

УДК 616.316-001-092.9:547.271

Богданов О.В., Костенко В.О.

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

ВПЛИВ ІНГІБІТОРА ЯДЕРНОЇ ТРАНСЛОКАЦІЇ ТРАНСКРИПЦІЙНОГО ФАКТОРА κB НА ОКИСНИЙ МЕТАБОЛІЗМ У ТКАНИНАХ ПАРОДОНТА ЩУРІВ ЗА УМОВ ПОЄДНАНОГО НАДЛИШКОВОГО НАДХОДЖЕННЯ НІТРАТУ ТА ФТОРИДУ НАТРІЮ

У експерименті на 30 білих щурах досліджено вплив інгібітора активації NF- κB – JSH-23 (4-метил-N-(3-фенілпропіл) бензол-1,2-діаміну) – на стан окисного (NO-синтазного) шляху метаболізму L-аргініну, рівень продукції супероксидного аніон-радикала, стан пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), антиоксидантного (АО) захисту в м'яких тканинах пародонта за умов поєднаної токсичної дії нітрату та фториду натрію. Виявлено, що введення JSH-23 за умов експерименту зменшує в м'яких тканинах пародонта сумарну активність NO-синтаз, збільшує активність орнітиндекарбоксилази, знижує у них продукцію супероксидного аніон-радикала НАДФН- і НАДН-залежними електронно-транспортними ланцюгами, а також НАДФН-оксидазою лейкоцитів, обмежує активність ПОЛ, підвищує АО потенціал.

Ключові слова: нітрати, фториди, ядерний фактор κB , NO-синтаза, супероксидний аніон-радикал, пероксидне окиснення ліпідів, антиоксидантна система, пародонт.

Робота є фрагментом НДР «Роль активних форм кисню, системи оксиду азоту та транскрипційних факторів у механізмах патологічного системогенезу» (№ держреєстрації 0114U004941).

До цього часу нез'ясованими залишаються питання поєднаної дії нітратів і фторидів, у тому числі на тканини пародонта. З одного боку, біологічні ефекти продуктів біотрансформації нітратів – нітрит-йонів, оксиду азоту (NO) – подібні до таких при дії фторидів: пригнічення анаеробного гліколізу, цитохромів, ферментів антиоксидантного (АО) захисту, збільшення утворення активних форм кисню та азоту, активація транскрипційного ядерного фактора κB (NF- κB), що дозволяє сподіватися на можливість певної синергічної дії наведених сполук. Але існують істотні відмінності у реалізації ефектів фторидів та неорганічних нітросполук [4, 10].

Показано, що процеси вільнорадикального та гіпоксичного некробіозу у тканинах пародонта при хронічній інтоксикації нітратом натрію у значній мірі пов'язані з функціональною активністю індукцибельної NO-синтази (iNOS) [6]. Нещодавно показано роль NF- κB в експресії генів iNOS, тому активність цієї ізоформи знижується при пригніченні транскрипції мРНК iNOS або порушенні ядерної транслокації NF- κB [15, 16].

Відома здатність фторидів активувати конститутивні та індукцибельну NOS [11], пригнічувати альтернативний щодо NOS – аргіназний (неокисний) шлях метаболізму L-аргініну [1].

Таким чином, значне погіршення екологічної ситуації, можливість поєднаної дії на організм людини нітратів і фторидів, відсутність даних щодо механізмів розвитку за цих умов метаболічних і функціональних змін у тканинах пародонта, можливість NF- κB -залежного порушення механізму авторегуляції концентрації NO та утворення токсичних активних форм кисню та азоту (АФК / АФА), зумовлює актуальність експериментального дослідження у цьому напрямку.

Метою роботи було вивчення впливу інгібітора активації NF- κB – JSH-23 – на стан окисного (NO-синтазного) шляху метаболізму L-аргініну,

рівень продукції супероксидного аніон-радикала, стан пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), АО захисту в м'яких тканинах пародонта щурів за умов поєднаної токсичної дії нітрату та фториду натрію.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження були проведені на 30 білих щурах лінії Вістар масою 180-200 г у таких серіях дослідів: у першій – необхідні показники вивчали у інтактних тварин (контрольна серія), у другій – після поєднаного введення нітрату натрію (200 мг/кг маси тіла) та фториду натрію (10 мг/кг маси тіла) протягом 30 діб, у третій – протягом періоду 30-денної поєднаної дії нітрату та фториду натрію тваринам внутрішньоочередово вводили інгібітор ядерної транслокації NF- κB JSH-23 (4-метил-N-(3-фенілпропіл) бензол-1,2-діамін, "Santa Cruz Biotechnology", ФРН) у дозі 1 мг/кг 2 рази на тиждень [14]. Евтаназію тварин виконували методом дислокації шийних хребців під ефірним наркозом.

Активність NOS визначали за різницею концентрації нітрит-йонів (NO^2) до та після інкубації гомогенату м'яких тканин пародонта 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 [12]. Вміст пероксинітрит-йонів проводили з використанням реакції з йодидом калію в буферизованому середовищі при рН=7,0 спектрофотометрично за поглинанням на довжині хвилі 355 нм [9].

Загальну аргіназну активність визначали в гомогенаті м'яких тканин пародонта спектрофотометрично за приростом концентрації L-орнітину з використанням нінгідринного реактиву [7]. Активність орнітиндекарбоксилази визна-

чали за зниженням вмісту орнітину в інкубаційному середовищі методом Chinard у модифікації В.А. Храмова [8].

Утворення супероксидного аніон-радикала (САР) у гомогенаті тканин пародонта оцінювали при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм з індукторами у вигляді НАДН, НАДФН і бактеріальними ліпополісахаридами (пірогенал) [3].

Рівень ПОЛ у тканинах оцінювали за утворенням у реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними сполуками забарвленого триметинового комплексу [2]. Активність АО системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час 1,5-годинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю каталази [2]. Отримані дані обробляли варіаційно-статистичним методом з використанням критерію Ст'юдента.

Показники	Серії дослідів		
	Інтактні тварини	Поєднане введення нітрату та фториду натрію	
		Контроль	+ JSH-23
NOS, мкмоль NO ² /г·хв.	4.59±0.09	7.31±0.28*	4.50±0.16 **
Вміст NO ² , мкмоль/г	0.08±0.01	0.13±0.01*	0.10±0.01
Пероксинітрит, мкмоль/г	0.95±0.04	1.31±0.10*	1.01±0.11
Аргіназа, мкмоль/г·білка	1.70±0.23	0.62±0.17 *	1.54±0.40
Орнітиндекарбоксилаза, нмоль/г·хв.	225.4±14.4	132.5±23.7 *	241.9±14.1 **
Продукція САР, нмоль/г·с			
НАДФН-залежні ЕТЛ	20.11±1.02	38.22±1.21*	27.13±1.12 */**
НАДН-залежний ЕТЛ	22.52±1.01	38.99±1.01*	24.75±0.78 **
НАДФН-оксидаза лейкоцитів	1.08±0.16	1.98±0.07*	1.44±0.12 **
Концентрація ТБК-реактантів до інкубації	18.89±3.49	45.87±2.10*	21.73±3.30 **
після інкубації	36.35±2.75	76.15±1.06*	37.93±1.82 **
приріст	17.45±1.74	30.29±2.74*	16.20±4.94 **
Каталаза, мкат/г	0.28±0.02	0.15±0.02*	0.20±0.05

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

Отримані результати узгоджуються з тим фактом, що за участю NF-κB відбувається експресія гену iNOS [15].

Концентрація нітрит-йонів і пероксинітриту за умов бінарної інтоксикації нітратом і фторидом натрію суттєво не відрізняється від даних першої та другої серій.

Застосування JSH-23 за умов експерименту збільшує активність орнітиндекарбоксилази – до 241,9±14,1 нмоль/г·хв. (на 82,6%, p<0,01) у порівнянні з даними другої серії, проте суттєво не впливає на активність аргінази.

Введення щурам JSH-23 за умов відтворення поєднаної 30-денної інтоксикації нітратом і фторидом натрію зменшує у м'яких тканинах пародонта вироблення супероксидного аніон-радикала НАДФН-залежними ЕТЛ (мікросомальним і NOS) – до 27,13±1,12 нмоль/г·с (на 29,0%, p<0,001), НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ – до 24,75±0,78 нмоль/г·с (на 36,5%, p<0,001), НАДФН-оксидазою лейкоцитів – до 1,44±0,12 нмоль/г·с (на 27,3%, p<0,01) у порівнянні з даними другої серії.

NF-κB-опосередковане вироблення у ткани-

Результати дослідження та їх обговорення

Введення щурам JSH-23 за умов відтворення поєднаної 30-денної інтоксикації нітратом і фторидом натрію суттєво позначається на показниках системи NO у м'яких тканинах пародонта (див. табл.). Так, сумарна активність NOS знижується – відповідно до 4,50±0,16 мкмоль NO² /г·хв., тобто на 38,4% (p<0,001) у порівнянні з даними другої серії.

Таблиця

Вплив інгібітора ядерної транслокації NF-κB на окисний метаболізм у тканинах пародонта за умов поєднаного надходження нітрату та фториду натрію (M±m, n=30)

нах пародонта АФК / АФА за умов бінарної хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію дає підстави для активації ПОЛ.

Введення JSH-23 за умов експерименту зменшує у м'яких тканинах пародонта концентрацію ТБК-активних сполук до та після 1,5-годинної інкубації гомогенату у залізоаскорбатному буферному розчині – відповідно до 21,73±3,30 мкмоль/кг (на 52,6%, p<0,001) та 37,93±1,82 (на 50,2%, p<0,001) у порівнянні з даними другої серії.

Застосування JSH-23 за наведених умов супроводжується зниженням приросту концентрації ТБК-активних речовин за час інкубації – до 16,20±4,94 мкмоль/кг (на 46,5%, p<0,05) у порівнянні з даними другої серії, що вказує на суттєве підвищення АО потенціалу в м'яких тканинах пародонта. Проте введення JSH-23 істотно не впливає на активність каталази у м'яких тканинах пародонта у порівнянні з даними другої серії.

JSH-23, як відомо, порушує транслокацію NF-κB у ядро [14], де останній впливає на транскрипцію багатьох генів, експресія яких викликає

швидку індукцію прозапальних чинників – цитокинів (інтерлейкіни-1 β , -2, -6, -8, -12, фактор некрозу пухлини- α) та інших молекул: iNOS, циклооксигенази-2, ICAM-1, VCAM-1, E-селектину, білків комплементу, білків-контролерів клітинного циклу і апоптозу (p53, циклін D1, c-IAP1, c-IAP2, FasL, Bcl-2, TRAF-1, TRAF-2 тощо) [13].

Таким чином, введення білим щурам інгібітора активації NF- κ B JSH-23 при моделюванні бінарної хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію зменшує в м'яких тканинах пародонта сумарну активність NOS, збільшує активність орнітиндекарбоксилази, знижує у них продукцію супероксидного аніон-радикала НАДФН- і НАДН-залежними електронно-транспортними ланцюгами, а також НАДФН-оксидазою лейкоцитів, обмежує активність пероксидного окиснення ліпідів, підвищує антиоксидантний потенціал.

Література

1. Геворкян М.Л. Строение активного центра печеночной аргиназы млекопитающих. II. Субстраты и ингибиторы / М.Л. Геворкян, М.А. Давтян // Биолог. журн. Армении. – 2008. – №4. – С. 16-26.
2. 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.
3. Костенко В.О. Продукція супероксидного аніон-радикала та оксиду азоту у тканині нирок після хірургічного втручання / В.О. Костенко, О.І. Цебржинський // Фізіол. журн. – 2000. – Т.46, №5. – С.56-62.
4. Костенко В.О. Роль слинних 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. 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 медицини та біології. – 2012. – № 4. – С. 101-104.
6. Фартушна А.М. NO-залежні зміни окиснювального метаболізму у тканинах ясен білих щурів за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / А.М. Фартушна, В.О. Костенко // Пробл. екол. та мед. – 2012. – Т. 16, № 3-4. – С. 48-51.
7. Храмов В.А. Модификация метода определения орнитина по Chinard и ее использование для количественного определения сывороточной аргиназы / В.А. Храмов, Г.Г. Листопад // Лабораторное дело. – 1973. – № 10. – С. 591-592.
8. Храмов В.А. Простой метод определения активности орнитиндекарбоксилазы в смешанной слюне человека / В.А. Храмов // Клини. лабор. диагн. – 1997. – №4. – С. 14-15.
9. Шрайбман Г.Н. Спектрофотометрические методики определения пероксинитрита и нитрита / Г.Н. Шрайбман, Е.П. Дягилева, А.В. Скибина // Вестн. КемГУ. – 2011. – №1. – С. 200-206.
10. Agalakova N.I. Molecular mechanisms of cytotoxicity and apoptosis induced by inorganic fluoride / N.I. Agalakova, G.P. Gusev. – ISRN Cell Biology. – 2012. – V. 2012. – Art. 403835, 16 pages.
11. Chirumari K. Dose-dependent effects of fluoride on neurochemical milieu in the hippocampus and neocortex of rat brain / K. Chirumari, P.K. Reddy // Fluoride. – 2007. – V. 40, №2. – P. 101-110.
12. 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.
13. Jimi E. NF- κ B signaling pathways and the future perspectives of bone disease therapy using selective inhibitors of NF- κ B / Jimi E., Fukushima H. // Clin. Calcium. – 2016. – V.26, №2. – P. 298-304.
14. 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.
15. Rahman A. Blocking NF- κ B: an inflammatory issue / A. Rahman, F. Fazal // Proc. Am. Thorac. Soc. – 2011. – V. 8, № 6. – P. 497-503.
16. Singh A.K. High oxidative stress adversely affects NF κ B mediated induction of inducible nitric oxide synthase in human neutrophils: Implications in chronic myeloid leukemia / Singh A.K., Awasthi D., Dubey M. [et al.] // Nitric Oxide. – 2016. – V.58. – P. 28-41.

Реферат

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ЯДЕРНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА κ B НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ В ТКАНЯХ ПАРОДОНТА КРЫС В УСЛОВИЯХ СОЧЕТАННОГО ИЗБЫТОЧНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ НИТРАТА И ФТОРИДА НАТРИЯ

Богданов А.В., Костенко В.А.

Ключевые слова: нитраты, фториды, ядерный фактор κ B, NO-синтаза, супероксидный анион-радикал, пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система, пародонт.

В эксперименте на 30 белых крысах исследовано влияние ингибитора активации NF- κ B - JSH-23 (4-метил-N-(3-фенилпропил) бензол-1,2-диамина) – на состояние окислительного (NO-синтазного) пути метаболизма L-аргинина, уровень продукции супероксидного анион-радикала, состояние пероксидного окисления липидов (ПОЛ), антиоксидантной (АО) защиты в мягких тканях пародонта в условиях сочетанного токсического действия нитрата и фторида натрия. Выявлено, что введение JSH-23 в условиях эксперимента уменьшает в мягких тканях пародонта суммарную активность NO-синтазы, увеличивает активность орнитиндекарбоксилазы, снижает в них продукцию супероксидного анион-радикала НАДФН- и НАДН-зависимыми электронно-транспортными цепями, а также НАДФН-оксидазой лейкоцитов, ограничивает активность ПОЛ, повышает АО потенциал.

Summary

EFFECT OF INHIBITOR OF NUCLEAR TRANSLOCATION OF TRANSCRIPTION FACTOR κ B ON OXIDATIVE METABOLISM IN PERIODONTAL TISSUES OF RATS UNDER EXCESSIVE COMBINED SODIUM NITRATE AND FLUORIDE INTAKE

Bogdanov A.V., Kostenko V.A.

Key words: nitrates, fluorides, nuclear factor κ B, NO-synthase, superoxide anion radical, lipid peroxidation, antioxidant system, periodontium.

This study was aimed to study the effects of NF- κ B activation inhibitor - JSH-23 (4-methyl-N-(3-phenylpropyl) benzene-1,2-diamine) on oxidative (NO-synthase) pathway of L-arginine metabolism, the level of superoxide anion radical production, lipid peroxidation (LPO) and antioxidant (AO) protection in the soft tissues of periodontium under excessive combined sodium nitrate and fluoride intake. The study was carried out 30 white rats. It has been found out the administration of JSH-23 in experimental conditions decreases the total activity of NO-synthase, increases ornithine decarboxylase activity, reduces superoxide anion radical production by NADPH- and NADH-dependent electron transport chains and leukocyte NADPH oxidase, limits LPO activity, enhances AO potential in the soft tissues of periodontium.