

УДК 612.32+616-008.6+616-003.233

## Особенности периодической активности желудка за умов дисбалансу NO-ергічної системи

О.В. Севериновська, О.О. Галінський, А.І. Руденко, О.Б. Мурзін, В.В. Бабічева, Л.Д. Скубицька

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна*

Результатом тривалого уведення донатора NO є перебування періодичної моторної та секреторної активності шлунка. Зменшувались показники моторного індексу на 6-ту добу, суттєво (на 56%) знижувалась міоелектрична активність шлунка на 12-ту добу. Зміни секреторної функції шлунка проявлялися у достовірному зменшенні об'єму виділення шлункового соку в 2,0 та 3,3 раза, зростанні pH, зниженні концентрації глікопротеїнів на 57 та 39%, збільшенні концентрації пепсину в 1,8 та 2,6 раза на 6- та 12-ту добу відповідно. За цих змін спостерігали розбалансування механізмів регуляції секреторної активності шлунка, а вплив натрію нітропрусиду на головні та поверхневі епітеліальні клітини слизової оболонки шлунка був вираженіший у разі збільшення тривалості дії чинника. При уведенні блокатора синтезу NO – L-NNA порушувалась фазова картина міоелектричної активності (МЕА) шлунка, яка ставала подібною до переходу між II та III фазами. Показники міоелектричного імпульсу (МІ) підвищувались в 1,3 раза на 6-ту добу уведення блокатора. На 12-ту добу спостерігали зміну характеру скорочень у всіх фазах МЕА шлунка та зниження МІ на 28%. Перебудови секреторної функції шлунка проявлялися достовірним збільшенням об'єму шлункового соку на 61 та 17%, у значному зростанні його pH на 6-та 12-ту добу відповідно. Встановлено порушення кислототвірної функції шлунка та активності пілоричного сфінктера, спричинене закиданням дуоденального вмісту до шлунка.

*Ключові слова:* оксид азоту; натрій нітропрусид; L-NNA; шлункова секреція; міоелектрична активність шлунка

## Features of the gastric periodic activity in conditions of NO-ergic system disbalance

O.V. Severynovska, O.O. Galinskij, A.I. Rudenko, O.B. Mursin, V.V. Babicheva, L.D. Skubytska

*Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine*

Nitric oxide is the main inhibitory mediator of the gastrointestinal smooth muscles' relaxation which stimulates duodenal mucus and bicarbonate secretion. More recent studies have demonstrated that NO also protected the gastrointestinal tract by inhibiting gastric acid secretion. In this study we investigated gastric secretory and motor activity considering the NO imbalance condition. The experiments were carried out on male white laboratory rats (200–230 g). The control group was treated with 0.9% NaCl solution. The injections of NO donator (1.5 mg/kg of 0.1% (Sigma-Aldrich) sodium nitroprusside solution) were made in the second and the third groups during 6 and 12 days. The fourth and the fifth group were treated with NO synthesis inhibitor (40 mg/kg of 1% solution (Sigma-Aldrich) N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine) during 6 and 12 days respectively. Recording of gastric myoelectric activity (GMA) and gastric juice collection were carried out under anesthesia (ketamine, 110 mg/kg). Next, its volume, pH, glycoprotein and pepsin were measured. Within 6-days stimulation of NO excess decreased gastric juice volume by 47% and increased pH compared to control samples. Pepsin level increased by 62% and glycoprotein level decreased by 68% compared to the checkpoint. After 6 days of L-NNA injections we observed the increase of gastric juice secretion volume (78%) and pH level, however, pepsin concentration remained unchanged. Glycoprotein level increased by 21% compared to control samples. After 12 day NO synthesis inhibitor injections gastric secretion volume increased by 85%. Gastric juice pH level was 200% higher than the control value and exceeded gastric juice pH level (62%) in the third group. In addition, pepsin level tended to decrease when NO deficiency simulation was prolonged. Glycoprotein level decreased by 41% compared to control samples and by 51% compared to the third group. Pepsin level decreased after 12 day NO-inhibitor injections as gastric juice pH level increased. After 12 day Na-nitroprusside treatment, gastric myoelectric index decreased by 42% compared to the checkpoint. The type of contractions is typical to the I phase of the basic electrical rhythm (BER). Also, retrograde entrainment of duodenal rhythm took place. After 6 day L-NNA injections, GMA was the same as

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49010, Україна.*

*Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin Ave., 72, Dnipropetrovsk, 49010, Ukraine.*

*Tel.: +38-050-565-73-81, +38-067-567-67-56. E-mail: e\_severinovskaya@mail.ru, alexejgalinskij@gmail.com, viktoriya03@gmail.com*

the period between II and III phase of BER. Late second and early third phases predominated, while the I phase wasn't detected during the recording. In case of long-lasting disorder of *NO*-system, motor index value significantly differed from the control group samples and depended on the duration of *NO*-synthase blocking. On the 6th day of L-NNA treatment, the level of motor index increased 1.5 times. GMA phases could be identified only on the basis of motor index values. Stomach's own rhythms disappeared and duodenogastric reflux resulted in domination of duodenal rhythms. After 12 day L-NNA injections, duration of the II and III phases increased while the I phase of gastric BER disappeared; gastric motor index decreased by 27%. After considering the results of the current investigation, it can be stated that *NO* system imbalance leads to desynchronization of gastric active phases and, perhaps, reassigns the influence of different compensatory-adaptive mechanisms. The longer is the L-NNA treatment, the more gastric functions are imbalanced and the stronger is the process of destruction.

*Keywords:* nitric oxide; sodium nitroprusside; L-NNA; gastric secretion; gastric myoelectrical activity

## Вступ

Оксид азоту (*NO*) – важливий фактор, який характеризує не лише стан довкілля та зовнішні умови існування, а також є першим представником нового класу сигнальних молекул – потужним біорегулятором в організмі людини та тварин (Schuman et al., 1993; van Griensven et al., 2003; Sharma et al., 2007). Він здійснює міжклітинну комунікацію та регуляцію важливих фізіологічних функцій, таких як вазодилатація, нейротрансмісія, зниження агрегації тромбоцитів, активація процесів запам'ятовування, регуляція тонуусу гладеньких м'язів, впливає на перекисне окиснення ліпідів під час розвитку та перебігу запальних процесів (Mungrue et al., 2002; Bentz et al., 2012). Сьогодні молекула оксиду азоту посідає місце загальноновизнанного регулятора життєвих функцій на різних рівнях – від молекулярного та клітинного до системного, а також бере участь у розвитку патологічних процесів в організмі людини та тварин (van Griensven et al., 2003; Pacher et al., 2007; Sharma et al., 2007; Shapoval et al., 2011).

Для розуміння молекулярних основ і особливостей впливу *NO* на різні органи та тканини необхідно враховувати наявність двох ізоформ *NO*-синтази: постійної – конститутивної (cNOS) та індукційної (iNOS). Активність конститутивної *NO*-синтази, що міститься в ендотеліальних, нервових клітинах, тромбоцитах і деяких інших, в умовах фізіологічного їх спокою, хоча і постійна, але низька. Однак під впливом факторів і агентів, що стимулюють надходження кальцію до клітини, її кальційзалежна активність помітно підвищується, що зумовлює короткотривалий синтез невеликих кількостей *NO*, який через цГМФ виконує в клітинах-мішенях регуляторні функції. Індукційна *NO*-синтаза виявлена в ендотеліальних клітинах (бере участь у контролі судинного тонуусу), клітинах судин гладеньких м'язів, макрофагах, поліморфоядерних лімфоцитах тощо. Вищезгадана ізоформа та оксид азоту, який із неї утворюється, відіграють важливу роль у розвитку порушення процесів перекисного окиснення ліпідів, прогресуванні патологічних процесів (Mungrue et al., 2002; Bentz et al., 2012).

Монооксид азоту може виступати в ролі нейротрансмітера, опосередковуючи ефекти так званих неадренергічних-нехолінергічних нейронів (NANC-нейронів), які, поряд із холін- і норадренергічними провідниками автономної нервової системи, можуть становити третій тип нервової системи. Цей тип нейронів називають ще нітроергічним; нейрони містяться у серці, травній системі та дихальних шляхах, де іннервують як судинну, так і позасудинну гладеньку мускулатуру (Kamata et al., 1993; Curtò et al., 1998).

З одного боку, у шлунково-кишковому тракті *NO* регулює мікроциркуляцію, секрецію та моторику, та, за фізіологічних умов, має цитопротекторну дію (Jesedov and Magomedjeminova, 2010; Kochar et al., 2011). Оксид азоту є головним інгібіторним медіатором, що забезпечує розслаблення гладенької мускулатури стравоходу, шлунка, тонкої та товстої кишок, жовчного міхура, сфінктера Одді, а також бере участь у дуоденальній секреції бікарбонатів. З іншого боку, вступаючи в реакцію з киснем, *NO* утворює пероксинітрит і бере участь у формуванні запальних процесів у шлунку, підшлунковій залозі та кишечнику. Негативний вплив оксиду азоту починає проявлятися, коли його сумарна концентрація або різко знижується, або зростає, спричинюючи функціональне та структурне пошкодження органа (Lamarque et al., 1996; Mungrue et al., 2002; Kochar et al., 2011). Поліморфізм прояву його впливу пов'язаний із присутністю у травній системі різних форм *NO*-синтаз (Price et al., 1996).

Запропонована така схема участі *NO* у регуляції моторики шлунково-кишкового тракту (Kochar et al., 2011). Стимуляція нейронів супроводжується збільшенням активності *NO*-синтази та виділенням *NO*. Проникнувши в м'язовий шар, він активує фермент гуанілатциклазу. Це викликає збільшення циклічного гуанілатмонофосфату та розслаблення м'язів. Крім того, нормальним регулятором перистальтики травного тракту є бактеріальна флора кишечника. Компоненти мембран клітин бактерій – ліпополісахариди – володіють здатністю активувати NOS безпосередньо в м'язовій клітині (Kmonickova et al., 2012).

Питання про роль *NO* в механізмах релаксації шлунка викликає особливу цікавість протягом багатьох років і поки що до кінця не з'ясоване. Термін «рецептивна релаксація», уведений на початку минулого століття, означає розслаблення шлунка в момент проходження їжі по стравоходу. Термін «адаптивна релаксація» або «акомодация» передбачає розслаблення шлунка в момент потрапляння до нього їжі. Відомо, що обидві реакції – рефлекторні, опосередковуються блукаючим нервом, проте не належать ані до холінергічних, ані до адренергічних. Саме завдяки цим дослідженням термін «нехолінергічна неадренергічна іннервація» було вперше введено в літературі (Kamata et al., 1993; Curtò et al., 1998). За 80 років досліджень цієї проблеми висунуто багато гіпотез, які частково пояснювали механізми цих феноменів, доки не настала ера *NO*.

Немало досліджень присвячено динаміці, ролі оксиду азоту у шлунково-кишковому тракті (Jesedov and Magomedjeminova, 2010; Kochar et al., 2011). Нині вивчаються моторно-евакуаторна функція органів травлення, молекулярні механізми розвитку порушень у гла-

деньких м'язях органів травлення за дисбалансу системи L-аргінін/*NO/NO* синтази як фактора розвитку цих порушень. За даними авторів (Ivashkin et al., 2011; Jesedov and Magomedjeminova, 2010), оксид азоту – активний вазодилататор, здатний забезпечити збільшення кровопостачання слизової оболонки шлунка. Під час секреції шлункового соку відбувається збільшення кровопостачання слизової оболонки за рахунок розширення її мікросудин і, ймовірно, *NO* є причиною дилатації та відповідно стимулятором шлункової секреції. За умови внутрішньошлункового уведення соляної кислоти, що, у свою чергу, посилює дифузію іонів водню через слизову оболонку, синтез *NO* збільшує кровопостачання слизової оболонки. Вважають, що цей механізм захищає слизову оболонку при посиленні зворотної дифузії іонів водню у випадку порушення, наприклад, слизового бар'єру. Забезпечення достатнього кровопостачання слизової оболонки – один із способів захисту при патології гастродуоденальної зони. Залежність показників метаболізму *NO* від активності запального процесу, перебігу, ступеня пошкодження слизової оболонки вказує на його значення у патогенезі захворювання шлунково-кишкового тракту.

У зв'язку з тим, що актуальною проблемою сучасної гастроентерології є пошук нових і модифікація старих інформативних і в той же час неінвазивних тестів для діагностики захворювань органів травлення, перспективними є дані про можливість використання *NO* як маркера для визначення характеру патології органів травлення (Zvenigorodskaja and Nilova, 2008).

Ураховуючи універсальність механізму нітроергічної системи та її відновлювальний ефект, останнім часом широко застосовують *NO*-коригувальну терапію в кардіології для лікування різних серцево-судинних захворювань. Цілком природно очікувати, що надходження готових молекул в організм повинне викликати протекторну та лікувальну дію. Однак експериментально встановлено, що надлишок *NO* у тканинах, який виникає за додаткового уведення L-аргініну у великих дозах і (або) активація індукованої NOS (iNOS) у макрофагах, може негативно впливати на організм, викликаючи розвиток атеросклерозу внаслідок порушення балансу *NO/O<sub>2</sub><sup>-</sup>* на користь кисню, утворення пероксинітриду, виникнення оксидантного стресу взагалі. Це створює необхідність контролю за рівнем *NO* в ендотеліальних клітинах для того, щоб уникнути його надмірних (патогенних) ефектів і досягти бажаного лікувального результату (Tani et al., 1990; Stepanov et al., 2012).

Коригуючи роботу серцево-судинної системи фармакологічними препаратами, які активують *NO*-залежні механізми, іноді, на жаль, отримують побічні ефекти в інших системах організму, у тому числі у травній (Elliott et al., 1998; Khattab et al., 2001; Polotnjuk et al., 2003; Stepanov et al., 2012), оскільки застосовуються ентерально, тобто безпосередньо впливають на шлунково-кишковий тракт. Упродовж багатьох десятиліть для лікування гіпертонії та серцевої недостатності використовується нітропрусид натрію. Його недолік – необхідність уведення парентерально. Окрім того, до нього швидко виникає звикання та за тривалого використання можуть спостерігатися токсичні та патологічні ефекти, які проявляються на рівні шлунково-кишкового тракту.

Незважаючи на численні нові публікації, проблема регуляції моторики стравоходу, шлунка та кишечника залишається актуальною, до кінця не вирішеною. Тому детальніше дослідження механізму впливу блокаторів і донаторів *NO* на шлунково-кишковий тракт дасть можливість повніше зрозуміти механізми системного та міжсистемного впливу *NO*.

Якщо вже загальновідомо, що за механізмом своєї дії оксид азоту є ендогенним «релаксуючим» фактором, то ще залишається не вирішеним питання щодо уявлень про роль оксиду азоту в реалізації секреторної активності шлунка. Деякі дослідники вважають, що *NO* здійснює гальмівний вплив на його секреторну функцію (Khattab et al., 2001), що може реалізовуватися як через зниження тонічної активності блукаючих нервів, так і через виділення такого гальмівного чинника як соматостатин. При цьому вважається, що один із механізмів гальмівного впливу оксиду азоту на кислу шлункову секрецію реалізується за рахунок стимулювального впливу *NO* на циклооксигенази, внаслідок чого збільшується синтез простагландинів (Polotnjuk et al., 2003). Деякі автори вважають, що нітроергічна ланка регуляції стимулює кислу шлункову секрецію (Takeuchi et al., 2000), інші підкреслюють, що роль *NO* у фізіологічній регуляції секреторної функції шлунка до кінця не відома (Elliott et al., 1998). Тому мета даної роботи – оцінити особливості періодичної секреторної та моторної активності шлунка в умовах надлишку та дефіциту *NO*.

### Матеріал і методи досліджень

Експерименти проведені на 100 білих лабораторних щурах-самцях масою 200–230 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тварин випадковим чином розділили на п'ять груп по 20 особин у кожній. Щурам контрольної групи вводили 1 мл 0,9% розчину *NaCl* (I група). Дисбаланс *NO*-ергічної системи викликали шляхом 6- та 12-добового уведення розчину натрію нітропрусиду (SNP) – донатора *NO* (Sigma-Aldrich) у дозі 1,5 мг/кг (II та III групи) та суспензії *NO*-нітро-L-аргініну (Sigma-Aldrich) у дозі 40 мг/кг (IV та V групи). Розчини готували безпосередньо перед експериментом і внутрішньочеревинно вводили дослідним тваринам в один і той же час о 9-й годині ранку. Після завершення моделювання тварин піддавали 18-годинній харчовій депривації з вільним доступом до води, щурів наркотизували розчином кетаміну гідрохлориду (110 мг/кг) та проводили забір шлункового соку за допомогою зонда (Razuvaeva et al., 2009). Забір шлункового соку проводили кожні 15 хв упродовж години. Зонд вводили на таку глибину, щоб кінець його розташовувався в нижній третині шлунка. Вміст шлунка відсмоктували протягом 5 хв за допомогою шприца, насадженого на зонд. Після натщевої секреції отримували базальну порцію шлункового соку. Для цього упродовж однієї години через кожні 15 хв відсмоктували шлунковий вміст і збирали у пронумеровані пробірки. Враховували загальний об'єм і *pH* (Razuvaeva et al., 2009).

Вміст пепсину у шлунковому соку визначали за кількістю тирозину та триптофану, які утворюються в результаті гідролізу субстрату. Шлунковий сік залежно

від  $pH$  і застосування стимулятора шлункових залоз розводили 0,02 н соляною кислотою в 10–20 або 40 разів. У піддослідні та дві контрольні пробірки вносили по 1 мл 2% розчину субстрату (субстрат готували в день визначення, шляхом розчинення у воді, а потім за допомогою 0,3 н соляною кислоти потенціометрично встановлювали  $pH = 1,8$ ) і утримували 5 хв на водяній бані за температури  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Після цього у дослідні пробірки (з інтервалом 30 с) доливали по 0,2 мл досліджуваного шлункового соку, а в контрольні – по 0,2 мл дистильованої води. Проби інкубували 10 хв за тієї самої температури. Після цього з інтервалом 30 с додавали по 5 мл 5% розчину трихлороцтової кислоти в кожен пробірку. Потім, через 5 хв, вміст пробірок фільтрували через щільний хроматографічний папір марки М або фільтри беззолні з синьою стрічкою. До пробірки з 5,0 мл розчину  $NaOH$  додавали по 2,5 мл фільтрату з дослідних і контрольних пробірок і 1,5 мл реактиву Фоліна. Інтенсивність забарвлення вимірювали через 10 хв проти води на фотоелектроколориметрі при червоному світлофільтрі з максимумом поглинання 670 нм (Razuvaeva et al., 2009).

Для визначення глікопротеїнів шлунковий сік попередньо профільтрували, розбавляли в 2–5 разів дистильованою водою. Потім 0,5 мл розведеного соку додатково розводили 5 мл дистильованої води та додавали у пробірки по 2 мл 20% сульфосаліцилової кислоти. Через 10 хв отриманий розчин фільтрували, далі 5 мл фільтрату переливали у центрифужні пробірки та змішували з 1 мл фосфоровольфрамкової кислоти. Через 15 хв залишок центрифугували (1000 об./хв упродовж 30 хв), прозорий супернатант зливали. Пробірки з осадом перекидали вгору дном і висушували на фільтрувальному папері. Осад розчиняли в 2 мл 0,1 н  $NaOH$ , додавали 1,3 мл 10%  $NaOH$ , потім 0,5 мл реактиву Фоліна та через 10 хв фотометрували (Razuvaeva et al., 2009).

Міоелектричну активність (МЕА) гладеньких м'язів шлунка відводили за допомогою біполярних платинових голкових електродів (Kovalyov et al., 2004). Електрод фіксували в антральному відділі шлунка на відстані 5–7 мм від пілоричного сфінктера. Реєстрацію здійснювали за допомогою поліграфа RM–86 Nihon Kohden. Аналізували МЕА шлунка за показниками моторного індексу (МІ), котрий розраховували як площу, обмежену проінтегрованою електрогастроіограмою. Цей показник відображає загальну картину моторної активності шлунка.

Ступінь ураження слизової оболонки ГДЗ оцінювали за допомогою методу, заснованого на кількісному обліку сорбції тканинами вітального барвника нейтрального червоного. При цьому вилучений шлунок промивали фізіологічним розчином, заповнювали 0,25% розчином барвника та інкубували у термостаті за  $+38\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 7 хв. Після цього шлунок промивали, розтинали та фіксували на парафінових підкладках і візуально оцінювали наявність ерозивно-виразкових пошкоджень його слизової оболонки.

Дослідження проводили, дотримуючись нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 р., Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальних етичних принципів експериментів на тваринах, прийнятих Першим національним конгресом України з

біоетики (2001 р.), інших міжнародних угод і національного законодавства в цій галузі (Pokrovskij, 1997).

Отриманий числовий матеріал обробляли за допомогою стандартних методів математичної статистики з визначенням середніх величин, їх стандартних помилок та інтервалів достовірності за  $t$ -критерієм Стьюдента. Відмінності, отримані методом парних порівнянь, вважали достовірними при  $P < 0,05$  (Petrin et al., 2003). Математичні розрахунки та побудову графіків здійснювали з використанням пакетів програм Microsoft Excel 2010 і OriginLab OriginPro.v8.0.

## Результати та їх обговорення

Установлено, що 6-добове уведення донатора оксиду азоту викликало зменшення об'єму шлункового соку в 1,9 раза (табл. 1), при цьому його  $pH$  підвищувалася відносно контролю, що викликало зниження темпу секреції іонів водню ушестеро. Відмічали підвищення в шлунковому соку концентрації пепсину в 1,6 раза, що свідчить про стимуляцію роботи головних клітин шлунка в умовах надлишку  $NO$  і може бути пов'язане з компенсаторним збільшенням продукції пепсину у відповідь на зниження його активності в умовах зниження кислотності соку. Концентрація захисних факторів слизової оболонки шлунка – глікопротеїнів (ГП) у шлунковому соку збільшувалася на 68% відносно контрольних значень, що, у свою чергу, збігається з літературними даними, згідно з якими з  $NO$  пов'язані механізми синтезу слизу в кишковому епітелії (Zvjagintseva and Gridneva, 2005).

В умовах 12-добового уведення натрію нітропрусиду об'єм шлункового соку зменшувався в 2,8 раза (рис. 2а), порівняно з контролем. Рівень  $pH$  шлункового соку підвищувався (табл. 1) відносно контролю та залишався на тому ж рівні, що і на 6-ту добу уведення натрію нітропрусиду. Робота головних клітин стимулювалася і рівень пепсину збільшився в 2,3 раза. Концентрація ГП продовжувала зростати, збільшившись у 2,4 раза відносно контрольних значень.

При візуальному аналізі слизової оболонки шлунка після 6-добового уведення нітропрусиду натрію не спостерігалося явних ушкоджень. У подовження терміну уведення донатора до 12 діб у деяких тварин відмічали наявність поодиноких виразкових ушкоджень, які за характером дифузного розташування збігалися з такими, які відмічали за умов моделювання стресорних ушкоджень (Razuvaeva et al., 2009).

За умов моделювання недостатності оксиду азоту на 6-ту добу уведення L-NNA спостерігали збільшення об'єму шлункового соку на 78% (табл. 2) зі збільшенням  $pH$  відносно показників інтактних тварин. Темп секреції іонів водню знизився ушестеро. Проте рівень пепсину не змінювався. Концентрація ГП підвищувалася на 21% відносно контрольних значень.

Після 12-добового уведення L-NNA відмічалось збільшення об'єму шлункового соку на 17% та збільшення  $pH$  (табл. 2), тобто темп секреції іонів гідрогену знизився на 99% за практично незмінних значень концентрації пепсину. Зменшилася концентрація глікопротеїнів (на 41% відносно контрольних рівнів). Такі факти вказують на імовірне порушення кислототвірної функції за даних

умов, а також на порушення активності пілоричного сфінктера, що стає причиною закиду дуоденального вмісту до шлунка. Про це свідчить і зростання *pH* шлункового соку та зміни МЕА шлунка. Макроспічний

аналіз морфологічного стану слизової оболонки шлунка дослідних тварин у цій серії виявив наявність гострих виразок овальної та полігональної форми (у кількості 2–4), які були розташовані переважно в тілі шлунка.

Таблиця 1

**Показники шлункової секреції у контрольних тварин (I група), після 6- (II) та 12-добового (III група) уведення натрію нітропрусиду (*n* = 10)**

Показники	I група	II група	III група
Об'єм, мл	1,11 ± 0,12	0,59 ± 0,08**	0,39 ± 0,06***
<i>pH</i>	1,16 ± 0,10	1,54 ± 0,06**	1,56 ± 0,05**
Пепсин, мг/мл	0,66 ± 0,03	1,08 ± 0,06***	1,56 ± 0,07***
ГП, мг/мл	0,034 ± 0,002	0,057 ± 0,002***	0,080 ± 0,005***
Темп секреції $H^+$ , ммоль/год	0,125 ± 0,0230	0,021 ± 0,0036**	0,014 ± 0,0026***

Примітки: \* –  $P < 0,05$ ; \*\* –  $P < 0,01$ ; \*\*\* –  $P < 0,001$ .

Таблиця 2

**Зміни показників шлункової секреції, що відбулися з умовах 6- (IV) та 12-добового (V група) уведення блокатора оксиду азоту – L-NNA порівняно з контрольною групою тварин (I група) (*n* = 10)**

Показники	I група	IV група	V група
Об'єм, мл	1,11 ± 0,12	1,97 ± 0,23**	2,05 ± 0,15***
<i>pH</i>	1,16 ± 0,10	2,14 ± 0,25**	3,47 ± 0,25***
Пепсин, мг/мл	0,66 ± 0,03	0,67 ± 0,12	0,61 ± 0,14
ГП, мг/мл	0,034 ± 0,002	0,041 ± 0,002*	0,020 ± 0,006*
Темп секреції $H^+$ , ммоль/год	0,1250 ± 0,024	0,0210 ± 0,005**	0,0008 ± 0,0001***

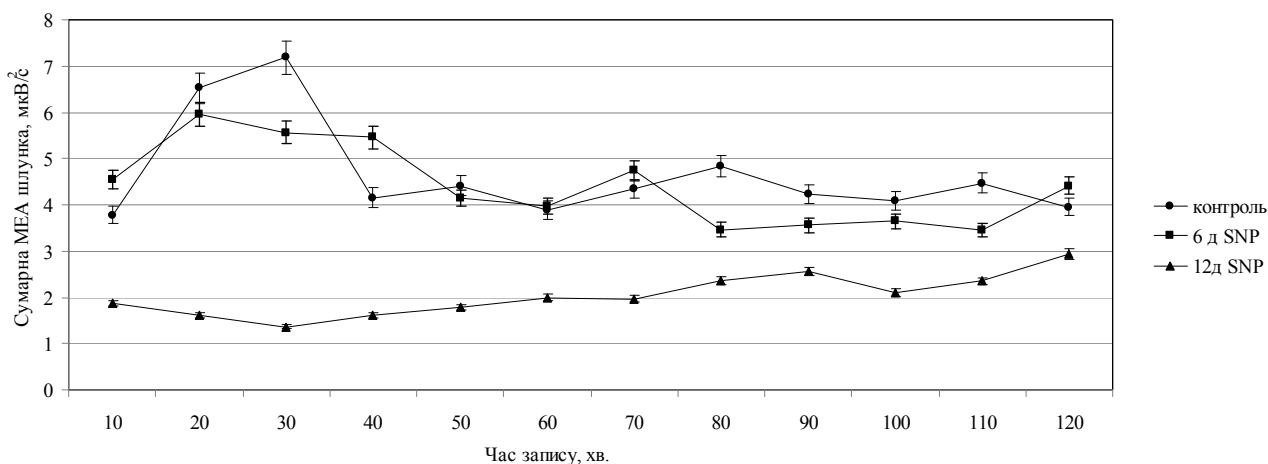
Примітки: див. табл. 1.

У другій серії досліджень реєстрували міоелектричну активність шлунка за вищезазначених умов. В інтактних тварин МЕА шлунка мала чіткий фазний характер, тривалість I фази становила 70–90 хв, II–III – 30–50 хв (рис. 1), показники моторного індексу шлунка коливалися залежно від фаз періодичної активності та становили в середньому  $4,7 \pm 1,0$  мкВ/с<sup>2</sup> (рис. 2). За 6-добової дії донатора NO тривалість фаз МЕА шлунка була подібною до контролю, але спостерігалася тенденція до зниження показників моторного індексу шлунка відносно контрольних значень.

У тварин III групи відмічали зменшення МЕА шлунка, а характер скорочень відповідав першій фазі основного електричного ритму шлунка на рисунку 3, активні фази не реєструвались. Міоелектрична активність

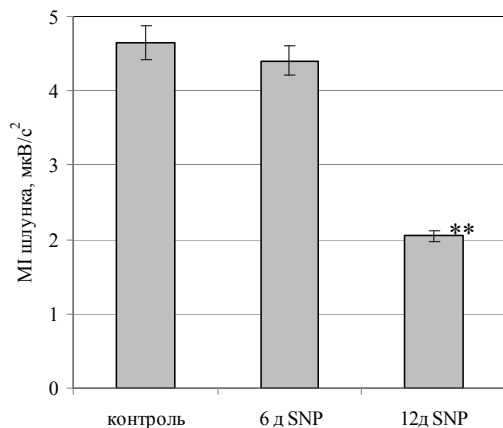
шлунка знизилась за показниками моторного індексу на 56% ( $P < 0,001$ ) порівняно з контролем (рис. 2).

Після 6-добового порушення NO-ергічної ланки регуляції періодичної активності шлунка фазна картина МЕА шлунка була подібною до переходу між II та III фазами, переважали пізня II та рання III фази, I фаза була не виявлена протягом запису, тобто на запису зареєстровано переважання активних фаз (див. рис. 3). На 6-ту добу дефіциту NO відмічалось збільшення MI в 1,5 раза ( $P < 0,05$ ), електрогастроіограма відрізнялася нестабільністю періоду ритму, збільшенням показників амплітуди та збільшенням періоду коливання порівняно з показниками інтактних тварин. Фази МЕА шлунка можливо ідентифікувати тільки на основі моторного індексу.



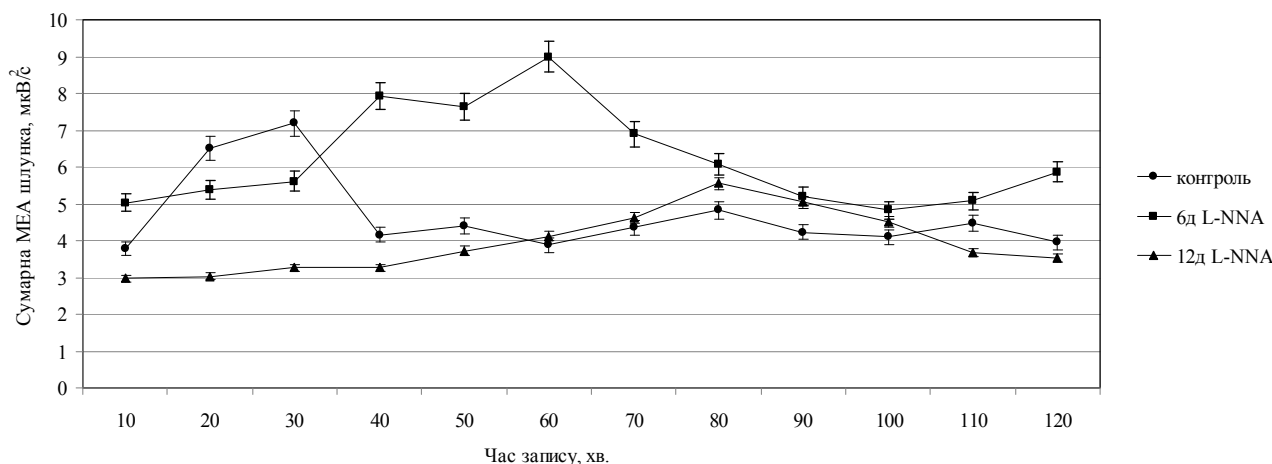
**Рис. 1. Динаміка змін сумарної МЕА шлунка в умовах 6- (II) та 12-добового (III група) уведення натрію нітропрусиду (SNP) порівняно з контрольною групою тварин (I група) (*n* = 10)**

За дефіциту монооксиду азоту відбувалося нав'язування шлункові ритму дванадцятипалої кишки, що супроводжувалося дуоденогастральним рефлюксом. В умовах 12-добового блокування *NO*-синтази на фоні зменшення загальної МЕА шлунка встановлено зниження МІ шлунка на 28% ( $P < 0,001$ ), спостерігалось зникнення I фази активності (рис. 4). Тобто зареєстровано відсутність фази спокою на тлі зниженої сумарної МЕА, що свідчить про виснаження адаптаційно-компенсаторних механізмів періодичної активності шлунка.



**Рис. 2.** Показники МІ шлунка після 6- (II) та 12-добового (III група) уведення натрію нітропрусиду (SNP) порівняно з контрольною групою тварин (I група) ( $n = 10$ ): \*\* –  $P < 0,01$

Отримані дані стосовно підвищення секреторної активності слизової оболонки шлунка в умовах надлишку оксиду азоту збігаються з даними (Polenov, 1998), де автор у дослідях на ізольованих головних клітинах



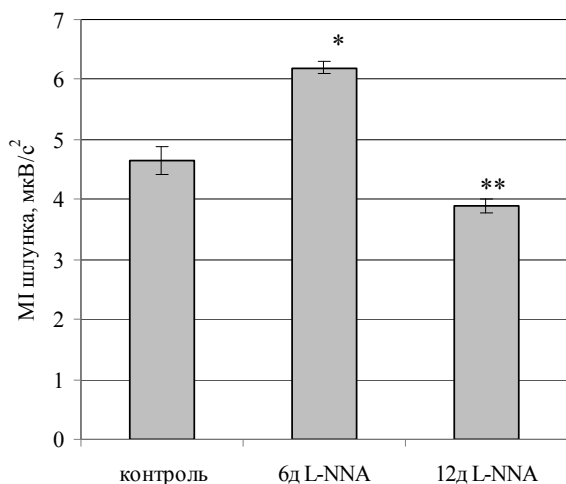
**Рис. 3.** Динаміка змін сумарної МЕА шлунка після 6- (IV) та 12-добового (V група) уведення блокатора оксиду азоту L-NNA порівняно з контрольною групою тварин (I група) ( $n = 10$ )

Роль оксиду азоту в регуляції періодичної моторної активності шлунка пов'язана як із прямою дією на гладенько-м'язові клітини, так і з присутністю NOS у нейронах, які іннервують шлунково-кишковий тракт (Cavicchi and Whittle, 1999). Стимуляція нейронів супроводжується підвищенням синтезу оксиду азоту, який, проникаючи в м'язові шари активує синтез цГМФ, що спричинює зниження рівня іонів кальцію в цитозолі клітин і послаблення зв'язку між міозином та актином. Це

шлунка свині відмічав підвищення секреції пепсину у відповідь на уведення лейкотриєнів  $B_4$ ,  $C_4$ ,  $D_4$  та  $E_4$  і зниження на 50–60% при уведенні L-NMMA. Виходячи з отриманих даних, С.А. Поленов пояснив, що стимулювальний ефект лейкотриєнів частково опосередкований релізінгом *NO*, а епідермальний фактор росту підвищує секрецію пепсиногену частково за рахунок генерації *NO*. Отримані дані можуть свідчити як про розвиток адаптаційно-компенсаторних реакцій, так і про порушення механізмів регуляції в умовах екзогенного уведення *NO*. До того ж, один із механізмів гальмівного впливу оксиду азоту на кислу шлункову секрецію реалізується за рахунок стимулювального впливу *NO* на циклооксигенази, у результаті чого збільшується синтез простагландинів. Останні, як відомо, гальмують стимульовану секрецію соляної кислоти (Polotnjuk et al., 2003).

Існує тісний взаємозв'язок впливу *NO* та простагландинів на кровопостачання слизової оболонки шлунка, секрецію слизу та посилення захисту від ерозивно-виразкових ушкоджень. Проте зв'язок між простагландинами та оксидом азоту в регуляції кислої шлункової секреції залишається не до кінця з'ясованим (Polotnjuk et al., 2003). Не можна виключати важливу роль *NO* й у регуляції шлункового кровотоку. Досліди з холецистокініном і прямою електричною стимуляцією блукаючого нерва показали, що *NO* опосередковує вагусну дилатацію судин шлунка (Elliott et al., 1998). За умов внутрішньошлункового уведення соляної кислоти синтез *NO* збільшує кровопостачання слизової оболонки. Цей механізм захищає слизову оболонку при посиленні зворотної дифузії  $H^+$  у випадку порушення слизового бар'єру (Takeuchi et al., 2000).

викликає релаксацію клітин (Mauev et al., 2008). Важливо підкреслити, що через *NO* як вторинного посередника забезпечуються вазодилаторні ефекти блукаючого нерва та ефекти багатьох інших вазоактивних речовин (Elliott et al., 1998). Характер порушень у функціонуванні шлунка у піддослідних тварин за умов дефіциту оксиду азоту має певну подібність до уражень, викликаних моделюванням дуоденогастрального рефлюксу шляхом перорального уведення жовчі (Rudenko, 2007).



**Рис. 4. Показники МІ шлунка за 6- (IV) та 12-добового (V група) уведення блокатора оксиду азоту L-NNA порівняно з контрольною групою тварин (I група) ( $n = 10$ ): \* –  $P < 0,05$ ; \*\* –  $P < 0,01$**

Все ще залишається необхідність дослідження шлункового соку на вміст жовчних кислот, що, беззаперечно, підтвердило б наявність факту закиду вмісту дванадцятипалої кишки до шлунка.

### Висновки

Результатом тривалого уведення донатора *NO* є зміни як моторної, так і секреторної активності шлунка. Зміни моторної активності шлунка проявлялись у тенденції до зменшення показників МІ на 6-ту добу. На 12-ту добу спостерігали зміни характеру скорочень, вони в усіх фазах МЕА шлунка ставали подібними до першої фази основного електричного ритму, також спостерігалось зменшення МІ на 56%. Зміни секреторної функції шлунка проявлялися у достовірному зменшенні об'єму шлункового соку в 1,9 та 2,8 рази, підвищенні *pH*, підвищенні рівня пепсину в 1,6 та 2,3 рази, зниженні рівня ГП на 68% та у 2,4 рази на 6- та 12-ту добу відповідно. За цих змін спостерігали розбалансування механізмів регуляції секреторної активності шлунка, а ефект натрію нітропрусиду на головні та поверхневі епітеліальні клітини слизової оболонки шлунка був вираженішим за тривалішої дії чинника.

Тривалий дефіцит *NO* викликає дисбаланс періодичної активності шлунка, порушення міоелектричної активності в напрямку декомпенсаторних проявів. При уведенні блокатора *NO* картина міоелектричної активності стала подібною до переходу між II та III фазами МЕА. Відмічали збільшення МІ в 1,3 рази на 6-ту добу уведення блокатора. На 12-ту добу відмічали зміни характеру скорочень у всіх фазах МЕА шлунка та зниження МІ на 28%. Зміни секреторної функції шлунка проявлялися у достовірному збільшенні об'єму шлункового соку на 78 і 85%; значному зростанні його *pH*. У даному випадку ми констатували порушення кислототвірної функції шлунка та порушення активності пілоричного сфінктера, що стає причиною закиду дуоденального вмісту до шлунка. Зазначимо, що дане питання потребує подальшого вивчення.

### Бібліографічні посилання

- Bentz, M., Zaouter, C., Shi, Q., Fahmi, H., Moldovan, F., Fernandes, J.C., Benderdour, M., 2012. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents lipid peroxidation in osteoarthritic chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* 113(7), 2256–2267.
- Cavicchi, M., Whittle, B.J., 1999. Potentiation of cytokine induced iNOS expression in the human intestinal epithelial cell line, DLD-1, by cyclic AMP. *Gut* 45(3), 367–374.
- Currò, D., Preziosi, P. 1998. Non-adrenergic non-cholinergic relaxation of the rat stomach. *Gen. Pharmacol.* 31(5), 697–703.
- Elliott, S.N., Wallace, J.L., 1998. Nitric oxide: A regulator of mucosal defense and injury. *J. Gastroenterol.* 33(6), 792–803.
- Ivashkin, V.T., Drapkina, O.M., 2011. Klinicheskoe znachenie oksida azota i belkov teplovogo shoka [The clinical significance of nitric oxide and heat shock proteins]. Moscow (in Russian).
- Jesedov, J.M., Magomedjeminova, A.S., 2010. Soderzhanie oksida azota v zheludochnom soke v zavisimosti ot kislотноsti zheludochnoj sekrecii u bol'nyh s zabolovanijami verhnego otdela pishhevaritel'nogo trakta [Gastric juice levels of nitric oxide in relation to gastric acidity in patients with upper digestive tract diseases]. *Klinicheskaja Laboratornaja Diagnostika* 7, 48–50 (in Russian).
- Kamata, K., Kohzuki, M., Misawa, M., Kasuya, Y., 1993. Involvement of nitric oxide pathway in non-adrenergic non-cholinergic (NANC) relaxation in the rat stomach: Differential innervation of nanc nerves in the longitudinal and circular muscle of the fundus. *Gen. Pharmacol.* 24(6), 1403–1410.
- Khattab, M.M., Gad, M.Z., Abdallah, D., 2001. Protective role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric acid secretion. *Pharmacol. Res.* 43(5), 463–467.
- Kmonickova, E., Kverka, M., Tlaskalová-Hogenová, H., Kostecka, P., Zidek, Z., 2012. Stimulation of nitric oxide, cytokine and prostaglandin production by low-molecular weight fractions of probiotic *Lactobacillus casei* lysate. *Neuro Endocrinol. Lett.* 33(3), 166–172.
- Kochar, N.I., Chandewal, A.V., Bakal, R.L., Kochar, P.N., 2011. Nitric oxide and the gastrointestinal tract. *Int. J. Pharm.* 7(1), 31–39.
- Kovalyov, I.V., Baskakov, M.B., Kapilevich, L.V., Medvedev, M.A., 2004. Rol' oksida azota v reguljacii jelektricheskoi i sokratitel'noj aktivnosti gladkih myshc [Role of nitric oxide in the regulation of electrical and contractive activity of unstriated muscles]. *Bull. Sib. Med.* 1(1), 7–26 (in Russian).
- Lamarque, D., Whittle, B.J., 1996. Involvement of peroxynitrite in the lipid peroxidation induced by nitric oxide in rat gastric mucosa. *Eur. J. Pharmacol.* 313(1), 5–7.
- Mayev, I.V., Trukhmanov, A.S., Cheremushkina, N.V., 2008. Nitric oxide and its role in pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. *The Russian Medical Vesti* 8(2), 3–9.
- Mungrue, I.N., Gros, R., You, X., Pirani, A., Azad, A., Csont, T., Schulz, R., Butany, J., Stewart, D.J., Husain, M., 2002. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J. Clin. Invest.* 109(6), 735–743.
- Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L., 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 87(1), 315–424.
- Petrin, A., Sjebin, K., 2003. Nagljadnaja statistika v medicine [Visual statistics in medicine]. Geotar-Med, Moscow (in Russian).
- Pokrovskij, V.I., 1997. Biomedicinskaja jetika [Biomedical ethics]. Medicina, Moscow (in Russian).
- Polenov, S.A., 1998. Okis' azota v reguljacii funkcij zheludochno-kishechnogo trakta [Nitric oxide in the regulation of the gas-

- trointestinal tract]. *Rossijskij Zhurnal Gastrojenterologii, Gepatologii, Koloproktologii* 1, 53–60 (in Russian).
- Polotnjuk, S.Y., Shtanova, L.Y., Shtanova, T.V., Beregova, T.V., 2003. Doslidzhennja roli prostaglandiniv u reguljacii oksidom azotu kisloto-sekretornoji funkciji shlunka u shhuriv [Investigation of the role of prostaglandins in the regulation of nitric oxide acid-secretory function of the stomach in rats]. *Ukrains'ki Medichni Visti* 5(1), 97 (in Ukrainian).
- Price, K.J., Hanson, P.J., Whittle, B.J., 1996. Localization of constitutive isoforms of nitric oxide synthase in the gastric glandular mucosa of the rat. *Cell Tissue Res.* 285(1), 157–163.
- Razuvaeva, O.V., Murzin, O.B., Rudenko, A.I., 2009. Dijal'nist' sekretornyh zaloz shlunka ta nitrergichni mehanizmy i'i reguljacii' za umov modeljuvannja adrenalinovoi' vyrazky [Activity of stomach secretory glands and the nitrergic mechanisms of their regulation under the condition of the adrenalin ulcer simulation]. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol.* 17(1), 193–198 (in Ukrainian).
- Rudenko, A.I., 2007. Motorna dijal'nist' gastroduodenal'noi' zony pry duodenogastral'nomu refljuxi u shhuriv [Motor activity in gastroduodenal duodenogastric reflux in rats]. *Gastroenterologija* 38, 119–127 (in Ukrainian).
- Schuman, E.M., Madison, D.V., 1993. Nitric oxide as an intercellular signal in long-term potentiation. *Semin. Neurosci.* 5(3), 207–215.
- Shapoval, L.N., Pobegailo, L.S., Stepanenko, L.G., Dmytrenko, O.V., Bouryi, V.A., Sagach, V.F., 2011. Impact of swimming exercise training on the effects of modulation of mitochondrial permeability transition and NOS-1 activation in medullary cardiovascular neurons of rats. *Neurophysiology* 43(4), 299–308.
- Sharma, J.N., Al-Omran, A., Parvathy, S.S., 2007. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 15(6), 252–259.
- Stepanov, Y.M., Tverdokhle, I.V., Sirenko, O.Y., 2012. L-arginin: Svojstva, primenenie v medicine, toksichnost' i arginin-inducirovannoe porazhenie podzheludochnoj zhelezy [L-arginine: Properties, application in medicine, toxicity, and arginine-induced acute pancreatitis]. *Suchasna Gastroenterologija* 65(3), 63–70 (in Ukrainian).
- Takeuchi, K., Araki, H., Kawauchi, S., Kunikata, T., Mizoguchi, H., Tashima, K., 2000. Regulatory mechanism of acid secretion in the damaged stomach: Role of endogenous nitric oxide. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 37–45.
- Tani, S., Itoh, H., Okabayashi, Y., Nakamura, T., Fujii, M., Fujisawa, T., Koide, M., Otsuki, M., 1990. New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats. *Dig. Dis. Sci.* 35(3), 367–374.
- van Griensven, M., Zeichen, J., Skutek, M., Barkhausen, T., Krettek, C., Bosch, U., 2003. Cyclic mechanical strain induces NO production in human patellar tendon fibroblasts – a possible role for remodelling and pathological transformation. *Exp. Toxicol. Pathol.* 54(4), 335–338.
- Zvenigorodskaja, L.A., Nilova, T.V., 2008. Oksid azota kak marker vospalenija pri steatogepatite u bol'nyh s metabolicheskim sindromom [Nitric oxide as a marker of inflammation in steatohepatitis in patients with metabolic syndrome]. *Bolezni Organov Pishhevarenija* 10(2), 47–49 (in Russian).
- Zvjagintseva, T.D., Gridneva, S.V., 2005. Vascular endothelium in norm and at gastrointestinal diseases. *Contemporary Gastroenterology* 22(2), 51–55.

*Надійшла до редколегії 14.04.2014*