

УДК 616.316–008–092.18–092.6

Єлінська А.М., Соловійова Н.В., Костенко В.О.

РОЛЬ ПЕРОКСИНИТРИТУ У МЕХАНІЗМАХ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У СЛИННИХ ЗАЛОЗАХ ЗА УМОВ ВІДТВОРЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

У експерименті на 30 білих щурах досліджено роль пероксинітриту в механізмах порушень вільнорадикальних процесів у тканинах піднижньощелепних слинних залоз (СЗ) при моделюванні метаболічного синдрому (МС). Показано, що розлади окиснювального метаболізму та дисбаланс NO-синтазного та аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну у СЗ за цих умов є пероксинітрит-залежними. Введення під час експерименту щурам скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну знижує у СЗ активність NO-синтази та концентрацію нітрит-йонів, підвищує активність ферменту неокисного (аргіназного) шляху метаболізму L-аргініну – орнітиндекарбоксилази. При цьому L-селенометіонін знижує у тканинах СЗ продукцію супероксидного аніон-радикала НАДФН-залежним (мікросомальним та NO-синтазою) та НАДФН-залежним (мітохондріальним) електронно-транспортними ланцюгами, інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів, підвищує антиоксидантний захист, активність супероксиддисмутази та каталази.

Ключові слова: метаболічний синдром, пероксинітрит, L-селенометіонін, слинні залози, NO-синтаза, пероксидне окиснення ліпідів, антиоксидантна система.

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

Відомо, що серед хворих з ознаками метаболічного синдрому (МС) досить поширеними є реактивно-дистрофічні ураження слинних залоз (СЗ) з порушенням їхньої функції [1]. За думкою авторів ці зміни можуть розглядатися в структурі єдиного патологічного процесу, загальним патогенетичним механізмом якого є інсулінорезистентність (ІР). Виразність клінічних проявів сіалопадену корелює з тяжкістю перебігу МС.

Структури СЗ є досить чутливими до дефіциту або надлишку оксиду азоту (NO), що утворюється за участю різних ізоформ NO-синтази, нітритредуктаз, неферментативних реакцій відновлення нітрит-йонів [4]. В останні роки показано, що NO-залежне ураження СЗ за умов хронічного запалення та інтоксикації в значній мірі опосередковується через утворення високотоксичного пероксинітриту [2, 7].

Утворення пероксинітриту відбувається в результаті взаємодії NO з супероксидним аніон-

радикалом (O_2^-) [14], вироблення якого у тканинах СЗ за умов МС, за нашими попередніми даними, істотно збільшується [3].

Одним із шляхів дослідження ефектів пероксинітриту *in vivo* є застосування скевенджерів цієї речовини. Так, з цією метою використовують L-селенометіонін [12], у тому числі при дослідженні ролі пероксинітриту у пошкодженні СЗ [2, 7]. Показано, що сполуки селену з низькою молекулярною масою ефективно реагують з пероксинітритом та захищають модельні речовини від окиснення та нітрування, а плазмідну ДНК від пероксинітрит-індукованих одониткових розривів [12].

Проте роль пероксинітриту у патогенезі порушень окиснювальних процесів у слинних залозах за умов МС залишається нез'ясованою. Розв'язання цього питання дозволить розширити арсенал засобів попередження та лікування

розладів СЗ та інших залежних від їх стану систем при дії факторів-ініціаторів розвитку МС.

Метою роботи було вивчення ролі пероксинітриту в механізмах порушень вільнорадикальних процесів у тканинах піднижньощелепних СЗ щурів за умов моделювання МС.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження були проведені на 30 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-230 г у 3-х серіях дослідів: у першій необхідні показники вивчали у інтактних тварин (контрольна серія), у другій – після моделювання МС, у третій – протягом відтворення МС щурам вводили скевенджер пероксинітриту – L-селенометіонін ("Sigma-Aldrich, Inc.", США) – в дозі 3 мг/кг [13] внутрішньоочередовно 2 рази на тиждень. Тварин декапітували під ефірним наркозом.

Для моделювання МС гризунам протягом двох місяців призначали 20% водний розчин фруктози для пиття та "дієту західного типу" [5].

Активність ферменту окисного шляху метаболізму L-аргініну – NO-синтази – визначали за

різницею концентрації нітрит-йонів (NO_2^-) до та після інкубації гомогенату піднижньощелепних СЗ у середовищі, що містить L-аргінін та НАДФН. Концентрацію NO_2^- визначали шляхом утворення діазосполук у реакції з сульфаніловою кислотою, а потім проводили реакцію з α -нафтилетилендіаміном, у результаті якої утворюються похідні червоного кольору (азобарвники) [10].

Активність ферменту неокисного (аргіназного) шляху метаболізму L-аргініну – орнітиндекарбоксилази – визначали за зниженням вмісту орнітину в інкубаційному середовищі методом Chipard у модифікації [8].

Утворення O_2^- у тканинах піднижньощелеп-

них СЗ оцінювали при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм з такими індукторами: НАДН –

для оцінки продукції $\cdot O^2$ мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом (ЕТЛ); НАДФН –

для оцінки продукції $\cdot O^2$ мікосомальним ЕТЛ та NO-синтазою [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 [6]. Стан антиоксидантної (АО) системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час півторагодинної інкубації гомогенату тканин СЗ у залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю АО ферментів – супероксиддисмутази (СОД) та каталази [6].

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

Результати дослідження та їх обговорення

Відомо, що найбільший рівень постачання

NO у реакцію, де він взаємодіє з $\cdot O^2$, забезпечується функціонуванням індукцйбельної NO-синтази (поряд з нітритредуктазним шляхом) [14]. У той же час, за небажаних умов (гіпоксія, дефіцит субстратів NO-синтазної реакції) NOS

генерує $\cdot O^2$ замість NO. Крім того, виявлено, що NOS здатні продукувати нітроксильний аніон, який бере участь у реакції з молекулярним киснем з утворенням пероксинітриту [11]. Тобто, рівень утворення пероксинітриту залежить від багатьох чинників і є важко прогнозованим.

Нами досліджено вплив скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну на сумарну активність NOS та концентрацію проміжного стабільного метаболіту NO – нітрит-іонів – у тканинах піднижньощелепних СЗ за умов МС (див. табл.).

Таблиця
Вплив L-селенометіоніну на показники окиснювальних процесів у тканинах СЗ умов відтворення МС (M±m, n=30)

Показники	Серії дослідів		
	Інтактні тварини	Відтворення МС	
		Контроль	+ L-селенометіонін
NOS, мкмоль NO^2 /г·хв.	4.12±0.22	8.51±0.38 *	6.18±0.38 **/
Вміст NO^2 , мкмоль/г	0.112±0.007	0.149±0.011 *	0.089±0.007 **/
Орнітиндекарбоксилаза, нмоль/г·хв.	275.4±10.2	205.3±9.8 *	257.9±15.6 **
Продукція $\cdot O^2$, нмоль/г·с			
НАДФН-залежними ЕТЛ	16.13±0.77	24.00±0.42 *	22.53±0.39 **/
НАДН-залежними ЕТЛ	16.80±0.33	25.73±0.27 *	23.07±0.16 **/
Концентрація ТБК-реактивів, мкмоль/кг	24.6±0.9	37.5±0.6 *	29.3±0.9 **/
Приріст концентрації ТБК-реактивів, мкмоль/кг	8.1±0.6	12.0±0.8 *	8.7±1.0 **
СОД, од. акт.	0.24±0.02	0.15±0.02*	0.22±0.02 **
Каталаза, мккатал/кг	2.79±0.21	1.80±0.16 *	2.72±0.18 **

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

При внесенні L-селенометіоніну за умов моделювання МС активність NOS і концентрація нітрит-іонів у тканинах піднижньощелепних СЗ зменшуються – відповідно на 27.4% ($p < 0.01$) та 40.3% ($p < 0.01$) у порівнянні з даними другої серії.

Звертає на себе увагу, що за цих умов у тканинах СЗ підвищується активність орнітиндекарбоксилази – на 25.6% ($p < 0,05$) у порівнянні з даними другої серії.

Введення білим щурам L-селенометіоніну за умов відтворення МС знижує вироблення $\cdot O^2$ НАДФН і НАДН-залежними ЕТЛ – відповідно на 6.1% ($p < 0.05$) та 10.3% ($p < 0.001$) у порівнянні з даними другої серії.

Обмеження продукції $\cdot O^2$ НАДФН-залежним (мікосомальним та NOS) і НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ при дії скевенджеру перо-

ксинітриту L-селенометіоніну, за нашою думкою, відображає здатність пероксинітриту порушувати у клітинах функціонування цих ланцюгів (інактивувати НАДН- та НАДФН-залежні оксидоредуктази, руйнувати FeS-кластери) [14,15]. У мітохондріях пероксинітрит пригнічує комплекси МФК I (НАДН-дегідрогеназа), МФК II (сукцинат-дегідрогеназа), МФК III (цитохром с редуктаза) та комплекс V (АТФ-синтаза), за допомогою різних механізмів, пов'язаних, зокрема, з окисненням цистеїнових і метіонінових залишків білків, нітруванням тирозину, ушкодженням FeS центрів. Нітрування пероксинітритом Mn-СОД

запобігає дисмутації $\cdot O^2$ з подальшою участю останнього в утворенні пероксинітриту. Тобто, цей механізм функціонує з ознаками «зачарованого» кола.

Введення тваринам L-селенометіоніну за умов відтворення МС достовірно зменшує кон-

центрацію ТБК-активних сполук – на 21.9% ($p < 0.001$). Величина приросту концентрації ТБК-активних сполук за час півторогодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині – знижується на 27.5% ($p < 0.05$) у порівнянні з даними другої серії.

Зниження величини останнього показника вказує на здатність L-селенометіоніну обмежувати зниження АО потенціалу, що також підтверджується достовірним підвищенням у тканинах активності АО ферментів. Так, при введенні тваринам L-селенометіоніну за умов експериментального МС активність СОД і каталази збільшується – відповідно на 46.7% ($p < 0.05$) та 51.1% ($p < 0.01$) у порівнянні з даними другої серії.

Висновки

1. Дисбаланс NO-синтазного та аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну у тканинах піднижньощелепних СЗ за умов експериментального МС є пероксинітрит-залежним процесом. Введення білим щурам скевенджеру пероксинітриду L-селенометіоніну за умов експериментального МС знижує у тканинах піднижньощелепних СЗ активність NO-синтази та концентрацію нітрит-іонів і підвищує активність ферменту аргіназного шляху метаболізму L-аргініну – орнітиндекарбоксілази.

2. Введення білим щурам скевенджеру пероксинітриду L-селенометіоніну за умов експериментального МС знижує у тканинах піднижньощелепних СЗ продукцію супероксидного аніон-радикала НАДФН-залежним (мікросомальним та NO-синтазою) і НАДН-залежним (мітохондріальним) електронно-транспортними ланцюгами.

3. Введення білим щурам скевенджеру пероксинітриду L-селенометіоніну за умов відтворення МС знижує у тканинах піднижньощелепних СЗ активність ПОЛ і підвищує стан АО захисту, що підтверджується зменшенням концентрації ТБК-активних сполук та їх приросту за час півторогодинної інкубації у прооксидатному буферному розчині, збільшенням активності СОД і каталази.

Література

1. Афанасьев В.В. Реактивно-дистрофические процессы слюнных желез (сиалоаденозы), протекающие на фоне метаболического синдрома / В.В. Афанасьев, Р.И. Стрюк, С.Э. Арутюнян [и др.] // Стоматология. – 2011. – Т. 90, № 4. – С. 49-53.
2. Коваленко О.В. Морфофункциональные зміни піднижньощелепної залози щурів за умов відтворення хронічного травматичного сіалоаденіту та введення L-селенометіоніну / О.В. Коваленко, Г.А. Єрошенко, В.О. Костенко // Світ мед. та біол. – 2012. – № 1. – С. 63-67.
3. Костенко В.А. NO- и пероксинитрит-зависимые изменения продукции супероксидного анион-радикала в органах крыс при экспериментальном метаболическом синдроме / В.А. Костенко, А.Н. Елинская, Л.И. Ляшенко [и др.] // Журн. Гродненск. гос. мед. ун-та. – 2014. – № 2. – С. 74-77.
4. Костенко В.О. Роль слюнных залоз у механізмах ауторегуляції рівня оксиду азоту в організмі ссавців та їх порушень / В.О. Костенко, А.М. Єлінська, Л.І. Ляшенко [та ін.] // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2013. – Т. 13, № 2. – С. 10-14.
5. Ляшенко Л.І. Роль NO-синтаз у механізмах порушень вільнорадикальних процесів у тканинах пародонта і слюнных залоз щурів за умов експериментального метаболічного синдрому / Л.І. Ляшенко, А.М. Єлінська, В.В. Талаш [та ін.] // Світ біол. та мед. – 2014. – № 2. – С. 139-142.
6. 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.
7. Стасюк О.А. Вплив скевенджерів пероксинітриду на окиснювальні процеси у тканинах слюнных залоз білих щурів за умов спільного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію / О.А. Стасюк, В.О. Костенко // Проблеми екології та медицини. – 2012. – Т. 16, № 5-6. – С. 30-33.
8. Храмов В.А. Простой метод определения активности орнитиндекарбоксылазы в смешанной слюне человека / В.А. Храмов. // Клини. лаб. диагностика. – 1997. – № 4. – С. 14-15.
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. Hevel J.M. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase / J.M. Hevel // J. Biol. Chem. – 1991. – V. 266, № 34. – P. 22789-22791.
11. Kirsch M. Formation of peroxynitrite from reaction of nitroxyl anion with molecular oxygen / M. Kirsch, H. de Groot // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277. – P. 13379-13388.
12. Klotz L.O. Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids / L.O. Klotz, H. Sies // Toxicol. Let. – 2003. – V. 140/141. – P. 125-132.
13. 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. – Vol. 284, №6. – P. H2053-H2060.
14. Pacher P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet // Physiol. Rev. – 2007. – V. 87. – P. 315-424.
15. Szabó S. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics / C. Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi // Nature Reviews. – 2007. – V. 6. – P. 662-680.

Реферат

РОЛЬ ПЕРОКСИНИТРИТА В МЕХАНИЗМАХ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗАХ ПРИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Елинская А.Н., Соловьева Н.В., Костенко В.А.

Ключевые слова: метаболический синдром, пероксинитрит, L-селенометионин, слюнные железы, NO-синтаза, пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система.

В эксперименте на 30 белых крысах исследована роль пероксинитрита в механизмах нарушений свободнорадикальных процессов в тканях поднижнечелюстных слюнных желез (СЖ) при моделировании метаболического синдрома (МС). Показано, что расстройства окислительного метаболизма и дисбаланс NO-синтазного и аргиназного путей метаболизма L-аргинина в СЖ в этих условиях являются пероксинитрит-зависимыми. Введение в ходе эксперимента крысам скевенджера пероксинитрита L-селенометионина снижает в СЖ активность NO-синтазы и концентрацию нитрит-ионов, повышает активность фермента неокислительного (аргиназного) пути метаболизма L-аргинина – орнитиндекарбоксылазы. При этом L-селенометионин снижает в тканях СЖ продукцию супероксидного анион-радикала НАДФН-зависимой (микросомальной и NO-синтазой) и НАДН-зависимой (митохондриальной) электронно-транспортными цепями, интенсивность пероксидного окисления липидов, повышает антиоксидантную защиту, активность супероксиддисмутазы и каталазы.

Summary

ROLE OF PEROXYNITRITE IN THE MECHANISMS OF FREE RADICAL PROCESSES IN SALIVARY GLANDS UNDER MODELED METABOLIC SYNDROME

Yelinska A.M., Solovyova N.V., Kostenko V.O.

Key words: metabolic syndrome, peroxynitrite, L-selenomethionine, salivary glands, NO-synthase, lipid peroxidation, antioxidant system.

The role of peroxynitrite in the mechanisms impairing free radical processes in the tissues of submandibular salivary gland (SG) under modeled metabolic syndrome (MS) was investigated in the experiment on 30 white rats. We have found out that oxidative metabolism disorder and imbalance of NO-synthase and arginase metabolic pathways of L-arginine in the SG under these conditions are peroxynitrite-dependent. The use of peroxynitrite scavenger (L-selenomethionine) in MS modeling inhibits NO-synthase activity, lowers nitrite ions concentration and increases the activity of ornithine decarboxylase, an enzyme of non-oxidative (arginase) pathway of L-arginine metabolism. L-selenomethionine introduction under experimental conditions reduces superoxide anion radical overproduction by NADPH-dependent (microsomal and NO-synthase) and NADH-dependent (mitochondrial) electron transport chains, lipid peroxidation intensity, improves antioxidant status and activity of superoxide dismutase and catalase.