

УДК 616.316–008–092.18–092.6

Єлінська А.М., Костенко В.О.

РОЛЬ ЯДЕРНОГО ФАКТОРА КВ У МЕХАНІЗМАХ ПОРУШЕНЬ ОКИСНЮВАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У СЛИННИХ ЗАЛОЗАХ ЗА УМОВ ВІДТВОРЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

У експерименті на 40 білих щурах досліджено роль ядерного фактора кВ (NF-кВ) у механізмах порушень окиснювальних процесів у тканинах піднижньощелепних слинних залоз (СЗ) при моделюванні метаболічного синдрому (МС). Показано, що введення інгібіторів NF-кВ JSH-23 – (4-метил-N-(3-фенілпропіл)бензол-1,2-діаміну) та метформіну гідрохлориду – за умов відтворення МС знижує сумарну активність NO-синтази та концентрацію продуктів окиснення NO – нітрит-йонів. При цьому JSH-23 виявляє здатність підвищувати активність ферменту неокисного (аргіназного) шляху метаболізму L-аргініну – орнітиндекарбоксилази, що не є характерним при призначенні метформіну гідрохлориду. Введення щурам як JSH-23, так і метформіну гідрохлориду, за умов експерименту знижує у СЗ продукцію супероксидного аніон-радикала НАДФН-залежним (мікросомальним та NO-синтазою) і НАДН-залежним (мітохондріальним) електронно-транспортними ланцюгами, утворення вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів без істотних змін антиоксидантного потенціалу та активності антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази та каталази).

Ключові слова: метаболічний синдром, ядерний фактор кВ, 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).

У пацієнтів з ознаками метаболічного синдрому (МС) досить поширеними є реактивно-дистрофічні ураження слинних залоз (СЗ) [1]. Автори розглядають ці порушення як компонент єдиного патологічного процесу, загальним патогенетичним механізмом якого є інсулінорезистентність (ІР).

Нещодавно висунуто припущення, що загальною ланкою, яка об'єднує всі компоненти МС та призводить до ІР, ліпотоксичності, системної гіперцитокінемії та артеріальної гіпертензії, є порушення сигналізації за участю ядерного фактора кВ (NF-кВ) [2].

У більшості клітин цей фактор знаходиться в цитоплазмі в неактивному стані внаслідок зв'язування з інгібіторними білками класу ІкВ. У процесі активації NF-кВ під дією різноманітних індукторів відбувається фосфорилування ІкВ, після чого він убіквітинується і гідролізується протеїназним комплексом, а вільний NF-кВ транслокується в ядро, де зв'язується з відповідними ДНК-послідовностями і впливає на транскрипцію низки генів [14].

Існує багато протиріч у результатах визначення участі NF-кВ у розвитку патології, пов'язаних як з відсутністю стандартного методу визначення активності NF-кВ, так і з відмінностями в інтерпретації результатів, отриманих одним і тим самим методом. Тому найбільш точні результати ефектів активації NF-кВ можливо отримати шляхом застосування у експерименті методу його «виключення», наприклад, при застосуванні інгібіторів активації NF-кВ. Так, інгібітор активації NF-кВ ІІ – JSH-23 – порушує процес ядерної транслокації цього чинника [13].

В останні роки було виявлено здатність відомого протидіабетичного лікарського засобу групи похідних бігуанідів – метформіну (1,1-

диметилбігуанід гідрохлориду) у концентрації 100-1000 мкмоль/л пригнічувати фосфорилування ІкВ-кінази та деградацію ІкВ α в ендотеліальних клітинах пупкової вени людини. Цей ефект пов'язують зі здатністю метформіну збільшувати фосфорилування АМФ-активованої кінази за участю фосфатидилінозитол-3-кінази [9,11]. Така здатність метформіну ставить його в ряд препаратів – інгібіторів NF-кВ [3]. Так, включення метформіну в комплексну терапію хворих МС і ІХС призводить до блокади активації NF-кВ під дією ендогенних прозапальних цитокинів (наприкладі CD40+-мононуклеарів периферичної крові) шляхом стабілізації комплексів NF-кВ/ІкВ за рахунок пригнічення фосфорилування ІкВ-кінази. Цей ефект метформіну, на думку авторів, перериває «зачароване» коло у патогенезі МС, впливаючи на його ключову ланку – активацію NF-кВ.

Проте роль NF-кВ та його інгібіторів на метаболізм і функції СЗ при розвитку МС не досліджувалася. Розв'язання цього питання є важливим для розширення арсеналу засобів попередження та лікування розладів СЗ та інших залежних від їх стану систем при дії факторів-ініціаторів розвитку МС.

Мета роботи

Вивчення ролі NF-кВ у механізмах порушень окиснювальних процесів у тканинах піднижньощелепних СЗ щурів за умов моделювання МС.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження були проведені на 40 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-230 г у 4-х серіях дослідів: у першій необхідні показники вивчали у інтактних тварин (контрольна серія), у другій – після моделювання МС, у третій і четвертій – протягом відтворення МС щурам внутріш-

ньоочеревино вводи́ли відповідно інгібітор активації NF-κB II – JSH-23 (4-метил-N-(3-фенілпропіл)бензол-1,2-діамін) виробництва «Santa Cruz Biotechnology» (ФРН) у дозі 1 мг/кг маси тварини [13], 2 рази на тиждень, та метформіну гідрохлорид виробництва «Wanbury Limited» (Індія) у дозі 200 мг/кг маси тварини [12], через день. Тварин декапітували під ефірним наркозом.

Для моделювання МС гризунам протягом двох місяців призначали 20% водний розчин фруктози для пиття та "дієту західного типу" [4].

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 – орнітиндекарбоксілази – визначали за зниженням вмісту орнітину в інкубаційному середовищі [7].

Утворення супероксидного аніон-радикала (O_2^-) у тканинах піднижньощелепних СЗ оцінювали при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм з такими індукторами: НАДН – для оцінки

продукції O_2^- мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом (ЕТЛ); НАДФН – для

оцінки продукції O_2^- мікросомальним ЕТЛ та NO-синтазою [8]. 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

Введення як JSH-23, так і метформіну гідрохлориду, за умов моделювання МС (див. табл.) викликає достовірне зменшення сумарної активності NO-синтази, що відповідно на 35.5% ($p < 0.001$) та 20.2% ($p < 0.05$) поступається даним другої серії. Ці зміни, очевидно, пов'язані з пригніченням при застосуванні названих засобів NF-κB-залежної активації транскрипції гена індукбельної NO-синтази (iNOS) [14].

Таблиця
Вплив інгібіторів NF-κB на показники окиснювального обміну у тканинах піднижньощелепних СЗ умов відтворення МС ($M \pm t$, $n=40$)

Показники	Серії дослідів			
	Інтактні тварини	Відтворення МС		
		Контроль	+ JSH-23	+ метформін
NO-синтаза, $\mu\text{моль NO}_2^- / \text{г} \cdot \text{хв.}$	4.12±0.22	8.51±0.38 *	5.49±0.28 **	6.79±0.47 **
Вміст NO_2^- , $\mu\text{моль/г}$	0.112±0.007	0.149±0.011 *	0.095±0.006 **	0.095±0.006 **
Орнітиндекарбоксілаза, $\mu\text{моль/г} \cdot \text{хв.}$	275.4±10.2	205.3±9.8 *	245.6±13.3 **	240.4±17.9
Продукція O_2^- , $\mu\text{моль/г} \cdot \text{с}$				
НАДФН-залежними ЕТЛ	16.13±0.77	24.00±0.42 *	18.53±0.57 **	19.07±0.58 **
НАДН-залежними ЕТЛ	16.80±0.33	25.73±0.27 *	18.80±0.39 **	19.20±0.33 **
Концентрація ТБК-реактантів, $\mu\text{моль/кг}$	24.6±0.9	37.5±0.6 *	32.2±0.6 **	34.1±1.2 **
Приріст концентрації ТБК-реактантів, $\mu\text{моль/кг}$	8.1±0.6	12.0±0.8 *	9.6±0.8	9.1±1.8
СОД, од. акт.	0.24±0.02	0.15±0.02*	19.0±0.04	0.18±0.04
Каталаза, мккатал/кг	2.79±0.21	1.80±0.16 *	1.87±0.25 *	1.67±0.27 *

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

Концентрація нітрит-йонів поступається результатам другої серії при застосуванні як JSH-23, так і метформіну гідрохлориду, – на 36.2% ($p < 0.01$).

При введенні JSH-23 за умов експерименту в тканинах СЗ підвищується активність орнітиндекарбоксілази – на 19.6% ($p < 0.05$) у порівнянні з даними другої серії. У той же час призначення метформіну гідрохлориду не призводить до достовірних змін активності цього ферменту.

Активация NF-κB може неоднозначно позна-

чатися на рівні O_2^- у тканинах. Це пов'язано з тим, що з одного боку, під впливом низки фізичних і хімічних чинників (радіації, ультрафіолетового опромінення, підвищеного атмосферного тиску, окиснювального стресу, присутності форболових ефірів тощо), а також інфекційних агентів і сигнальних молекул (гормонів, цитокінів, ростових факторів, цАМФ тощо) NF-κB впливає на гени, які задіяні як в експресії біомолекул, здат-

них до продукції O_2 або стимулюють цей процес (iNOS, інтерлейкінів-1 β , -6, -12, -18, факторів некрозу пухлин- α , - β), так і таких, що обмежують

кількість O_2 у реакційному середовищі (СОД, церулоплазмін) [5,15,16]. Таким чином, вплив

активації NF- κ B на генерацію рівні O_2 за умов патології прогнозувати досить складно.

Застосування JSH-23 і метформіну гідрохлориду за цих умов істотно знижує вироблення

O_2 НАДФН-залежними ЕТЛ – відповідно на 22.8% ($p < 0.001$) та 20.5% ($p < 0.001$), НАДФН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ – на 26.9% ($p < 0.001$) та 25.4% ($p < 0.001$) у порівнянні з даними другої серії.

Введення JSH-23 і метформіну гідрохлориду за умов моделювання МС знижує концентрацію ТБК-активних сполук – відповідно на 14.1% ($p < 0.001$) та 9.1% ($p < 0.05$) у порівнянні з результатом другої серії. Це свідчить про те, що інтенсивність ПОЛ у тканинах піднижньощелепних СЗ за умов МС залежить від функціональної активності NF- κ B.

Нещодавно було показано, що альдегіди, що утворюються у процесі ПОЛ (4-гідрокси-транс-2-ноненаль, акролеїн та головний компонент ТБК-активних сполук – малоновый діальдегід), здатні регулювати redox-чутливі фактори транскрипції – NF- κ B і AP-1 – через відповідні протеїнкіназні каскади [17]. Таким чином, у цьому випадку ми спостерігаємо формування у патогенезі вільнорадикального ушкодження тканин своєрідного «зачарованого» кола.

Проте відсутність достовірних змін величин приросту концентрації ТБК-активних сполук за час інкубації у прооксидантному буферному розчині при призначенні інгібіторів активації NF- κ B свідчить про відсутність NF- κ B-залежних зрушень АО потенціалу. Цей факт також підтверджує відсутність достовірних змін величин активності АО ферментів – СОД і каталази – у тканинах піднижньощелепних СЗ за умов моделювання МС та застосуванні JSH-23 та метформіну гідрохлориду.

Висновки

1. Введення як інгібітора ядерної транслокації NF- κ B JSH-23, так і метформіну гідрохлориду за умов відтворення МС знижує сумарну активність NO-синтаз та концентрацію продуктів окиснення NO – нітрит-йонів. За цих умов JSH-23 виявляє здатність підвищувати активність ферменту аргіназного шляху метаболізму L-аргініну – орнітиндекарбоксилази, що не є характерним при призначенні метформіну гідрохлориду.

2. Введення білим щурам як інгібітора ядерної транслокації NF- κ B JSH-23, так і метформіну гідрохлориду за умов відтворення МС знижує у

тканинах піднижньощелепних СЗ продукцію супероксидного аніон-радикала НАДФН-залежним (мікросомальним та NO-синтазою) і НАДФН-залежним (мітохондріальним) електронно-транспортними ланцюгами;

3. Введення білим щурам як інгібітора ядерної транслокації NF- κ B JSH-23, так і метформіну гідрохлориду, за умов відтворення МС знижує у тканинах піднижньощелепних СЗ утворення вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ТБК-активних сполук) без істотних змін антиоксидантного потенціалу та активності антиоксидантних ферментів (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. Кайдашев І.П. Активация NF- κ B при метаболическом синдроме / І.П. Кайдашев // Физиол. журн. – 2012. – Т. 58, № 1. – С. 93-101.
3. Лавренко А.В. Влияние метформина на продукцию провоспалительных цитокинов и инсулинорезистентность (NF- κ B-сигнальный путь) / А.В. Лавренко, Н.П. Куценко, Л.А. Куценко [и др.] // Пробл. эндокринологии. – 2012. – № 2. – С. 25-28.
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. Єліньська, В.В. Талаш [та ін.] // Світ біол. та мед. – 2014. – № 2. – С. 139-142.
5. Маянский А.Н. Нуклеарный фактор- κ B и воспаление / А.Н. Маянский, Н.А. Маянский, М.И. Заславская // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6. – № 2. – С. 3-9.
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. Храмов В.А. Простой метод определения активности орнитиндекарбоксилазы в смешанной слюне человека / В.А. Храмов. // Клини. лаб. диагностика. – 1997. – № 4. – С. 14-15.
8. 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.
9. Hattori K. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappa B activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells / K. Hattori, K. Suzuki, S. Horton [et al.] // Hypertension. – 2006. – V. 47, № 6. – P. 1183-1186.
10. Hevel J.M. Purification of the inducible murene macrophage nitric oxide synthase / J.M. Hevel // J. Biol. Chem. – 1991. – V. 266, № 34. – P. 22789-22791.
11. Huang Y.L. Metformin inhibits TNF-alpha-induced I kappa B kinase phosphorylation, I kappa B alpha degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3-dependent AMPK phosphorylation / Y.L. Huang, S.H. Chiang, C.H. Hsueh [et al.] // Int. J. Cardiol. – 2009. – V. 134, № 2. – P. 169-175.
12. Kravchuk E. The effect of metformin on the myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in the rat model of diabetes mellitus type II / E. Kravchuk, E. Grineva, A. Bairamov [et al.] // Exp Diabetes Res. – 2011. – doi: 10.1155/2011/907496.
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. Napetschnig J. Molecular basis of NF- κ B signaling / J. Napetschnig, H. Wu // Ann. Rev. Biophys. – 2013. – V. 42. – P. 443-468.
15. Persichini T. Interleukin-1 β induces ceruloplasmin and ferroportin-1 gene expression via MAP kinases and C/EBP β , AP-1, and NF- κ B activation / T. Persichini, N. Maio, M.C. di Patti [et al.] // Neurosci Lett. – 2010. – V. 484, № 2. – P. 133-138.
16. Siomek A. NF- κ B signaling pathway and free radical impact / A. Siomek // Acta Biochim. Pol. – 2012. – V. 59, № 3. – P. 323-331.
17. Yadav U.C. Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes / U.C. Yadav, K.V. Ramana // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2013. – V. 2013. – doi: 10.1155/2013/690545.

Реферат

РОЛЬ ЯДЕРНОГО ФАКТОРА κB В МЕХАНИЗМАХ НАРУШЕНИЙ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗАХ ПРИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Елинская А.Н., Костенко В.А.

Ключевые слова: метаболический синдром, ядерный фактор κB , слюнные железы, NO-синтаза, пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система

В эксперименте на 40 белых крысах исследована роль ядерного фактора κB (NF- κB) в механизмах нарушений окислительных процессов в тканях поднижнечелюстных слюнных желез (СЖ) при моделировании метаболического синдрома (МС). Показано, что введение ингибиторов NF- κB – JSH-23 (4-метил-N-(3-фенилпропил) бензол-1,2-диамина) и метформина гидрохлорида – в условиях воспроизведения МС снижает суммарную активность NO-синтаз и концентрацию продуктов окисления NO – нитрит-ионов. При этом JSH-23 проявляет способность повышать активность фермента неокислительного (аргиназного) пути метаболизма L-аргинина – орнитиндекарбоксилазы, что не характерно при назначении метформина гидрохлорида. Введение крысам как JSH-23, так и метформина гидрохлорида в условиях эксперимента снижает в СЖ продукцию супероксидного анион-радикала НАДФН-зависимой (микросомальной и NO-синтазой) и НАДН-зависимой (митохондриальным) электронно-транспортными цепями, образование вторичных продуктов пероксидного окисления липидов без существенных изменений антиоксидантного потенциала и активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы и каталазы).

Summary

ROLE OF NUCLEAR FACTOR κB IN MECHANISMS OF OXIDATION DISTURBANCES IN SALIVARY GLANDS UNDER MODELED METABOLIC SYNDROME

Yelinska A.M., Kostenko V.O.

Key words: metabolic syndrome, nuclear factor κB , salivary glands, NO-synthase, lipid peroxidation, antioxidant system.

The role of nuclear factor κB (NF- κB) in the mechanisms impairing oxidative processes in the tissues of submandibular salivary glands (SSG) under modeled metabolic syndrome (MS) was investigated on 40 white rats. We have found out that administration of NF- κB inhibitors – JSH-23 (4-methyl-N-(3-phenylpropyl)benzene-1,2-diamine) and metformin hydrochloride – under MS reduces total NO-synthase activity and concentration of by-pass products of NO oxidation as nitrite ions. At the same time JSH-23 shows the ability to increase the activity of ornithine decarboxylase, an enzyme of non-oxidative (arginase) pathway of L-arginine metabolism, that is not typical for metformin hydrochloride. JSH-23 and metformin hydrochloride administration reduces production of superoxide anion radical by NADPH-dependent (microsomal and NOS) and NADH-dependent (mitochondrial) electron transport chains, limits the lipid peroxidation secondary products formation without significant changes in antioxidant capacity and the antioxidant enzymes activity (superoxide dismutase and catalase).