УДК 616.341–089–085.468.6+612.015.3

Діхтенко Т.Г., Костенко В.О.

МЕХАНІЗМИ ВПЛИВУ L-АРГІНІНУ, ІММОБІЛІЗОВАНОГО НА ХІРУРГІЧНОМУ ШОВНОМУ МАТЕРІАЛІ, НА ІНТЕГРАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ ДЕЗОРГАНІЗАЦІЇ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ ОПЕРОВАНОЇ ТОНКОЇ КИШКИ ЩУРІВ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

В експерименті на 40 білих щурах лінії Вістар масою 180-220 г досліджено вплив L-аргініну за умов системного та місцевого введення (у складі синтетичного шовного матеріалу, що розсмоктується) на інтегральні показники дезорганізації сполучної тканини оперованої тонкої кишки. Показано, що введення L-аргініну у складі полігліколідної нитки обмежує в паравульнарних тканинах тонкої кишки на 3 добу післяопераційного періоду дезорганізацію сполучної тканини (колагеноліз та деполімерізацію протеогліканів). З'ясована роль NO-синтаз (NOS) та аргінази у механізмах дії L-аргініну, введеного у складі шовного матеріалу (обмеження колагенолізу пов'язано з функціональною активністю нейрональної NOS та аргінази, пригнічення деполімерізації протеогліканів - нейрональної NOS, індуцибельної NOS та аргінази).

Ключові слова: L-аргінін, шовний матеріал, полігліколід, сполучна тканина, колаген, протеоглікани, паравульнарні тканини, тонка кишка, хірургічна травма.

Сполучна тканина відіграє важливу роль у підтримці гомеостазу організму, оскільки обмін між кров'ю та клітинами є, перш за все, обміном між кров'ю й основною речовиною [3]. Протеоглікани сполучної тканини – глікопротеїни зі значним ступенем глікозилювання, вуглеводними залишками яких є довгі нерозгалужені полісахаридні ланцюги – глікозаміноглікани (ГАГ). Вони за рахунок високої гідрофільності забезпечують транспорт води, солей, амінокислот та інших сполук із судин у позаклітинний простір та у зворотному напрямку. Ці сполуки значною мірою впливають на пружність та тургор тканин, а при підвищенні катаболізму сприяють утворенню набряку. Від опорної функції сполучної тканини тонкої кишки залежить збереження її бар'єрних властивостей, що попереджує ризик транслокації мікроорганізмів і продуктів їх розпаду за межі кишки.

Відомо, що гострий стрес стимулює деградацію біополімерів сполучної тканини, про що свідчить підвищення в крові рівня оксипроліну та окремих мономерів неколагенових білків [3,5,7,10]. Показано, що L-аргінін у щурів зі стресорними пошкодженнями шлунка та пептичною виразкою чинить протективний ефект на слизову оболонку, зменшуючи ступінь катаболізму захисних білків шлункового слизу, інгібуючи підвищену активацію пероксидного окиснення ліпідів, нормалізуючи протеїназно-інгібіторний потенціал та гемоциркуляцію, що визначає послаблення або усунення деструктивних змін [5,7,10]. За умов експериментальної гострої тонкокишкової непрохідності системне введення L-аргініну покращує стан кишкового бар'єра [2].

Проте ефективність застосування L-аргініну на стан сполучної тканини тонкої кишки після хірургічної травми раніше не досліджувалася. Певні перспективи щодо місцевого застосування цієї сполуки як засобу регуляції метаболізму та репаративних процесів у паравульнарних тканинах відкриваються у зв'язку зі створенням експериментальних зразків біологічно активного синтетичного шовного матеріалу на основі полігліколевої кислоти з введенням L-аргініну у склад полімеру (НВО "Біополімер, м. Полтава). Проте дія іммобілізованого таким чином L-аргініну на метаболізм сполучної тканини оперованих внутрішніх органів раніше не вивчалася.

Метою роботи є оцінка впливу L-аргініну за умов системного та місцевого введення (у складі синтетичного шовного матеріалу, що розсмоктується) на інтегральні показники дезорганізації сполучної тканини оперованої тонкої кишки щурів та з'ясування ролі NO-синтаз та аргінази у механізмах його дії.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження були проведені на 40 білих щурах лінії Вістар масою 180-220 г. У першій серії необхідні показники вивчали у інтактних тварини (контрольна); у другій виконували несправжню операція (наркоз, розріз шкіри без лапаротомії); у третій - виконували ентеротомію з ушиванням рани полігліколідною ниткою; у четвертій – після виконання ентеротомії з ушиванням рани полігліколідною ниткою щурам внутрішньоочеревинно вводили L-аргінін (щоденно протягом 3 діб післяопераційного періоду у дозі 100 мг/кг); у п'ятій - виконували ентеротомію з ушиванням рани полігліколідною ниткою, модифікованою L-аргініном (у концентрації 4,5 мг на 1 м нитки), у шостій, сьомій і восьмій - з ушиванням полігліколідною ниткою, модифікованою L-аргініном, після чого щоденно протягом 3 діб внутрішньоочеревинно вводили відповідно селективний інгібітор нейрональної NO-синтази (nNOS) – 7-нітроіндазол (7-NI) у дозі 30 мг/кг, селективний інгібітор індуцибельної NO-синтази (iNOS) – аміногуанідин у дозі 20 мг/кг та неселективний інгібітор аргіназ – L-норвалін у дозі 10 мг/кг.

Для дослідження використовували субстанцію L-аргініну виробництва "Kyowa Hakko Kogyo Co LTD" (Японія), у якості шовного матеріалу – полігліколеву кислоту (мефіл, виробництва НВО "Біополімер", м. Полтава). Виробництво експериментальної серії полігліколіду, модифікованого L-аргініном, проведено на базі НВО "Біополімер". Оперативне втручання на тваринах проводили під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг маси тіла).

Стан сполучнотканинних структур тонкої кишки оцінювали на підставі визначення вмісту вільного оксипроліну [4] та ГАГ [6]. Отримані дані обробляли варіаційно-статистичним методом з використанням критерію Ст'юдента.

Результати та їх обговорення

Вміст вільного оксипроліну та ГАГ у тканинах тонкої кишки інтактних щурів складає відповідно 4.78±0.08 мкмоль/г та 1.67±0.04 мкмоль/г. При виконанні несправжньої операції (контрольна серія) концентрація цих сполук достовірно не змінюється (табл. 1).

На 3 добу після ентеротомії у паравульнарних тканинах відмічається достовірне збільшення вмісту вільного оксипроліну та ГАГ - відповідно на 10.8% та 18.0% у порівнянні з даними серії з виконанням "несправжньої" операції, що вказує на підвищений катаболізм колагену та протеогліканів сполучної тканини тонкої кишки.

Таблиця 1

Вплив L-аргініну на інтегральні показники дезорганізації сполучної тканини оперованої тонкої кишки щурів (M+m, n=20)

Показники	Несправжня операція (контроль)	Модель ентеротомії		
		Контроль	+ L-аргінін (системно)	+ L-аргінін (у складі РШМ)
Вміст вільного оксипроліну, мкмоль/г	4.91±0.05	5.44±0.06 *	5.42±0.07*	4.83±0.05 **
Вміст ГАГ, мкмоль/г	1.61±0.03	1.90±0.03 *	1.96±0.07 *	1.57±0.02 **

*Примітка: * – p<0,05 у порівнянні з даними другої серії ("несправжня операція"); ** – p<0,05 у порівнянні з даними третьої серії*

Відомо, що у вільному вигляді знаходиться лише 1% оксипроліну, тому зростання його рівня в тканинах чи рідинах організму свідчить про активацію колагенолізису [1].

Системне введення L-аргініну у дозі 100 мг/кг достовірно не позначається на величинах концентрації вільного оксипроліну та ГАГ у тканинах тонкої кишки.

У той же час, введення L-аргініну у складі полігліколідної нитки достовірно знижує вміст вільного оксипроліну та ГАГ, які відповідно на 11.2% та 17.4% поступаються даним третьої серії.

Для з'ясування механізмів дії L-аргініну (чи це є ефекти, опосередковані певними NO-синтазами, аргіназа-залежними процесами чи їхньою комплексною дією) ми поряд з відтворенням моделі абдомінальної хірургічної травми (виконання ентеротомії) та застосування для зшивання тканин тонкої кишки полігліколіду, модифікованого L-аргініном, щоденно протягом 3 діб післяопераційного періоду тваринам внутрішньоочеревинно вводили селективний інгібітор nNOS 7-NI у дозі 30 мг/кг, селективний інгібітор iNOS аміногуанідин у дозі 20 мг/кг та неселективний інгібітор аргіназ L-норвалін у дозі 10 мг/кг.

Відомо, що метаболізм L-аргініну можливий як через окисний (NO-синтазний) шлях з утворенням L-цитруліну та NO, так і неокисний (аргіназний) - з утворенням L-орнітину та сечовини. Можливий одночасний перебіг цих двох процесів [9,11]. L-аргінін, що метаболізує у аргіназному шляху, є попередником низки фізіологічно активних сполук (поліамінів, креатину, глутамату, глутаміну, глутатіону, γ-аміномасляної кислоти).

Поліаміни розглядаються як універсальні внутрішньоядерні посередники впливу соматомедінів, а через них – і самототропний гормон, на процеси проліферації. Вони входять до складу хроматину та беруть участь у реплікації ДНК. Доведено, що концентрація поліамінів значно збільшується у період активної мітотичної активності клітин [8].

Введення селективного інгібітору nNOS 7-NI за умов застосування для зшивання тканин тонкої кишки полігліколіду, модифікованого L-аргініном, достовірно підвищує вміст вільного оксипроліну та ГАГ, що відповідно на 19.3% та 19.1% перевищує результати п'ятої серії (табл. 2).

Таблиця 2

Роль NOS- та аргіназного шляхів у механізмах дії L-аргініну, введеного у складі хірургічної нитки, на інтегральні показники дезорганізації сполучної тканини оперованої тонкої кишки щурів (M+m, n=25)

Показники	Модель ентеротомії				
	Контроль	+ введення L-аргініну (у складі РШМ)			
		Без додавання інгібіторів NOS і аргінази	+ 7-NI	+ аміно-гуанідин	+ L-норвалін
Вміст вільного оксипроліну, мкмоль/г	5.44±0.06	4.83±0.05 *	5.76±0.08 */**	4.82±0.07 *	5.31±0.12 **
Вміст ГАГ, мкмоль/г	1.90±0.03	1.57±0.02 *	1.87±0.04 **	1.72±0.04 */**	1.83±0.07 **

*Примітка: * – p<0,05 у порівнянні з даними третьої серії (контроль); ** – p<0,05 у порівнянні з даними п'ятої серії.*

Тобто здатність L-аргініну, введеного у складі шовного матеріалу, обмежувати процес дезорганізації сполучної тканини оперованої тонкої кишки щурів усувається при пригніченні nNOS. Це вказує на участь NO, який утворюється цим конститутивним ферментом, у регуляції (обмеженні) колагенолітичної функції та катаболізму протеогліканів за умов надходження L-аргініну, що вивільняється з модифікованого полігліколіду.

При впливі селективного інгібітору iNOS аміногуанідину за умов введення L-аргініну у складі полігліколідної нитки зберігається зменшений вміст вільного оксипроліну у паравульнарних тканинах тонкої кишки. Це ставить під сумнів роль iNOS у реалізації ефектів L-аргініну за цих умов.

Проте при цьому достовірно збільшується концентрація ГАГ, яка на 9.6% перевищує результат п'ятої серії Тобто за умов надходження L-аргініну, що вивільняється з модифікованого полігліколіду, NO, який утворюється iNOS, у певній мірі здатний пригнічувати катаболізм протеогліканів.

Введення інгібітору аргіназ L-норваліну за умов застосування для зшивання тканин тонкої кишки полігліколіду, модифікованого L-аргініном, достовірно підвищує вміст вільного оксипроліну та ГАГ, що перевищують відповідно на 9.9% та 16.6% дані п'ятої серії.

Отримані нами дані свідчать, що здатність L-аргініну, введеного у складі РШМ, обмежувати процес дезорганізації сполучної тканини оперованої тонкої кишки щурів усувається при пригніченні аргінази. Це вказує на участь метаболітів аргіназного шляху в обмеженні катаболізму колагену та протеогліканів сполучної тканини оперованої тонкої кишки за умов локального надходження екзогенного L-аргініну.

Висновки

1. Введення L-аргініну у складі полігліколіду обмежує в паравульнарних тканинах тонкої кишки на 3 добу після ентеротомії дезорганізацію сполучної тканини (колагеноліз та деполімерізацію протеогліканів), на що вказує зниження вмісту вільного оксипроліну та глікозаміногліканів.

2. Здатність L-аргініну, введеного у складі шовного матеріалу, обмежувати колагеноліз у паравульнарних тканинах тонкої кишки після ентеротомії пов'язана з функціональною активністю nNOS та аргінази.

3. Здатність L-аргініну, введеного у складі шовного матеріалу, обмежувати деполімерізацію протеогліканів у паравульнарних тканинах тонкої кишки після ентеротомії пов'язана з функціональною активністю nNOS, iNOS та аргінази.

Література

1. Аскерова Т.А. Диагностическая значимость определения свободного оксипролина при наследственных и приобретенных коллагенозах / Т.А. Аскерова, Н.А. Юсифова, Г.Т. Гасанова [и др.] // Клин. лаб. диагн. – 2009. - № 9. – С. 15-17.
2. Левков А.А. NO-залежні зміни метаболізму біополімерів сполучної тканини в тканинах тонкої кишки за умов гострої тонкокишкової непрохідності / А.А. Левков, В.О. Костенко // Загал. патол. та патол. фізіол. – 2010. – Т.5, № 3. – С.65-70.
3. Тарасенко Л.М. Ушкодження сполучнотканинних структур як провідний патогенетичний механізм стрес-синдрому / Л.М. Тарасенко, І.М. Скрипник, К.С. Непорада [та ін.] // Мед. хім. - 2001. - Т.3, №2. - С. 26-30.
4. Тетянец С.С. Метод определения свободного оксипролина в сыворотке крови / С.С. Тетянец //Лабор. дело. – 1985. - №1. – С. 61-62.
5. Скрипник І.М. Вплив L-аргініну на стан метаболічних процесів та морфофункціональні зміни гастродуоденальної зони у щурів за пептичної виразки / І.М. Скрипник // Актуал. пробл. сучасн. мед.: Вісн. Укр. мед. стоматол. академії. – 2003. – Т.3, №1. – С. 58-60.
6. Шараев П.Н. Метод определения гликозаминогликанов в биологических жидкостях / П.Н. Шараев // Лаб. дело. – 1987. – № 5. – С. 530-532.
7. Kwiecien S. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions / S. Kwiecien, T. Brzozowski, P.C. Konturek, S.J. Konturek // J. Phys. Pharm. – 2002. – V.53, №4. – P. 761-773.
8. Moinard C. Polyamines: metabolism and implications in human diseases / C. Moinard, L. Cynober, J.P. de Bandt // Clin. Nutr. – 2005. – V. 24, №2. – P. 184-197.
9. Morris S.M. Jr. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge / S.M. Jr. Morris // J. Nutr. – 2007. – V. 137, №6. – Suppl 2. – P. 1602S-1609S.
10. Ohta Y. L-arginine protects against stress-induced gastric mucosal lesions by preserving gastric mucus / Y. Ohta, K. Nishida // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2002. – V.29, №1-2. – P.32-38.
11. Wu G. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease / G. Wu, F.W. Bazer, T.A. Davis [et al.] // Amino Acids. – 2009. – V. 37, №1. – P. 153-168.

Реферат

МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ L-АРГИНИНА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА ХИРУРГИЧЕСКОМ ШОВНОМ МАТЕРИАЛЕ, НА ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДЕЗОРГАНИЗАЦИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ОПЕРИРОВАННОЙ ТОНКОЙ КИШКИ КРЫС

Дихтенко Т.Г., Костенко В.А.

Ключевые слова: L-аргинин, шовный материал, полигликолид, соединительная ткань, коллаген, протеогликаны, паравульнарные ткани, тонкая кишка, хирургическая травма.

В эксперименте на 40 белых крысах линии Вистар массой 180-220 г исследовано влияние L-аргинина в условиях системного и местного введения (в составе синтетического рассасывающегося шовного материала) на интегральные показатели дезорганизации соединительной ткани оперированной тонкой кишки. Показано, что введение L-аргинина в составе полигликолидной нити ограничивает в паравульнарных тканях на 3 сутки послеоперационного периода дезорганизацию соединительной ткани (коллагенолиз и деполимеризацию протеогликанов). Выяснена роль NO-синтазы (NOS) и аргиназы в механизмах действия L-аргинина, введенного в составе шовного материала (ограничение коллагенолиза связано с функциональной активностью нейрональной NOS и аргиназы, угнетение деполимеризации протеогликанов - нейрональной NOS, индуцибельной NOS и аргиназы) .

Summary

MECHANISMS OF INFLUENCE PRODUCED BY L-ARGININE IMMOBILIZED ON SURGICAL SUTURE MATERIAL ON CONNECTIVE TISSUE DISORGANIZATION INTEGRAL INDICES IN RATS' SMALL INTESTINE SUBJECTED TO SURGERY

Dihtenko T.G., Kostenko V.A.

Key words: L-arginine, suture material, polyglycolide, connective tissue, collagen, proteoglycans, paravulnare tissue, small intestine, surgical trauma.

The experiment was aimed to study the effect produced by systemically (immobilized on suture absorbable suture material) and topically administered L-arginine on connective tissue disorganization integral indices in rats' small intestine subjected to surgery. The experiment was carried out on 40 white Wistar rats weighing 180-220 g. It has been shown the administration of L-arginine incorporated into the polyglycolic surgical thread cuts down disorganization of connective tissue (collagenolysis, proteoglycan depolymerization) in intestinal paravulnare tissues on the 3th day of postoperative period. The role of NO-synthase (NOS) and arginase in the mechanisms of L-arginine action administered with suture material (collagenolysis limitation associated with the functional activity of neuronal NOS and arginase, inhibition of proteoglycan depolymerization - neuronal NOS, inducible NOS and arginase) has been determined.