhibition of inducible NO-synthase by aminoguanidine in the experimental conditions reduces collagenolysis and proteoglycans depolymerization in the dermis, increases strength and elasticity of the skin that indicates the pathogenic role of this isoform in the disruption of skin connective tissue and impairment of its biomechanical properties. Arginase inhibition by L-norvaline increases collagenolysis and proteoglycans depolymerization in the tissues of the skin, reduces its strength and elasticity. This suggests dermatoprotective properties of enzymes of arginase metabolic pathway.

Key words: intoxication nitrates, NO-synthase, arginase, connective tissue, collagenolysis, proteoglycans depolymerization, skin.

Рецензент Непорада К.С.