

УДК 616.314.18-002.4-031.81-036.13-041

В.В. ЩЕРБА, М.М. КОРДА, д. мед. н., професор
/Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського/

Вплив інгібіторів NO-синтази на експресію цитокінів і стан сполучної тканини при пародонтиті на фоні супутнього хронічного гепатиту

Резюме

Влияние ингибиторов NO-синтазы на экспрессию цитокинов и состояние соединительной ткани при пародонтите на фоне сопутствующего хронического гепатита

В.В. Щерба, М.М. Корда

Целью работы было исследование влияния неселективного ингибитора NO-синтазы N-нитро-L-аргинина и селективного ингибитора iNOS 1400W на цитокиновый профиль и особенности метаболизма соединительной ткани у экспериментальных животных с липополисахаридным пародонтитом, развивающимся на фоне хронического гепатита. Показано, что N-нитро-L-аргинин и 1400W снижают продукцию провоспалительных цитокинов (ФНО- α и ИЛ-1 β) при пародонтите на фоне гепатита. Высокоспецифический ингибитор iNOS 1400W также эффективно предупреждает деструкцию соединительной ткани (подавляет интенсивность коллагенолиза, скорость распада протеогликанов и гликопротеинов, снижает уровень С-реактивного белка в сыворотке крови). Сделан вывод, что селективное ингибирование индуцибельной формы NO-синтазы может быть перспективным методом лечения больных пародонтитом, развивающимся на фоне гепатита.

Ключевые слова: пародонтит, гепатит, цитокины, соединительная ткань, ингибиторы NO-синтазы

Summary

Effect of NO-synthase Inhibitors on the Cytokines Expression and the State of Connective Tissue in Periodontitis on the Background of Chronic Hepatitis

V.V. Shcherba, M.M. Korda

The purpose of the study was to investigate the effect of non-selective NO-synthase inhibitor N-nitro-L-arginine and selective iNOS inhibitor 1400W on the cytokine profile and connective tissue metabolism in experimental animals with lipopolysaccharide periodontitis developing on a chronic hepatitis background. It has been shown that both N-nitro-L-arginine and 1400W reduce production of proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) in periodontitis on the hepatitis background. A highly specific iNOS inhibitor 1400W effectively prevents the connective tissue degradation (suppresses the intensity of collagenolysis as well as the rate of proteoglycans and glycoproteins decomposition, and decreases the level of C-reactive protein in the serum). It has been concluded that the selective inhibition of the inducible form of NO-synthase might be a promising treatment method for patients with periodontal disease that develops on the hepatitis background.

Key words: periodontitis, hepatitis, cytokines, connective tissue, NO-synthase inhibitors

Під час запалення компоненти бактеріальної клітинної стінки (особливо ліпополісахарид – ЛПС) і прозапальні цитокіни (головним чином TNF- α , IL-1 і інтерферон-гамма – IFN- γ), що виробляються ураженими тканинами, стимулюють вироблення оксиду азоту (NO) індукцибельною формою синтази оксиду азоту (iNOS) в різних типах клітин [1, 2, 3]. У ряді робіт було встановлено участь NO в патогенезі пародонтиту [1, 4, 5, 6]. Було показано, що бактерії *Porphyromonas gingivalis*, які є одними з основних пародонтопатогенних мікроорганізмів, здатні індукувати утворення NO індукцибельною NO-синтазою як *in vitro* [7], так і *in vivo* при повторній оральній інюкуляції мишам [8].

Існує тісний взаємозв'язок між захворюваннями пародонта і захворюваннями печінки [9, 10]. Раніше нами була продемон-

стрована роль NO у патогенезі гепатиту, індукованого аліловим спиртом (АС) [11]. Ми також показали, що у механізмах розвитку ліпополісахаридного пародонтиту, поєданого з гепатитом, важливу роль відіграє гіперпродукція NO [12]. Очевидно, що бактеріальний ЛПС та медіатори запалення, що утворюються під його впливом в тканинах пародонта, а також прозапальні цитокіни, які продукуються в печінці при гепатиті, мають синергічний вплив на iNOS, що неминуче призводить до вираженого нітрооксидативного стресу і, як наслідок, до посилення деструктивних процесів у тканинах.

З цієї точки зору важливим є дослідження фармакологічних підходів, які б попереджували надлишкове утворення NO і запобігали нітрооксидативному стресу. Є дані, що інгібітори NO-синтази

здатні захищати тканини пародонта від пошкодження при гінгівіті і пародонтиті [1, 4, 6], проте їх системні ефекти залишаються недослідженими. Немає також даних, які б свідчили про доцільність інгібування NO-синтази при пародонтиті на фоні гепатиту.

Мета роботи: дослідити вплив неселективного інгібітора NO-синтази N-нітро-L-аргініну та високоселективного інгібітора iNOS N-(3-(амінометил)бензил)ацетамідину (1400W) на експресію про- і протизапальних цитокінів у сироватці та інтенсивність каталітичних процесів у сполучній тканині при ліпополісахаридному пародонтиті на фоні супутнього хронічного гепатиту.

Матеріали та методи дослідження

Досліди виконані на 40 безпородних щурах-самцях масою 150–180 г, яких утримували на стандартній дієті. Всіх тварин було розподілено на 4 групи: 1-ша – контроль (інтактні щури); 2-га – щури з пародонтитом на фоні хронічного гепатиту. У тварин цієї групи викликали гепатит шляхом внутрішньочеревинного введення алілового спирту (АС) у дозі 10 мг/кг протягом 2 тижнів через день. Починаючи з 15 доби експерименту щурам вводили в тканини ясен ЛПС *E. Coli* протягом 2 тижнів через день по 40 мікролітрів (1 мг/мл); 3 група – щури з пародонтитом на фоні гепатиту, яким, починаючи з 15 доби експерименту, паралельно з ЛПС, щоденно протягом 14 діб вводили внутрішньочеревинно неселективний інгібітор NO-синтази N-нітро-L-аргінін (L-NNA) («Sigma-Aldrich», США) у дозі 50 мг/кг; 4 група – щури з пародонтитом на фоні гепатиту, яким, починаючи з 15 доби експерименту, паралельно з ЛПС, щоденно протягом 14 діб вводили внутрішньочеревинно високоселективний інгібітор індукцибельної NO-синтази N-(3-(амінометил)бензил)ацетамідину (1400W) у дозі 1,5 мг/кг («Sigma-Aldrich», США). Для підтвердження гепатиту на 15 день експерименту в сироватці крові щурів 2 групи визначали активність АлАТ і АсАТ за загальноприйнятою методикою, використовуючи комерційний комплект реактивів. Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом на 30 день експерименту.

Для визначення рівня цитокінів (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-10) в сироватці крові використовували імуноферментний аналіз (набір реактивів фірми Vector Best, Новосибірськ, Росія). Абсорбцію проб вимірювали на апараті «Stat Fax Plus» відповідно до протоколу виробника. Визначення вмісту глікозаміногліканів в сироватці проводили за методом [13], вільного оксипроліну – за методом [14], сіалових кислот – за методом Гесса [15]. Для визначення рівня С-реактивного білка (СРБ) в сироватці крові використовували метод латексаглютації «СРБ-латекс-тест» за допомогою діагностичних наборів «Cormay» (Польща).

Статистичний аналіз виконували, використовуючи стандартні статистичні програми і критерій t Стьюдента. Зміни $p < 0,05$ розглядалися як статистично достовірні.

Результати та їх обговорення

Рівні прозапальних цитокінів в сироватці крові щурів з пародонтитом, який розвивався на фоні гепатиту, різко підвищувалися (ФНП- α – у 7,9 разу, IL-1 β – у 6,2 разу) (табл. 1). При застосуванні L-NNA концентрація прозапального ФНП- α зменшувалася вдвічі ($p < 0,05$) порівняно з некоригованими тваринами. Введення 1400W протягом 14 діб призвело до ще більшого (у 2,9 разу, $p < 0,05$) зниження рівня ФНП- α в сиро-

ватці крові щурів з поєднаною патологією. Вміст IL-1 β також знижувався достовірно як під впливом неспецифічного, так і специфічного інгібітора NO-синтази. Так, у тварин, яким вводили L-NNA, концентрація даного інтерлейкіну була нижчою від відповідного показника у нелікованих щурів у 2,2 разу, а у тварин, яким вводили 1400W – у 2,7 разу ($p < 0,05$ в обох випадках).

Вміст протизапальних цитокінів (IL-4 і IL-10) в сироватці тварин з пародонтитом і гепатитом, на відміну від прозапальних, достовірно знижувався порівняно з контролем. Парадоксально, але при застосуванні інгібіторів NO-синтази було зареєстровано тенденцію до ще більшого зниження рівня протизапальних цитокінів в сироватці щурів з поєднаною патологією (табл. 1).

Отже, як специфічний, так і неспецифічний інгібітори NO-синтази N-нітро-L-аргінін і N-(3-(амінометил)бензил)ацетамідин достовірно знижують продукцію прозапальних цитокінів при ліпополісахаридному пародонтиті на фоні гепатиту, а також викликають тенденцію до зниження рівня протизапальних інтерлейкінів.

Результати впливу L-NNA і 1400W на основні показники, що характеризують стан сполучної тканини у щурів з пародонтитом на фоні гепатиту, показано в таблиці 2. Основним білком тканин пародонта є колаген, який катаболізується за участю специфічних металоматричних протеїназ. Вільний оксипролін – маркер катаболізму колагену. При застосуванні ліпополісахариду на фоні гепатиту в сироватці крові спостерігалось збільшення вмісту вільного оксипроліну порівняно з контрольною групою тварин в 2,4 разу ($p < 0,05$). Отже, ендотоксин грамнегативної мікрофлори сприяє суттєвій активації колагенолізу у тканинах пародонта.

Важливими білками сполучної тканини пародонта також є глікопротеїни та протеоглікани. Ступінь деструкції глікопротеїнів визначали за вмістом в сироватці крові сіалових кислот. Для оцінки змін міжклітинної речовини сполучної тканини досліджували вміст в сироватці глікозаміногліканів – компонентів протеогліканів. Встановлено, що вміст кінцевих вуглеводів гліканових структур глікопротеїнів – сіалових кислот у сироватці щурів з пародонтитом підвищувався порівняно з контролем у 3,8 разу, а рівень глікозаміногліканів збільшувався в 2,2 разу ($p < 0,05$ в обох випадках).

С-реактивний білок – білок гострої фази, один із найчутливіших індикаторів ураження тканин при запаленні, некрозі, паразитарних та вірусних інфекціях. Рівень СРБ адекватно відображає інтенсивність запального процесу. Як свідчать дані, наведені у таблиці 2, у щурів з пародонтитом на фоні гепатиту даний показник зростав в 3,6 разу.

Неспецифічний інгібітор NO-синтази суттєво не впливав на активність колагенолізу. Водночас специфічний інгібітор iNOS викликав достовірне (на 30%) зниження порівняно з нелікованими

Таблиця 1. Вплив L-NNA та 1400W на вміст цитокінів в сироватці крові щурів з ліпополісахаридним пародонтитом на фоні гепатиту ($M \pm m$; $n = 10$)

Показник	Групи тварин			
	Показник			
	Контроль	ЛПС+АС	ЛПС+АС+L-NNA	ЛПС+АС+1400W
Сироватка крові				
ФНП- α , г/мл	47,40 \pm 6,02	375,6 \pm 30,20*	185,8 \pm 22,20*#	125,8 \pm 20,20*#
IL-1 β , пг/мл	22,70 \pm 3,45	140,5 \pm 14,10*	65,40 \pm 10,20*#	52,46 \pm 9,50*#
IL-4, пг/мл	19,25 \pm 2,40	5,20 \pm 1,04*	4,75 \pm 0,98*	4,86 \pm 1,28*
IL-10, пг/мл	14,20 \pm 2,94	4,24 \pm 0,80*	4,02 \pm 0,92*	3,72 \pm 0,90*

Примітка: * – зміни достовірні порівняно з показниками інтактних тварин; # – зміни достовірні порівняно з показниками тварин з пародонтитом на фоні гепатиту.

Таблиця 2. Вплив L-NNA та 1400W на показники обміну сполучної тканини в сироватці крові щурів з ліпополісахаридним пародонтитом на фоні гепатиту ($M \pm m$; $n = 10$)

Показник	Групи тварин			
	Показник			
	Контроль	ЛПС+АС	ЛПС+АС+L-NNA	ЛПС+АС+1400W
Вільний оксипролін, мкмоль/л	11,95±1,32	29,30±1,72*	31,35±2,84*	20,32± 1,80*#
Глікозаміно-глікани, мкмоль/л	55,34±4,04	120,5±7,10*	115,2±6,18*	80,30±5,34*#
Сіалові кислоти, ммоль/л	3,08±0,24	11,54±1,20*	10,90±1,32*	6,04±0,52*#
С-реактивний білок, мг/л	3,95±0,35	14,25±1,02*	10,95±1,32*	6,50±0,52*#

Примітка: * – зміни достовірні порівняно з показниками інтактних тварин; # – зміни достовірні порівняно з показниками тварин з пародонтитом на фоні гепатиту.

щурями вмісту вільного оксипроліну в сироватці. Як і у випадку з колагенолізом, L-NNA не впливав на швидкість розпаду протеогліканів у щурів з пародонтитом і гепатитом, тоді як під впливом 1400W рівень глікозаміногліканів в сироватці був на 34% менше, ніж у некоригованих тварин з поєднаною патологією. Вміст сіалових кислот, який свідчить про інтенсивність розпаду глікопротеїнів, у щурів з пародонтитом і гепатитом достовірно змінювався також тільки під впливом специфічного інгібітора iNOS. У цьому випадку їх рівень в сироватці був на 48% менше, ніж у тварин, яким препарат не вводили. При дослідженні вмісту С-реактивного білка в сироватці щурів з пародонтитом на фоні гепатиту було виявлено, що при застосуванні L-NNA спостерігалася лише тенденція до зниження рівня даного індикатора ураження тканин. Натомість, при використанні з метою корекції 1400W спостерігалася достовірне (порівняно з некоригованими тваринами) зменшення вмісту сироваткового С-реактивного білка (в 2,2 разу).

Таким чином, результати даної роботи і наші попередні дослідження [12] дають можливість констатувати, що бактеріальний ЛПС, введений в тканини ясен тварин з супутнім гепатитом, спричиняє системний ефект, що проявляється надмірним утворенням прозапальних цитокінів і, як наслідок, гіперпродукцією оксиду азоту, що в результаті призводить до нітрооксидативного і оксидативного стресу та посилення катаболічних процесів у сполучній тканині. Здатність ЛПС індукувати утворення NO внаслідок гіперекспресії iNOS показано також в роботах [7, 8]. Розірвати цей патогенетичний ланцюг і тим самим запобігти дезінтегративним процесам в тканинах пародонта можна було б за допомогою засобів, що здатні пригнічувати NO-синтазу і, особливо, її індукцибельну ізоформу [16, 17]. В роботах [1, 6] було показано, що застосування селективного інгібітора iNOS аміногуанідину позитивно впливало на тканини пародонта, при цьому ніякого стороннього ефекту на системну продукцію NO ендотеліальною NO-синтазою не спостерігалася, що було доведено шляхом моніторингу артеріального тиску [1]. Необхідно взяти до уваги, що аміногуанідин є лише частково селективним інгібітором iNOS [3], тоді як 1400W характеризується високою селективністю щодо даної ізоформи NO-синтази [18]. У даній роботі ми показали, що точкове інгібування iNOS за допомогою 1400W є набагато ефективнішим в плані попередження катаболічних процесів у сполучній тканині, ніж неселективне пригнічення NO-синтази. Ці дані узгоджуються з роботою [19], де було продемонстровано, що застосування неселективного інгібітора NO-синтази L-NAME не пригнічувало, а навіть, навпаки, посилювало продукцію NO і NO_x при оральній інокуляції *Porphyromonas gingivalis*

мишам. Автори пояснюють збільшення концентрації NO його неферментативним утворенням, яке відбувається у присутності L-NAME і аскорбату [20], хоча також можливо, що використання L-NAME стимулює компенсаторну експресію iNOS [17]. На відміну від попередньої роботи і наших даних, R.F. Leitao і ін., 2005 показали, що L-NAME здатний попереджати локальне утворення запальних клітин і пригнічувати деструкцію альвеолярної кістки у щурів при його інтраперитонеальному введенні [6]. Проте даний ефект не спостерігався при низьких (5–10 мг/кг) або високих (40 мг/кг) дозах препарату, що, очевидно, свідчить про протективну функцію базального рівня NO. Подібно до неселективних інгібіторів, частково селективні інгібітори iNOS можуть призвести до негативного ефекту в здорових клітинах, оскільки існує комплексна взаємодія між трьома формами NO-синтази щодо продукції NO в тканинах [21]. На відміну від неселективного інгібітора L-NAME, високоселективний інгібітор iNOS 1400W ефективно знижував інтенсивність утворення NO у тканинах і рівень NO_x в сироватці мишей, яким інокулювали *Porphyromonas gingivalis* [19]. Проте існують також дані, які свідчать, що 1400W не знижує рівень NO/NO_x в сироватці тварин з септичним шоком [22]. Це дозволяє припустити, що, принаймні, на дуже ранніх стадіях бактеріальної інвазії NO є необхідним в циркулюючій крові. Оскільки 1400W інгібує продукцію NO на рівні тканин, це може вказувати на його мобілізацію з депо (нітрозотолів) [23], що призводить до збільшення рівня NO в крові, і, як наслідок, вмісту сироваткового NO_x.

Висновки

Неспецифічний інгібітор NO синтази N-нітро-L-аргінин і специфічний інгібітор iNOS 1400W знижують продукцію прозапальних цитокінів (ФНП-α і ІЛ-1β) при ліпополісахаридному пародонтиті на фоні гепатиту. Застосування при пародонтиті на фоні гепатиту 1400W ефективно попереджає деструкцію сполучної тканини (пригнічує інтенсивність колагенолізу, швидкість розпаду протеогліканів і глікопротеїнів, знижує рівень С-реактивного білка в сироватці крові). Селективне інгібування індукцибельної форми NO-синтази може бути перспективним методом лікування хворих на пародонтит, що розвивається на фоні гепатиту.

Список використаної літератури

1. Effect of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats / R. Di Paola, S. Marzocco, E. Mazzon [та ін.] // J. Dent. Res. – 2004. – Vol. 83, №4. – P. 343–348.
2. Nitric oxide, a biological double-faced janus — is this good or bad? / T. Thippeswamy, J. S. McKay, J. P. [та ін.] // Histol. Histopathol. – 2006. – Vol. 21, №4. – P. 445–458.
3. Tinker A.C., Wallace A.V. Selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase: potential agents for the treatment of inflammatory diseases? / A.C. Tinker, A.V. Wallace // Curr. Top. Med. Chem. – 2006. – Vol. 6. – P. 77–92.
4. Inhibition of experimental gingivitis in beagle dogs with topical mercaptoalkylguanidines / D.W. Paquette, A. Rosenberg, Z. Lohinai [та ін.] // J. Periodontol. – 2006. – Vol. 77, №3. – P. 385–391.
5. Proinflammatory and antimicrobial nitric oxide in gingival fluid of diabetic patients with periodontal disease / U. Skaleric, B. Gaspirc, N. McCartney-Francis [та ін.] // Infect. Immun. – 2006. – Vol. 74, №12. – P. 7010–7013.
6. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats / R. F. Leitao, R. A. Ribeiro, H. V. Chaves [та ін.] // J. Periodontol. – 2005. – Vol. 76, №6. – P. 956–963.

7. Surface-associated material from *Porphyromonas gingivalis* stimulates the release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase / S.J. Kim, E.Y. Choi, Y. J. Cho [та ін.] // *Microbes Infect.* – 2006. – Vol. 8, №2. – P. 470–477.
8. Chronic ingestion of *Porphyromonas gingivalis* induces systemic nitric oxide response in mice / A. Nemes, Z. Pavlica, D. A. Crossley [та ін.] // *Oral Microbiol. Immunol.* – 2009. – Vol. 24. – P. 204–210.
9. Dalgic B. Pyogenic liver abscess and peritonitis due to *Rhizopus oryzae* in a child with Papillon-Lefevre syndrome / B. Dalgic, A. Bukulmez, S. Sari // *Eur. J. Pediatr.* – 2011. – Vol. 170, №6. – P. 803–805.
10. Stage of hepatocellular carcinoma is associated with periodontitis / N. Tamaki, A. Takaki, T. Tomofuji [та ін.] // *J. Clin. Periodontol.* – 2011. – Vol. 38, №11. – P. 1015–1020.
11. Yaroshenko T., Korda M. Role of nitric oxide in chemically induced hepatotoxicity / T. Yaroshenko, M. Korda // *Ann. Univers. Mariae Curie-Sklodowska.* – 2006. – Vol. 19, N 3. – P. 143–146.
12. Щерба В.В., Корда М.М. Патогенетичні особливості перебігу пародонтиту на фоні хронічного гепатиту / В.В. Щерба, М.М. Корда // *Медицина хімія.* – 2012. – Vol. 14, №2. – С. 64–68.
13. Метод определения гликозаминогликанов в биологических жидкостях / П.Н. Шараев, В.Н. Пишков, Н.И. Соловьева [та ін.] // *Лаб. дело.* – 1987. – №5. – С. 330–332.
14. Тетянец С.С. Метод определения свободного оксипролина в сыворотке крови / С.С. Тетянец // *Лаб. дело.* – 1985. – №1. – С. 61–62.
15. Колб В.Г. Справочник по клинической химии / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Минск: Беларусь, 1982. – 311 с.
16. Type II nitric oxide synthase activity is cardio-protective in experimental sepsis / S. Price, J. A. Mitchell, P.B. Anning [та ін.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 472, №1–2. – P. 111–118.
17. Kubes P. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us / P. Kubes // *Gut.* – 2000. – Vol. 47, №1. – P. 6–9.
18. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase *in vitro* and *in vivo* / E. P. Garvey, J. A. Oplinger, E. S. Furfine [та ін.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, №8. – P. 4959–4963.
19. Systemic use of selective iNOS inhibitor 1400W or non-selective NOS inhibitor L-NAME differently affects systemic nitric oxide formation after oral *Porphyromonas gingivalis* inoculation in mice / A. Nemes, Z. Pavlica, M. Petelin [та ін.] // *Arch. Oral. Biol.* – 2010. – Vol. 55, №7. – P. 509–514.
20. Non-enzymatic production of nitric oxide (NO) from NO synthase inhibitors / L.L. Moroz, S.W. Norby, L. Cruz [та ін.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – Vol. 253, №3. – P. 571–576.
21. Cross-talk between constitutive and inducible NO synthase: an update / T. Persichini, O. Cantoni, H. Suzuki [та ін.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2006. – Vol. 8, №5–6. – P. 949–954.
22. Effects of 1400W and/or nitroglycerin on renal oxygenation and kidney function during endotoxaemia in anaesthetised rats / T. Johannes, E.G. Mik, K. Klingel [та ін.] // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2009. – Vol. 36, №9. – P. 870–879.
23. Nitrosothiol stores in vascular tissue: modulation by ultraviolet light, acetylcholine and ionomycin / E.S. Ng, Z.J. Cheng, A. Ellis [та ін.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 560, №2–3. – P. 183–192.