

NF-κB-ОПОСЕРЕДКОВАНИЙ ВПЛИВ NO-СИНТАЗ НА ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНІ ПРОЦЕСИ У ТКАНИНАХ ПАРОДОНТА ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

У експерименті на 40 білих щурах досліджено роль NF-κB у механізмах порушень вільнорадикальних процесів, залежних від функціонального стану NOS, у тканинах пародонта при моделюванні метаболічного синдрому (МС). Показано, що здатність нейрональної NO-синтази (nNOS) регулювати (обмежувати) пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) у м'яких тканинах пародонта за умов МС є NF-κB-опосередкованим. Збільшення при введенні селективного інгібітора nNOS утворення ТБК-активних сполук та зниження антиоксидантного (АО) потенціалу усувається призначенням інгібітора ядерної транслокації NF-κB JSH-23 (4-метил-N-(3-фенілпропіл)бензол-1,2-діаміну). Показано, що дія селективного інгібітора індукційної NO-синтази аміногуанідину за умов МС не супроводжується NF-κB-залежними змінами ПОЛ і АО потенціалу в м'яких тканинах пародонта. Введення JSH-23 за умов експерименту супроводжується підвищенням АО дії L-аргініну.

Ключові слова: метаболічний синдром, ядерний фактор κB, оксид азоту, NO-синтази, пародонт, пероксидне окиснення ліпідів, антиоксидантна система.

Робота є фрагментом НДР "Кисень- та NO-залежні механізми ушкодження внутрішніх органів та їх корекція фізіологічно активними речовинами" (№ держреєстрації 0108U010079).

В останні роки повідомляється про наявність спільних механізмів у розвитку метаболічного синдрому (МС) і запально-дистрофічних захворювань пародонта [7].

Важливим аспектом МС, що сприяє розвитку кардіоваскулярних ускладнень, вважається ендотеліальна дисфункція [6]. Слід зазначити, що до цього часу все ще не вирішено питання причинно-наслідкових взаємозв'язків інсулінорезистентності (ІР) і ендотеліальної дисфункції, проте безсумнівним є той факт, що ІР та дисфункція ендотелію, основним наслідком якої є порушення синтезу оксиду азоту (NO), являють собою ланки одного ланцюга.

У той же час відмічається неоднозначна дія NO на патогенез захворювань як серцево-судинної системи та обміну речовин [10], так і пародонта [16].

Відомо, що значна кількість ефектів NO опосередковується за допомогою активації транскрипційного ядерного фактора κB (NF-κB) [11,12]. В останні роки висунуто припущення, що порушення NF-κB сигналізації може бути загальною ланкою, яка об'єднує всі компоненти МС та призводить до інсулінорезистентності, ліпотоксичності, системної гіперцитокінемії та артеріальної гіпертензії [2].

Активация NF-κB та індукційної NO-синтази (iNOS) супроводжується посиленням вироблення активних форм кисню, зокрема,

супероксидного аніон-радикала (O_2^-) [11]. У той же час, у дослідях на культурі астроцитів та *in vivo* (тканини тонкої кишки) показано, що пригнічення NF-κB може розглядатися як механізм регуляторного впливу нейрональної NO-синтази (nNOS) на експресію iNOS [15,18]. Пригнічення nNOS супроводжується активацією

NF-κB, зниженням вмісту інгібіторного білка IκBα з наступним підвищенням мРНК iNOS, вмісту та активності цього ферменту [15].

Раніше нами показана участь nNOS за умов експериментального МС у регуляції вироблення

у м'яких тканинах пародонта O_2^- , у т.ч. мікосомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами (ЕТЛ) [4].

Проте роль NF-κB у реалізації ефектів різних ізоформ NOS на вільнорадикальні процеси у тканинах пародонта за цих умов залишається нез'ясованою.

Метою роботи було вивчення ролі NF-κB у механізмах порушень вільнорадикальних процесів, залежних від функціонального стану NOS, у тканинах пародонта щурів за умов моделювання МС.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження були проведені на 40 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-230 г у 8-ми серіях дослідів: у першій необхідні показники вивчали у інтактних тварин (контрольна серія), у другій - після моделювання МС, у третій, четвертій і п'ятій серіях - протягом відтворення МС тваринам вводили відповідно селективний інгібітор nNOS 7-нітроіндазол (7-NI), селективний інгібітор iNOS - аміногуанідин і субстрат NO-синтазної реакції - L-аргінін, у шостій, сьомій та восьмій – поряд з наведеними вище речовинами щурам на тлі моделювання МС вводили інгібітор активації NF-κB II - JSH-23 (4-метил-N-(3-фенілпропіл)бензол-1,2-діамін).

Для моделювання МС гризунам протягом двох місяців призначали 20% водний розчин фруктози для пиття та "дієту західного типу", що містить такі складові: рафіноване пшеничне

борошно – 45%, сухе знежирене коров'яче молоко – 20%, крохмаль – 10%, столовий маргарин (зі складом жирів 82%) – 20%, переокиснена соняшникова олія – 4%, натрію хлорид – 1%. 7-NI ("Sigma", США) призначали в дозі 30 мг/кг [14], аміногуанідин ("Sigma", США) - 20 мг/кг [17], L-аргінін ("Kyowa Hakko Kogyo Co LTD", Японія) - 500 мг/кг [1], JSH-23 ("Santa Cruz Biotechnology", ФРН) - 1 мг/кг маси тварини [13]. Усі сполуки вводили внутрішньоочеревинно 2 рази на тиждень протягом періоду відтворення МС. Тварин декапітували під ефірним наркозом.

Утворення O^2 у м'яких тканинах пародонта оцінювали при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм з такими індукторами: НАДН – для оцінки продукції O^2 мітохондріальним ЕТЛ; НАДФН – для оцінки продукції O^2 мікосомальним ЕТЛ [9]. Рівень пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканинах оцінювали за утворенням у реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними продуктами забарвленого триметінового комплексу до і після 1,5-годинної інкубації у прооксидантному залізоаскорбатному буферному розчині [5]. Активність антиоксидантної (АО) системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час півторагодинної інкубації гомогенату тканин у залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю каталази [5].

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

Результати дослідження та їх обговорення

Для дослідження можливої ролі NF-κB у реалізації ефектів NOS на вільнорадикальні процеси в тканинах пародонта за умов відтворення експериментального МС щурам призначали JSH-23, який впливає на механізм активації NF-κB, пов'язаний з ядерною транслокацією вільної форми фактора, завдяки чому пригнічується генна транскрипція. При цьому процес деградації білків родини ІκB не порушується [13].

За умов сполученої дії селективного інгібітора nNOS 7-NI та JSH-23 (табл. 1)

генерація O^2 у м'яких тканинах пародонта щурів мікосомальним ЕТЛ знижується – на 13.2% ($p < 0,05$), мітохондріальним ЕТЛ – на 18.5% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними третьої серії. За цих умов концентрація ТБК-реактивів істотно знижується – на (21.5%, $p < 0,05$). Приріст концентрації ТБК-реактивів за час інкубації у прооксидантному буферному розчині зменшується на 21.3% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними третьої серії.

У той же час, активність каталази за цих умов істотно не відрізняється від результату третьої серії.

Таблиця 1
Вплив NF-κB JSH-23 на вільнорадикальні процеси у м'яких тканинах пародонта умов відтворення МС та пригнічення nNOS (M±m, n=20)

Показники	Серії дослідів			
	Інтактні тварини	Відтворення МС		
		Контроль	+ 7-NI	+ 7-NI + JSH-23
Продукція O^2 , нмоль/г·с мікосомальним ЕТЛ (стимуляція НАДФН)	19.07±1.52	28.40±0.97*	32.27±0.85 */**	28.00±1.54 */***
мітохондріальним ЕТЛ (стимуляція НАДН)	18.53±1.15	29.87±0.76*	33.87±0.83 */**	27.60±1.35 */***
Концентрація ТБК-реактивів, мкмоль/кг	20.7±2.5	35.1±1.6*	40.4±2.1*	31.7±2.7 */***
Приріст ТБК-реактивів за час до інкубації	17.6±1.2	29.9±0.9*	33.8±0.9 */**	26.6±1.5 */***
Каталаза, мккатал/кг	2.73±0.32	1.68±0.22*	2.41±0.21**	2.57±0.33

Примітка: * - $p < 0,05$ при порівнянні з даними інтактних щурів; ** - $P < 0,05$ при порівнянні з даними другої серії; *** - $P < 0,05$ при порівнянні з даними третьої серії

Таким чином, здатність селективного інгібітора nNOS 7-NI підвищувати продукцію O^2 мікосомальним і мітохондріальним ЕТЛ, концентрацію ТБК-реактивів та їх приріст за час інкубації у прооксидантному буферному розчині усувається при пригніченні ядерної транслокації NF-κB при застосуванні JSH-23.

Це вказує, що вироблення O^2 , інтенсифікація ПОЛ та зниження АО потенціалу у м'яких тканинах пародонта за умов відтворення МС пов'язані з пригніченням nNOS, опосередковуються активацією NF-κB.

Пригнічення nNOS супроводжується

гіперпродукцією O^2 , яка може реалізуватися через NF-κB-опосередковану експресію iNOS. Відомо, що з функціонуванням останньої

пов'язана надлишкова генерація O^2 у тканинах пародонта при різних токсичних впливах та запаленні [3,8].

При сполученому впливі селективного інгібітора iNOS аміногуанідину та інгібітора активації NF-κB II - JSH-23 за умов відтворення експериментального МС у м'яких тканинах пародонта зберігається зменшений загальний

фон продукції O_2 , рівень його генерації мікосомальним і мітохондріальним ЕТЛ, знижена концентрація ТБК-реактантів та їх приріст за час інкубації у прооксидантному буферному розчині (табл. 2).

Тобто, пригнічення iNOS досить ефективно

обмежує вироблення активних форм кисню та реакції ПОЛ і додаткове порушення механізму активації NF-κB, що, як відомо, також зменшує експресію iNOS, істотно не позначається на відповідних показниках.

Таблиця 2
Вплив NF-κB JSH-23 на вільнорадикальні процеси у м'яких тканинах пародонта умов відтворення MC та пригнічення iNOS ($M \pm m$, $n=20$)

Показники	Серії дослідів			
	Інтактні тварини	Відтворення MC		
		Контроль	+ аміногуанідин	+ аміногуанідин + JSH-23
Продукція O_2 , нмоль/г·с				
мікосомальним ЕТЛ (стимуляція НАДФН)	19.07±1.52	28.40±0.97*	25.20±1.14*	23.87±1.38 **/**
мітохондріальним ЕТЛ (стимуляція НАДН)	18.53±1.15	29.87±0.76*	24.27±0.88 **/**	23.07±1.16 **/**
Концентрація ТБК-реактантів, мкмоль/кг	20.7±2.5	35.1±1.6*	21.6±2.7**	25.0±2.5**
Приріст ТБК-реактантів за час до інкубації	17.6±1.2	29.9±0.9*	18.2±1.1**	21.0±1.4**
Каталаза, мккатал/кг	2.73±0.32	1.68±0.22*	2.67±0.27**	2.76±0.25**

Примітка: * - $p < 0,05$ при порівнянні з даними інтактних щурів; ** - $P < 0,05$ при порівнянні з даними другої серії; *** - $P < 0,05$ при порівнянні з даними четвертої серії

При сполученому впливі субстрату NOS L-аргініну та інгібітора активації NF-κB II - JSH-23 - за умов відтворення експериментального MC у м'яких тканинах пародонта суттєвих змін

загального фону продукції O_2 та рівня його генерації мікосомальним і мітохондріальним ЕТЛ у порівнянні з даними п'ятої серії ми не виявили (таблиця 3).

Таблиця 3
Вплив NF-κB JSH-23 на вільнорадикальні процеси у м'яких тканинах пародонта умов відтворення MC та введення субстрату NOS ($M \pm m$, $n=20$)

Показники	Серії дослідів			
	Інтактні тварини	Відтворення MC		
		Контроль	+ L-аргінін	+ L-аргінін + JSH-23
Продукція O_2 , нмоль/г·с				
мікосомальним ЕТЛ (стимуляція НАДФН)	19.07±1.52	28.40±0.97*	25.87±0.91*	27.07±1.52*
мітохондріальним ЕТЛ (стимуляція НАДН)	18.53±1.15	29.87±0.76*	28.00±0.78*	27.74±1.14 *
Концентрація ТБК-реактантів, мкмоль/кг	20.7±2.5	35.1±1.6*	23.6±1.9**	18.3±0.6 **/**
Приріст ТБК-реактантів за час до інкубації	17.6±1.2	29.9±0.9*	20.3±1.0**	16.8±0.8 **/**
Каталаза, мккатал/кг	2.73±0.32	1.68±0.22*	2.22±0.19	2.65±0.25**

Примітка: * - $p < 0,05$ при порівнянні з даними інтактних щурів; ** - $P < 0,05$ при порівнянні з даними другої серії; *** - $P < 0,05$ при порівнянні з даними п'ятої серії

Проте за цих умов істотно змінюються показники ПОЛ. Так, концентрація ТБК-реактантів зменшується – на 22.5% ($p < 0,05$) у порівнянні з результатом п'ятої серії. Приріст концентрації ТБК-реактантів за час інкубації у прооксидантному буферному розчині знижується на 17.2% ($p < 0,05$).

Таким чином, у цьому випадку пригнічення активності NF-κB супроводжується підвищенням антиоксидантної дії L-аргініну в м'яких тканинах пародонта.

Можна припустити наявність нового механізму, що пояснює феномен «аргінінового парадоксу». Так, за наявності умов для пригнічення активності NF-κB екзогенно введений L-аргінін утилізується конститутивними NOS, що виробляють NO, який виконує сигнальні функції (у т.ч. націлені на обмеження ПОЛ). При цьому експресія iNOS значно зменшується або відсутня, що запобігає ініціації вільнорадикальних реакцій.

Висновки

1. Здатність nNOS регулювати (обмежувати) ПОЛ у м'яких тканинах пародонта щурів за умов експериментального MC є NF-κB-опосередкованою. Збільшення за умов введення селективного інгібітора nNOS утворення ТБК-активних сполук та зниження АО потенціалу усувається призначенням інгібітора активації NF-κB II - JSH-23.

2. Дія селективного інгібітора iNOS аміногуанідину за умов експериментального MC не супроводжується NF-κB-залежними змінами ПОЛ і АО потенціалу в м'яких тканинах пародонта.

3. Введення інгібітора NF-κB JSH-23 за умов експериментального MC супроводжується підвищенням антиоксидантної дії L-аргініну в м'яких тканинах пародонта.

Література

1. Дробінська О. Вплив L-аргініну на ураження в слизовій оболонці шлунка, спричинені серотоніном / О. Дробінська, Л. Остапченко, О. Цирюк [та ін.] // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2004. – Вип. 38. – С. 201-204.
2. Кайдашев І.П. Активация NF-κB при метаболічному синдромі / І.П. Кайдашев // Фізіол. журн. – 2012. – Т. 58, №1. – С. 93-101.
3. Коваленко О.В. NO-залежні зміни продукції супероксидного аніон-радикала в піднижньощелепних слинних залозах за умов експериментального травматичного сіаладеніту / О.В. Коваленко, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2011. – Т. 11, №2. – С. 42-45.
4. Ляшенко Л.І. Роль NO-синтаз у механізмах порушень вільнорадикальних процесів у тканинах пародонта і слинних залоз щурів за умов експериментального метаболічного синдрому / Л.І. Ляшенко, А.М. Єлінська, В.В. Талаш, В.О. Костенко // Світ біол. та мед. – 2014. – № 2. – С. 139-142.
5. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / [Л.В. Беркало, О.В. Бобович, Н.О. Боброва та ін.] ; за ред. І.П. Кайдашева. – Полтава, 2003. – 320 с.
6. Мазуров В.И. Эндотелиальная дисфункция при метаболіческом синдроме / В.И. Мазуров, В.А. Якушева // Эфферентная терапия. – 2006. – Т. 12, № 3. – С. 19-25.
7. Романенко И.Г. Генерализованный пародонтит и метаболіческий синдром. Единство патогенетических механизмов развития / И.Г. Романенко, Д.Ю. Крючков // Крымск. терапевт. журн. – 2011. – №1. – С. 60-67.
8. Стасюк О.А. Роль ізоформ NO-синтази у механізмах порушень вільнорадикальних процесів у слинних залозах щурів за умов спільного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію / О.А. Стасюк, В.О. Костенко // Світ мед. та біол. – 2012. – № 4.
9. Цебржинский О.И. Дифференцированное спектрофотометрическое определение продукции супероксида в тканях НСТ-тестом / О.И. Цебржинский // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2002. – Т. 2, №1. – С. 96-97.
10. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца / под ред. А.А. Мойбенко, В.Е. Досенко, А.Н. Пархоменко. – К. : Наукова думка, 2008. – 520 с.
11. Brady T.C. Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF-kappa B activation / T.C. Brady, L.Y. Chang, B.J. Day, J.D. Crapo // Am. J. Physiol. – 1997. – V. 273, №5 (Pt 1). – P. L1002- L1006.
12. Fan Y.H. Arginine vasopressin increases iNOS-NO system activity in cardiac fibroblasts through NF-kappaB activation and its relation with myocardial fibrosis / Y.H. Fan, L.Y. Zhao, Q.S. [et al.] // Life Sci. – 2007. – V. 81, №4. – P. 327-335.
13. Kumar A. JSH-23 targets nuclear factor-kappa B and reverses various deficits in experimental diabetic neuropathy: effect on neuroinflammation and antioxidant defence / A. Kumar, G. Negi, S.S. Sharma // Diabetes Obes. Metab. – 2011. – V. 13, №8. – P. 750-758.
14. Laude K. NO produced by endothelial NO synthase is a mediator of delayed preconditioning-induced endothelial protection / K. Laude, J. Favre, C. Thuillez [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2003. – V. 284, №6. – P. H2053-H2060.
15. Qu X.-W. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates the expression of inducible NOS in rat small intestine via modulation of nuclear factor kappa B / X.-W. Qu, H. Wang, I.G. de Plaen [et al.] // FASEB. – 2001. – V. 15. – P. 439-446.
16. Sá Siqueira M.A. Nitric oxide and oral diseases: can we talk about it? / M.A. de Sá Siqueira, R.G. Fischer, C.M. da Silva Figueredo [et al.] // Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. – 2010. – V. 8, №2. – P. 104-112.
17. Takeuchi K. Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats / K. Takeuchi, R. Hatazawa, M. Tanigami [et al.] // Life Sci. – 2007. – V. 80, №4. – P. 329-336.
18. Togashi H. Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression / H. Togashi, M. Sasaki, E. Frohman [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 1997. – V. 94, №6. – P. 2676-2680.

Реферат

NF-κB-ОПОСРЕДОВАННОЕ ВЛИЯНИЕ NO-СИНТАЗ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ТКАНЯХ ПАРОДОНТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

Ляшенко Л.И., Костенко В.А.

Ключевые слова: метаболический синдром, ядерный фактор κB, оксид азота, NO-синтазы, пародонт, пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система.

В эксперименте на 40 белых крысах исследована роль NF-κB в механизмах нарушений свободнорадикальных процессов, зависящих от функционального состояния NOS, в тканях пародонта при моделировании метаболического синдрома (МС). Показано, что способность нейрональной NO-синтазы (nNOS) регулировать (ограничивать) пероксидное окисление липидов (ПОЛ) в мягких тканях пародонта при МС является NF-κB-опосредованным. Увеличение при введении селективного ингибитора nNOS образования ТБК-активных соединений и снижение антиоксидантного (АО) потенциала устраняется назначением ингибитора ядерной транслокации NF-κB JSH-23 (4-метил-N-(3-фенилпропил) бензол-1,2-диамина). Показано, что действие селективного ингибитора индуцибельной NO-синтазы аминоганидина в условиях МС не сопровождается NF-κB-зависимыми изменениями ПОЛ и АО потенциала в мягких тканях пародонта. Введение JSH-23 в условиях эксперимента сопровождается повышением АО действия L-аргинина.

Summary

NF-κB-MEDIATED INFLUENCE OF NO-SYNTASES ON FREE RADICAL PROCESSES IN THE PERIODONTAL TISSUES UNDER MODELED METABOLIC SYNDROME

Ljashenko L.I., Kostenko V.A.

Key words: metabolic syndrome, nuclear factor κB, nitric oxide, NO- synthases, periodontium, lipid peroxidation, antioxidant system.

The role of NF-κB in the mechanisms of free radical processes impairment depending on the functional state of NOS in periodontal tissues under modeled metabolic syndrome (MS) was studied in the experiment on 40 white rats. We have shown the ability of neuronal NO-synthases (nNOS) to regulate (limit) lipid peroxidation (LPO) in periodontal soft tissues under conditions of MS is NF-κB- mediated. The introduction of selective nNOS inhibitor leads to the increase in the formation of TBA- active compounds, while the reduction in antioxidant potential (AO) is eliminated by the inhibitor of nuclear translocation of NF-κB JSH- 23 (4-methyl-N- (3-phenylpropyl) benzene -1,2-diamine). It has been shown that the effect of selective inhibitor of inducible NO-synthase aminoguanidine under MS is not accompanied by NF-κB-dependent changes of LPO and AO capacity in periodontal tissues. The introduction of JSH-23 under conditions of metabolic syndrome is accompanied by increased AO action of L-arginine.