

# УРОВЕНЬ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА В ПЛАЗМЕ КРОВИ И В ЖЕЛУДОЧНОМ СОКЕ И ЕГО РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ ГАСТРОЭЗОФАГЕАЛЬНОЙ РЕФЛЮКСНОЙ БОЛЕЗНИ

## LEVEL OF THE NITRIC OXIDE IN THE BLOOD PLASMA AND IN THE GASTRIC JUICE AND ITS ROLE IN THE PATHOGENESIS OF GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE

Алина Скурту

Кафедра пропедевтики внутренних болезней,  
КГМУ им. Николая Тестемицану.

### Rezumat.

Boala de reflux gastroesofagian (BRGE) este considerată o maladie, cauzată de revarsarea retrogradă a conținutului gastric în esofag. BRGE cauzează un spectru larg de manifestări clinice, începând de la regurgitație, pirozis și dureri epigastrale, fără leziuni endoscopice vizibile, până la esofagite erozive severe, complicate cu ulcer esofagian, stricturi, metaplazie și displazie a epitelului esofagian. În dereglarea mecanismului antireflux veriga-cheie aparține scăderii presiunii bazale a SEI și perturbării motilității esogastrice. NO joacă un rol important în procesele fiziologice și patologice la nivelul tractului digestiv, și este o moleculă importantă de semnalizare care acționează în aproape toate țesuturile pentru a regla o gamă largă fiziologică. Cantitatea excesivă de oxid nitric se poate conjuga cu oxigenul, formând peroxinitrit, astfel provocând procese inflamatorii în stomac, pancreas, intestin. Rolul oxidului nitric în afecțiunile acidodependente este bazat pe determinarea metaboliților lui în serul sanguin și în sucul gastric. Noi am studiat nivelul metaboliților oxidului nitric în serul sanguin și sucul gastric la pacienții cu boala de reflux gastroesofagian în dependența de gradul de severitatea maladiei.

**Cuvinte-cheie:** boala de reflux gastroesofagian (BRGE), oxidul nitric (NO), sintazele oxidului nitric (NOS), serul sanguin, sucul gastric.

### Summary

Gastroesophageal reflux disease (GERD) is considered to be a disease caused by the retrograde flow of gastric content into the esophagus. GERD causes a wide spectrum of clinical manifestations, from regurgitation, heartburn and epigastric pain without visible endoscopic lesions on esophagus which can progress to severe erosive esophagitis complicated with esophageal ulcer or stricture, esophageal epithelium metaplasia and dysplasia.

Antireflux mechanism disturbance is caused by decreased basal pressure in lower esophageal sphincter and diminished esogastric motility. Nitric oxide (NO) plays a key role in various pathological and pathophysiological processes of digestive tract. NO is an important biologic mediator involved in multiple and various chemical reactions in human biology.

NO excessive quantity is combined with oxygen to form peroxynitrite, thus causing inflammatory processes in the stomach, pancreas, bowel. The role of NO in acid-dependent diseases is based on the quantification of its metabolites in serum and gastric juice. We studied the levels of nitric oxide metabolites in serum and gastric juice in patients with GERD according to the degree of severity of the disease.

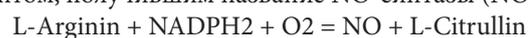
**Key words:** gastroesophageal reflux disease (GERD), nitric oxide (NO), serum, gastric juice

Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь – хроническое рецидивирующее заболевание, причиной развития которого является повторяющийся заброс (рефлюкс) в пищевод желудочного и/или дуоденального содержимого с развитием характерных симптомов (типичных, атипичных) и/или воспалительного поражения дистальной части пищевода и значительно нарушающий качество жизни, независимо от того сопровождаются ли они эрозивно-язвенными изменениями слизистой оболочки дистального отдела пищевода. В последнее время все чаще высказывают предположение о том, что оксид азота, играет не менее важную роль в патогенезе гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ).

Оксид азота (NO) оказывает многофакторное влияние при ГЭРБ, участвует как в регуляции моторики пищевода, так и в защите его слизистой оболочки (2,9,10). Описана протективная роль NO, которую связывают с повышением микроциркуляции, стабилизацией функции тучных кле-

ток, стимуляцией секреции слизи и бикарбонатов [3,14]. NO относится к нейромедиаторам, расслабляющим НПС, и таким образом способствующим ГЭР. Приведенные данные указывают на актуальность исследования патогенетической роли NO при ГЭРБ.

Оксид азота не является классическим трансмисмитером и будучи свободнорадикальной молекулой газа, достигает своих мишеней путем простой диффузии [25]. Но в то же время оксиду азота присущи важные свойства, характеризующие нейротрансмисмитеры: наличие в нейронах субстрата и синтезирующего фермента; способность высвобождаться из терминалей в ответ на нервные импульсы, способность воспроизводить эффект нервной стимуляции (25). Оксид азота синтезируется из аминокислоты L-аргинина в результате реакции, которая катализируется ферментом, получившим название NO-синтазы (NOS):



Кроме оксида азота (NO), образуется также L-цитрул-

лин. Часть цитрулина, поступающая в печень, преобразуется в мочевины, другая часть попадает в почки и вновь превращается в L- аргинин, благодаря чему в организме поддерживается достаточная концентрация субстрата [15,17].

Конечными продуктами NO в организме, образующимися в результате оксидазной реакции, являются нитриты и нитраты [22].

Существует и второй путь синтеза оксида азота, связанный с активацией нитритредуктазных систем. При патологических процессах, протекающих на фоне гипоксии, ишемии или воспаления роль NO-синтазного механизма может снижаться и повышаться активность нитритредуктазных систем. При этом происходит образование NO в результате восстановления ионов нитратов и нитритов в условиях дефицита кислорода. Оба механизма связаны между собой и являются компонентами цикла оксида азота:

L – аргинин - NO- NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> – NO [23,25]

Синтезировать и выделять оксид азота способно большинство клеток организма, но наиболее изучены 3 клеточные популяции: эндотелий кровеносных сосудов, клетки нервной ткани (нейроны) и макрофаги. Предполагается наличие четвертого типа NOS-митохондриальной [16].

Таким образом выделяют 3 основные изоформы NOS, которые были названы согласно тем типам клеток, где они были впервые обнаружены [14]:

- тип 1 — нейрональная (NOS -1)
- тип 2 — макрофагальная (NOS -2)
- тип 3—эндотелиальная (NOS -3).

Синтаза оксида азота – сложный фермент гомодимер, т.е. состоит из двух одинаковых субъединиц, к каждой из которых присоединено несколько кофакторов. Одним из важнейших кофакторов является внутриклеточный кальцийсвязывающий белок кальмодулин. При увеличении содержания ионов кальция в клетке он присоединяется к молекуле NOS, что приводит к активации фермента и синтезу NO. Таким образом изоформы отличаются друг от друга локализацией в организме и способом активации. Нейрональная изоформа (тип-1) и эндотелиальная изоформа (тип-3) являются конститутивными (сNOS), и постоянно присутствуют в цитозоле клеток и зависят от кальция – кальмодулиновой системы. Они обеспечивают синтез NO в нормальных условиях.

А макрофагальная изоформа, связанная с клеточными мембранами, является индуцибельной (iNOS), т.е. синтезируются в ответ на действие патогенных стимулов. Индуцибельные формы NOS продуцируют огромное ( в 100-1000 раз больше, чем конститутивные) количества NO. Поскольку высокие дозы NO токсичны для клеток, эта форма фермента считается патологической в отличие от конститутивной. Макрофагальная NOS обнаруживается при воспалении, септическом шоке, злокачественных новообразованиях [23].

Синтез iNOS индуцируется интерлейкином 1, интерфероном, фактором некроза опухолей, липополисахаридами грамотрицательных бактерий. В настоящее время доказано, что кроме макрофагов, iNOS содержится в гепатоцитах, лимфоцитах, моноцитах, фибробластах, клетках нейроглии и кишечного эпителия. Таким образом можно сказать, что NO синтезируется во всех органах. Выделение высоких концентраций оксида азота связаны с многочисленными патологическими процессами ЖКТ. Клеточные мишени

NO – это железосодержащие ферменты и белки, такие как гуанилатциклаза, гемоглобин, митохондриальные ферменты, ферменты синтеза белка и ДНК. Взаимодействие NOS с этими мишенями играет роль в цитотоксическом действии макрофагов, расслаблении мышц сосудов и желудочно-кишечного тракта [15].

Чрезмерное количество оксида азота, выделяемое при активации iNOS конъюгирует с кислородом, образуя пероксинитрит [5]. Принимая участие в образовании свободных радикалов, NO провоцирует воспалительные процессы в желудке, поджелудочной железе, кишечнике, печени [7,8]

Таким образом для оценки особенностей метаболизма оксида азота в патогенезе кислотозависимых заболеваний необходимо определение не только метаболитов оксида азота в плазме крови, но и в желудочном соке. Учитывая, что этот вопрос недостаточно изучен и представляет собой клинический интерес, мы поставили цель определить уровень метаболитов оксида азота в сыворотке крови и в желудочном соке у больных с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью в зависимости от степени тяжести и возможности его определения в качестве маркера для оценки активности воспалительного процесса слизистой оболочки верхних отделов ЖКТ.

Материалы и методы:

В исследование было включено 144 пациента с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью в возрасте от 20 до 67 лет, из них 57 пациентов с эндоскопически негативной формой ГЭРБ и 87 пациентов с эрозивной формой. Диагноз подтвержден на основании клинико-anamnestических данных ( т.е. жалобы на изжогу, регургитацию, боли в грудной клетке, дисфагию) и инструментальных методов исследования (ФЭГДС). Контрольную группу составили 108 клинически здоровых добровольцев, которые не предъявляли жалобы и добровольно согласились пройти клиническое и лабораторное обследование метаболитов оксида азота в сыворотке крови, из них 18 было проведено эндоскопическое исследование с забором желудочного сока. Уровень метаболитов NO (нитратов и нитритов) в сыворотке крови и желудочном соке определяли колориметрическим методом по интенсивности цвета в результате реакции азотирования сульфониламида ионами NO<sub>2</sub>-.

#### Результаты исследования

Уровень метаболитов NO плазмы крови в контрольной группе составил 71,76±0,8 мкмоль/л. Определилось очевидное увеличение концентрации метаболитов оксида азота в сыворотке крови больных ГЭРБ. Более высокая концентрация нитритов оказалась у 87 больных с эрозивной рефлюксной болезнью что составляло (97,02±0,4 мкмоль/л), тогда как в группе больных с эндоскопически негативной ГЭРБ уровень метаболитов NO был равен (83,43±0,7 мкмоль/л) . (таб 1).

**Таблица 1.** Концентрация нитритов плазмы крови в группах

Показатель	Контрольная группа, n =108	НЭРБ n = 57	ЭРБ n = 87
Концентрация нитритов плазмы крови, мкмоль/л	71,76±0,8	83,43±0,7	97,02±0,4

Примечание: p1,2 < 0,001 статистическое отличие между данными групп I и II; p1,3 < 0,001 статистическое отличие между данными групп I и III; p2,3 < 0,001 статистическое отличие между данными групп II и III;

Исследование концентрации метаболитов оксида азота в желудочном соке показало повышение этого параметра у больных, страдающих ГЭРБ по сравнению с показателями в контрольной группе. Так у больных с неэрозивной формой рефлюксной болезни концентрация метаболитов оксида азота в желудочном соке составила  $42,92 \pm 0,6$  ммоль/л, а у больных с эрозивной формой ГЭРБ -  $52,09 \pm 0,3$  ммоль/л, что достоверно выше, чем в контрольной группе ( $26,8 \pm 0,5$  ммоль/л). Результаты исследования NO в желудочном соке у больных с ГЭРБ, представлены в таблице 2.

Таблица 2. Концентрация нитритов в желудочном соке

Показатель	Контрольная группа, n = 108	НЭРБ n = 57	ЭРБ n = 87
Концентрация нитритов в желудочном соке, мкмоль/л	$26,8 \pm 0,5$	$42,92 \pm 0,6$	$52,09 \pm 0,3$

Примечание:  $p_{1,2} < 0,001$  статистическое отличие между данными групп I и II;  $p_{1,3} < 0,001$  статистическое отличие между данными групп I и III;  $p_{2,3} < 0,001$  статистическое отличие между данными групп II и III;

### Обсуждения

При изучении особенностей метаболизма оксида было выявлено, что повышение конечных метаболитов NO (нитратов и нитритов) характерно, как для ЭРБ, так и для НЭРБ. В первой группе больных с эндоскопически негативной формой ГЭРБ, содержание метаболитов оксида азота в плазме крови и желудочном соке достоверно выше по сравнению с контрольной группой. Иммуногистохимическими методами установлено содержание n NOS в нейронах сплетения Ауэрбаха [18]. Расслабление пищевода и НПС осуществляется за счет неадренергической нехолинергической иннервации (NANC), в которой NO является главным медиатором, высвобождающимся из NANC нейронов межмышечного сплетения, которые наряду с холин- и норадренергическими проводниками автономной нервной системы представляют третий тип нервной системы [20]. Установлено, что около 5% преганглионарных нейронов (I тип Догеля), иннервирующих ЖКТ, являются нитроксидагическими, и они синтезируют конститутивную форму нейрональной NOS. Распределение нитроксидагических нейронов в пищеварительном тракте неоднородно: наибольшее количество содержится в межмышечном сплетении сфинктерных зон: в пищеводе - 80%, в 12п. кишке - 70%, в прямой кишке - 74%. Стимуляция нейронов сопровождается увеличением синтеза NO, который проникает в мышечный слой и активирует растворимую гуанилатциклазу, которая в свою очередь активирует синтез цГМФ. Повышение уровня цГМФ приводит к снижению ионов кальция в цитозоле и ослаблению связи между миомином и актином, что приводит к расслаблению клеток НПС, замедляет

перистальтику пищевода. Таким образом можно с уверенностью утверждать, что NO и нервные клетки в которых он присутствует в качестве медиатора, имеют важное значение в патогенезе ГЭРБ [6,11].

Вторая группа больных с эрозивной формой характеризуется наличием осложнений ГЭРБ. Уровень метаболитов метаболитов оксида азота в плазме крови и желудочном соке достоверно выше по сравнению с первой группой (НЭРБ) и группой контроля. Сравнительный анализ содержания нитратов и нитритов в трех группах показал что, воспалительный процесс в пищеводе достоверно сопровождается повышенной продукцией оксида азота. Доказано, что ионы водорода повреждают межклеточные пространства, активируют нейтрофилы и макрофаги, те в свою очередь продуцируют провоспалительные цитокины, такие как интерлейкины, интерферон  $\gamma$ , фактор некроза опухоли  $\alpha$  и другие медиаторы воспаления, которые воздействуют на iNOS с последующей гиперпродукцией оксида азота и нарастанию воспаления и свободно-радикального окисления [5,7]. Проведенное нами исследование показало достоверное повышение концентрации метаболитов оксида азота, что прямо коррелирует со степенью эзофагита. При этом происходит формирование так называемого порочного круга патогенеза ГЭРБ: повышение синтеза NO, вследствие активации нейрональной синтазы оксида азота приводит к снижению давления НПС, что в свою очередь усиливает гастроэзофагеальный рефлюкс и замедляет перистальтику пищевода, увеличивается время экспозиции кислоты в пищеводе, что усиливает воспаление (при этом активируется индуцибельная синтаза оксида азота) и приводит к еще большему повышению оксида азота.

### Выводы

1. Содержание метаболитов NO в сыворотке крови и в желудочном соке у больных ГЭРБ достоверно выше по сравнению с контрольной группой.

2. Концентрация метаболитов NO в сыворотке крови и в желудочном соке больных с эрозивной формой ГЭРБ достоверно выше по сравнению с неэрозивными формами.

3. Выявлена прямая зависимость от степени тяжести ГЭРБ - чем выше степень активности воспалительного процесса в слизистой оболочке, тем больше уровень оксида азота в плазме крови и в желудочном соке, что позволяет предположить патогенетическую значимость NO в развитии и прогрессировании ГЭРБ.

4. Определение уровня метаболитов оксида азота в плазме крови и желудочном соке является маркером степени тяжести воспалительного процесса у больных с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью.

### Литература:

1. Allen A, Flemstrom G, Carner *Physiol Rev* 1993 Oct 73/4;
2. Angel F, Bayer S., Moog R., Ringwald C., Crenner F. Monoxyde d'azote : neurotransmetteur inhibiteur dans le système nerveux entérique *Hepato-gastro*, Vol. 6, N2, Mars-Avril 1999.
3. Brown J.F., Hanson P.J., Whittle B.J. *Eur.J.Pharmacol.* 1992 Nov.13; 223(1)
4. Brown J.F., Keates A.C., Hanson P.J., *Am J Physiol* 1993, Sep; 265 (3 Pt.1)
5. Beckmann J.S., Koppenol W.H. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrit: the good, the bad and ugly. *Am.J.Physiol.* 1996.Vol.271.p.1424-1437.
6. Casselbrant A., Pettersson A., Fandriks L. Oesophageal intraluminal nitric oxide facilitates the acid-induced oesophago-salivary reflex. *Scand J Gastroenterol* 2003;
7. Dumbraва V-T., Taran N. Evaluarea nitraților și nitriților în lichidele biologice (ser și urina) la pacienții cu hepatite cornice virale în dependență de sindromul citolic.

*Materiale conf. științifice intern.* Chișinău, 2005, p.210-217.

8. Taran N.V., Dumbraва V-T., Lupașco I.A., Tofan-Scutaru L.G. The study of NO (nitrates and nitrites) metabolites content and the immune status of patients with chronic hepatitis C and D, dependent on the activity of the inflammatory process. 19-ая Российская гастроэнтерологическая неделя. Москва. 2013.
9. Koturek J.W., Thor P., Lukashyk A., et al. Endogenous nitric oxide in the control of esophageal motility in humans. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48(2).
10. Kato S., Kitamura M., Korolkiewich R.P., *Br J Pharmacol* 1998, Mar.
11. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol.Rev.* 1991. - Vol.43.
12. Moncada S., Higgs A. Mechanisms of disease: the L-arginine nitric oxide pathway. *New Engl.J.Med.* - 1993. - Vol.329.
13. Furchgott R.W., and Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin. *Nature.*- 1980.- 288.
14. Forstermann U., Closs E.L, Pollock J.S. et al. Nitric oxide synthase isozymes, characterization, purification, molecular cloning and function. *Hypertension.*- 1994.-Vol. 23
15. Виноградов Н.А. Многоликая окись азота. *РЖГК* 1997; 2:6-11.
16. Виноградов Н.А. Изменение синтеза оксида азота, содержания адренокортикотропного гормона и кортизола при вирусном гепатите В. *Клин. мед.* 2001. 11
17. Горрен А.К.Ф., Майер Б. Универсальная и комплексная энзимология синтазы оксида азота. *Биохимия.* 1998. Т.63, вып.7
18. Кирнус Н.И., Артамонов Р.Г., Смирнов И.Е.// Оксид азота и хронические болезни пищеварительного тракта у детей. *Педиатрия.*2007.Т.86 №5
19. Малышев И.Ю. Введение в биохимию оксида азота. *РЖГК* 1997; 7(1):49-55.
20. Мотавкин П.А. Оксид азота в органах пищеварительной системы. *Рac.Medical Journal*,2004, №2.
21. Ивашкин В.Т., Драпкина О.М. Оксид азота в регуляции функциональной активности физиологических систем. *РЖГК* 2000; 10(4):16-21.
22. Осадчук М.А., Калинин А.В.// Роль диффузной нейроэндокринной системы в патогенезе и исходе гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. *РЖГК.*2007,3
23. Поленов С.А. Окись азота в регуляции функций желудочно-кишечного тракта. *РЖГК* 1998.
24. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота. *Биохимия.* 1998. Т.63, вып.7.
25. Стариков В. Н. Патогенетическое и клинико-диагностическое значение особенностей метаболизма оксида азота у больных ГЭРБ Автореф., Санкт-Петербург 2003