

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний університет

ЄЛІНСЬКА Аліна Миколаївна

УДК 616.314.17 -001-092 : 546.172.6

**NO- ТА NF-κB –ЗАЛЕЖНІ МЕХАНІЗМИ УРАЖЕННЯ
СЛИННИХ ЗАЛОЗ ЩУРІВ ЗА УМОВ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ**

14.03.04 – патологічна фізіологія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Суми – 2015

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Вищому державному навчальному закладі України «Українська медична стоматологічна академія» МОЗ України (м. Полтава).

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
Костенко Віталій Олександрович,
Вищий державний навчальний заклад України
«Українська медична стоматологічна академія»
МОЗ України (м. Полтава),
завідувач кафедри патофізіології.

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор **Тюпка Тетяна Іванівна**,
Національний фармацевтичний університет МОЗ України (м. Харків),
професор кафедри патологічної фізіології;

доктор медичних наук, професор **Клименко Микола Олексійович**,
Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України,
завідувач кафедри клінічної патологічної фізіології, топографічної анатомії та
оперативної хірургії.

Захист відбудеться 29 травня 2015 року об 11:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 55.051.05 при Сумському державному університеті (40018, м. Суми, вул. Санаторна, 31).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Сумського державного університету (40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2).

Автореферат розісланий 28 квітня 2015 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
доктор медичних наук, доцент



М.В. Погорелов

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Метаболічний синдром (МС) становить собою сукупність факторів ризику серцево-судинних захворювань (ССЗ), а саме – вісцерального ожиріння, атерогенної дисліпідемії, порушень вуглеводного обміну й артеріальної гіпертензії, що мають єдину патофізіологічну основу – інсулінорезистентність (ІР). При наявності МС ризик розвитку ССЗ, цукрового діабету (ЦД) 2 типу та смерті в результаті них є значно підвищеним (Reaven G.M., 2005; De Fronzo R.A., 2010; Simmons R.K. et al., 2010; Кайдашев И.П., 2012-2013).

До цього часу причини розвитку МС не цілком ясні. Певне значення мають генетичні фактори, проте у сучасних умовах домінуючу роль відіграють екзогенні чинники, особливо надмірне харчування, що призводить до розвитку ожиріння. На думку багатьох дослідників, однією з основних причин високої частоти метаболічних порушень і епідемії ССЗ є збільшення споживання фруктози, головним чином, у вигляді сахарози та глюкозо-фруктозних сиропів. Несприятливу метаболічну дію цього вуглеводу продемонстровано також в експериментах на тваринах (Резников А.Г., 2003; Деримедвідь Л.В. та співавт., 2011; Тарасенко К.В., 2011; Panchal S.K., Brown L., 2011).

В останні роки виявлено, що у хворих з МС окрім загальноприйнятих його складових (ІР, абдомінальне ожиріння, артеріальна гіпертензія, порушення обміну ліпідів, системна запальна відповідь та ін.) розвивається реактивно-дистрофічне ураження слинних залоз (СЗ) з порушенням їхньої функції (Афанасьєв В.В. та співавт., 2011- 2012; Арутюнян С.Э., 2012). За думкою авторів, ці зміни можуть розглядатися в структурі єдиного патологічного процесу, загальним патогенетичним механізмом якого є ІР. Виразність клінічних проявів сіаладенозу корелює з тяжкістю перебігу МС.

Важливим аспектом МС, який сприяє розвитку кардіоваскулярних ускладнень, вважається ендотеліальна дисфункція (ЕД) (Мазуров В.И., Якушева В.А., 2006; De Arriba A. et al., 2013). Слід зазначити, що до цього часу все ще не вирішене питання щодо причинно-наслідкових взаємозв'язків ІР та ендотеліальної дисфункції, проте безсумнівним є той факт, що ІР і дисфункція ендотелію, основним наслідком якої є порушення синтезу оксиду азоту (NO), є ланками одного ланцюга, що замикає порочне коло метаболічних і кардіоваскулярних розладів.

У наш час значно розширилися уявлення про участь NO в місцевій регуляції функціонального та метаболічного стану СЗ. У тканинах СЗ знайдено усі три ізоформи NO-синтаз (eNOS, nNOS, iNOS) (Soinila J. et al., 2006). Завдяки здатності вільно перетинати мембрани ендогенний NO відіграє важливу роль у забезпеченні процесу секреції слини, регуляції кровопостачання СЗ, нейротрансмісії, утворенні гістогематичного бар'єру, впливає на проліферацію та диференціювання клітин (Uğar-Cankal D., Ozmeric N., 2006; Proctor G.B., Carpenter G.H., 2007).

Функції СЗ у значній мірі залежать від стану окиснювального метаболізму. Процеси активної секреції та реабсорбції вимагають високого рівня сполученого окиснювального фосфорилування (Catalán M.A. et al., 2009). Кисень-залежними є також NO-синтазні реакції (Ignarro L.J. et al., 2009).

Значна кількість ефектів NO опосередковується через активацію транскрипційного ядерного фактора κВ (NF-κВ) (Simile M.M. et al., 2005), який ініціює більшість механізмів у патогенезі системної запальної відповіді. У той же час, від активності NF-κВ залежить індукція індукцибельної NO-синтази (iNOS) у клітинах *in vivo* та *in vitro*. Промотор гена iNOS містить зв'язуючий центр для NF-κВ (Vos T.A. et al., 1999).

Нещодавно висунуто припущення, що порушення NF-κВ сигналізації може бути загальною ланкою, яка об'єднує всі компоненти МС та призводить до розвитку ІР, ліпотоксичності, системної прозапальної гіперцитокінемії та артеріальної гіпертензії (Кайдашев І.П., 2012-2013).

Проте участь компонентів системи NO та NF-κВ-залежних процесів у патогенезі ушкоджень СЗ 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.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана як самостійний фрагмент планових наукових робіт Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія» МОЗ України «Кисень- та NO-залежні механізми ушкодження внутрішніх органів та їх корекція фізіологічно активними речовинами» (№ держреєстрації №0108U010079) та «Роль активних форм кисню, системи оксиду азоту та транскрипційних факторів у механізмах патологічного системогенезу» (№ держреєстрації №0114U004941). Здобувачка є співвиконавцем тем. Тема дисертації затверджена на засіданні Проблемної комісії МОЗ і НАМН України «Нормальна та патологічна фізіологія» від 30.01.2013 р. (протокол № 1) та на засіданні Вченої ради стоматологічного факультету (протокол №10 від 28.05.2013 р.).

Мета дослідження: Метою роботи є з'ясування ролі компонентів системи оксиду азоту (різних ізоформ NO-синтази, її субстрату, пероксинітриту) та транскрипційного ядерного фактора κВ у патогенезі функціонально-метаболических розладів піднижньощелепних СЗ у щурів за умов відтворення метаболічного синдрому.

Завдання дослідження:

1. Дослідити стан NO-синтазного (за активністю NOS) та аргіназного (за активністю орнітиндекарбоксилази) шляхів метаболізму L-аргініну, рівень продукції супероксидного аніон-радикала ($\cdot\text{O}_2^-$), стан пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), антиоксидантної (АО) системи в тканинах піднижньощелепних СЗ щурів та їх білоксинтезуючої функції (за активністю α-амілази) за умов відтворення експериментального МС.

2. Вивчити вплив селективних інгібіторів нейрональної та індукцибельної NO-синтаз на стан NO-синтазного та аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну, рівень продукції $\cdot\text{O}_2^-$, стан ПОЛ, АО захисту в тканинах піднижньощелепних СЗ щурів та їх білоксинтезуючої функції за умов відтворення експериментального МС.

3. Дослідити вплив екзогенного L-аргініну на стан NO-синтазного та аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну, рівень продукції $\cdot\text{O}_2^-$, стан ПОЛ, АО захисту в тканинах піднижньощелепних СЗ щурів та їх білоксинтезуючої функції за умов відтворення експериментального МС.

4. З'ясувати вплив скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну на стан NO-синтазного та аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну, рівень продукції $\cdot\text{O}_2^-$, стан ПОЛ, АО захисту в тканинах піднижньощелепних СЗ щурів та їх білоксинтезуючої функції за умов відтворення експериментального МС.

5. Вивчити вплив інгібіторів активації NF-κB (JSH-23 та метформіну гідрохлориду) на стан NO-синтазного та аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну, рівень продукції $\cdot\text{O}_2^-$, стан ПОЛ, АО захисту в тканинах піднижньощелепних СЗ щурів та їх білоксинтезуючої функції за умов відтворення експериментального МС.

Об'єкт дослідження: Механізми ураження слинних залоз за умов метаболічного синдрому.

Предмет дослідження: роль NO-залежних систем і NF-κB-сигналізації у патогенезі пошкодження СЗ за умов експериментального МС.

Методи дослідження: патофізіологічні, біохімічні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше виявлено, що відтворення метаболічного синдрому призводить у тканинах СЗ до реципрокних змін окисного (NO-синтазного, головним чином, за рахунок гіперактивації iNOS) й неокисного (аргіназного) шляхів метаболізму L-аргініну та посилення загального фону продукції $\cdot\text{O}_2^-$ та його генерації мітохондріальним і НАДФН-залежними (мікросомальним і NOS) електронно-транспортними ланцюгами (ЕТЛ) з подальшою активацією процесів ПОЛ і зниженням АО потенціалу. Пригнічення iNOS супроводжується у піднижньощелепних СЗ активацією конкуруючого аргіназного шляху метаболізму L-аргініну, що виявляється у збільшенні активності орнітиндекарбоксілази.

Вперше виявлено, що функціональна активність nNOS за умов експериментального МС зменшує у тканинах піднижньощелепних СЗ продукцію $\cdot\text{O}_2^-$ НАДФН- і НАДН-залежними ЕТЛ, обмежує активацію ПОЛ, але знижує активність каталази та істотно не позначається на стані АО потенціалу. Функціонування nNOS за умов відтворення МС сприяє збільшенню активності α-амілази у тканинах піднижньощелепних СЗ.

Показано, що введення щурам екзогенного L-аргініну під час відтворення МС не супроводжується феноменом «аргінінового парадоксу» при оцінці активності NOS у тканинах піднижньощелепних СЗ щурів, але оптимізує функціонування неокисного (аргіназного) шляху метаболізму цієї амінокислоти, знижує продукцію у тканинах СЗ $\cdot\text{O}_2^-$ НАДФН-залежними ЕТЛ.

Вперше виявлено, що дисбаланс NOS та аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну та активація вільнорадикальних реакцій у тканинах піднижньощелепних СЗ за умов експериментального МС є пероксинітрит- та NF-κB-залежними процесами. Введення білим щурам скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну та інгібіторів активації NF-κB JSH-23 та метформіну

гідрохлориду під час відтворення МС знижує у тканинах СЗ активність NOS, продукцію O_2^- НАДФН-залежними і НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ, обмежує активність ПОЛ і підвищує стан АО захисту. Призначення L-селенометіоніну та інгібітора ядерної транслокації NF-кВ JSH-23 за умов експерименту покращує білоксинтезуючу функцію піднижньощелепних СЗ, що не є характерним при застосуванні метформіну гідрохлориду.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані результати можуть використовуватися як експериментальна база для розробки патогенетично обґрунтованих методів попередження та корекції дисфункції СЗ за умов МС засобами, що впливають на активність ізоформ NOS і NF-кВ-сигналізацію. Одержані результати можуть використовуватися як експериментальне обґрунтування доцільності проведення подальших клінічних досліджень ефективності застосування L-селенометіоніну та інгібіторів активації NF-кВ як перспективних засобів корекції функціонально-метаболічного стану СЗ за умов МС. Розроблений спосіб експериментального моделювання метаболічного синдрому (патент України на корисну модель № 93517).

Результати роботи впроваджено в навчальний процес на кафедрах патофізіології Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія», Державного вищого навчального закладу України «Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського», Запорізького державного медичного університету, Національного фармацевтичного університету, Харківського національного медичного університету, науково-дослідницьку роботу Науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія».

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. Здобувачем особисто здійснено патентно-інформаційний пошук, експериментальні дослідження, проведено статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки дисертації. Разом із науковим керівником розроблена програма, визначені мета і завдання дослідження, методичні підходи до проведення експерименту на тваринах. У працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок: результати власних експериментальних досліджень, участь в аналізі та узагальненні отриманих даних, підготовлено статті до друку.

Апробація результатів дослідження. Основні наукові положення і результати дисертації доповідалися та обговорювалися на XVIII міжміській конференції молодих учених “Актуальные проблемы патофизиологии” (Санкт-Петербург, 2012), VI конгресі патофізіологів України “Від експериментальних досліджень до клінічної патофізіології” (Місхор, 2012), Всеукраїнській науково-практичній конференції “Медична наука в практику охорони здоров’я” (Полтава, 2012), VI науково-практичній конференції “Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів” (Тернопіль, 2013), XVII Всеросійській медико-біологічній конференції молодих дослідників (з міжнародною участю) “Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье”

(Санкт-Петербург, 2014), науково-практичній конференції “Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології” (Вінниця, 2014), науково-практичній інтернет-конференції «Актуальні проблеми функціональної морфології», присвяченій 110 річниці з дня народження Е.Д. Бромберг (Полтава, 2014), Всеукраїнській науково-практичній конференції “Медична наука в практику охорони здоров’я” (Полтава, 2014).

Публікації. Результати дослідження опубліковані в 5 статтях у фахових журналах України (згідно з переліком МОН України), що реферуються міжнародними наукометричними базами даних *PiNC*, *Index Copernicus International*, *Google Scholar*, 1 статті у фаховому журналі за кордоном (Республіка Білорусь), 7 робіт опубліковано у матеріалах конгресів і конференцій, одержано 1 патент України на корисну модель.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена на 156 сторінках комп’ютерного набору, містить 30 таблиць та 1 рисунок. Складається зі вступу, огляду літератури, характеристики об’єктів і методів дослідження, 5-ти розділів результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, який містить 289 джерел – 113 кирилицею та 176 латиницею (обсягом 34 сторінки).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Експерименти виконані на 85 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-230 г. При роботі з тваринами дотримувалися вимог «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 20.09.1985 р.). Комісією з питань біоетики Вищого державного навчального закладу України “Українська медична стоматологічна академія” (протокол № 120 від 14.01.2015 р.) порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

Проведено 8 серій дослідів: у першій серії необхідні показники вивчали в інтактних тварин (*контрольна серія*); у другій – після моделювання МС; у третій, четвертій і п’ятій серіях – протягом відтворення МС тваринам вводили відповідно селективний інгібітор нейрональної NO-синтази (nNOS) 7-нітроіндазол (7-NI), селективний інгібітор iNOS – аміногуанідин і субстрат NO-синтазної реакції – L-аргінін; у шостій – протягом відтворення МС тваринам вводили скевенджер пероксинітриту – L-селенометіонін; у сьомій і восьмій – протягом відтворення МС тваринам вводили відповідно інгібітор активації NF-κB – JSH-23 (4-метил-N-(3-фенілпропіл)бензол-1,2-діамін) та метформіну гідрохлорид. Для дослідження під ефірним наркозом вилучали піднижньощелепні СЗ у комплексі з великими під’язиковими. Останні відсепаровували, після чого не виводячи тварин з наркозу проводили евтаназію тварин методом дислокації шийних хребців.

Для відтворення МС гризунам протягом двох місяців призначали 20% водний розчин фруктози для пиття та "дієту західного типу" (пат. України на корисну модель № 93517), 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%. Застосування названого способу дозволяє виявити порушення обміну речовин, характерні для МС (зниження толерантності до глюкози, вісцеральне ожиріння, дисліпопротеїнемію, системну запальну відповідь).

Селективний інгібітор nNOS – 7-нітроіндазол (7-NI, 7-nitroindazole) виробництва “Sigma Chemical Co” (США) призначали внутрішньоочеревино в дозі 30 мг/кг (Laude K. et al., 2003). Селективний інгібітор індубельної NO-синтази – аміногуанідин виробництва "Sigma Chemical Co" (США) вводили внутрішньоочеревино в дозі 20 мг/кг (Takeuchi K. et al., 2007). Субстрат NO-синтазної реакції – L-аргінін (субстанція виробництва “Kyowa Hakko Kogyo Co LTD” (Японія) вводили внутрішньоочеревино в дозі 500 мг/кг (Дробінська О. та співавт., 2004). Скевенджер пероксинітриду L-селенометіонін виробництва “Sigma-Aldrich, Inc.” (США) вводили внутрішньоочеревино в дозі 3 мг/кг (Laude K. et al., 2003). Інгібітор активації NF-κB II – JSH-23 (4-метил-N-(3-фенілпропіл)бензол-1,2-діамін) виробництва “Santa Cruz Biotechnology” (ФРН) призначали внутрішньоочеревино в дозі 1 мг/кг маси тварини (Kumar A. et al., 2011). Інгібітор активації NF-κB метформіну гідрохлорид виробництва «Wanbury LTD» (Індія) вводили внутрішньоочеревино в дозі 200 мг/кг маси щура (Kravchuk E. et al., 2011). Останній засіб призначали через день, інші – 2 рази на тиждень протягом періоду відтворення МС.

Біохімічні методи дослідження. Активність NOS визначали за різницею концентрації нітрит-іонів (NO_2^-) до та після інкубації гомогенату тканин піднижньощелепних СЗ у середовищі, що містить L-аргінін (субстрат NOS) та нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений (НАДФН) (Hevel J.M., 1991). 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).

Активність орнітиндекарбоксилази визначали за зниженням вмісту орнітину в інкубаційному середовищі методом Chinard у модифікації В.А. Храмова (1997). Метод базується на нінгідринній реакції при рН=1.0 і є специфічним, оскільки значне забарвлення дають тільки орнітин, пролін та цитрулін. Інтенсивність забарвлення розчину з продуктами взаємодії нінгідрину з амінокислотами пропорційна концентрації орнітину в досліджуваному розчині. Оптичну щільність визначали при $\lambda=490$ нм.

Утворення супероксидного аніон-радикала оцінювали в гомогенаті СЗ при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм у модифікації О.І. Цебржинського (2002) з використанням спектрофотометру СФ-46 з такими індукторами: НАДН – для оцінки продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ; НАДФН – для оцінки продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним ЕТЛ та та NOS. Рівень 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 залізоаскорбатному буферному розчині (Кайдашев І.П. та співавт., 2003). Активність антиоксидантної системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час півторагодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному

розчині, а також за активністю АО ферментів – супероксиддисмутази (СОД) (Брусов О.С., Герасимов А.М., Панченко Л.Ф., 1976) та каталази (Архипова О.Г., 1988).

Активність α -амілази визначали за методикою Каравея за допомогою набору реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна, м. Дніпропетровськ) (Меньшиков В.В. та співавт., 1987).

Отримані дані піддавали статистичній обробці (Гланц С., 1999; Реброва О.Ю., 2002). Для перевірки розподілу на нормальність було застосовано розрахунок критерію Шапіро-Вілка. Якщо дані відповідали нормальному розподілу, то для їх порівняння використовували t-критерій Ст'юдента. У випадку, коли ряди даних не підлягали нормальному розподілу, статистичну обробку здійснювали, використовуючи непараметричний метод – тест Мана-Вітні. Статистичні розрахунки проводили з використанням програм "Microsoft Excel 2007" та "StatisticSoft 6.0".

Результати дослідження та їх обговорення

1. Зміни окиснювальних процесів та функції слинних залоз за умов відтворення експериментального метаболічного синдрому

За результатами дослідження, у тканинах піднижньощелепних СЗ інтактних тварин активність NOS становить – 4.12 ± 0.22 мкмоль $\text{NO}_2^-/\text{г} \cdot \text{хв.}$, а вміст NO_2^- – 0.112 ± 0.007 мкмоль/г. У нормі активність NOS у тканинах піднижньощелепних СЗ забезпечується переважно функціонуванням конститутивних NOS (nNOS, eNOS) (Proctor G.B., Carpenter G.H., 2007).

За умов МС активність NOS у тканинах піднижньощелепних СЗ збільшується – у 2.07 рази ($p < 0.001$), вміст NO_2^- у 1.33 рази ($p < 0.05$).

За нашими даними, підвищення активності NOS супроводжується обмеженням у тканинах піднижньощелепних СЗ реакцій аргіназного шляху метаболізму L-аргініну, на що вказує зменшення активності орнітиндекарбоксилази – з 275.4 ± 10.2 до 205.3 ± 9.8 нмоль/г·хв. (на 25.5%, $p < 0.01$).

Орнітиндекарбоксилаза є ключовим ферментом у механізмі синтезу поліамінів, які регулюють процеси реплікації та транскрипції ДНК, біосинтезу білків і проліферації клітин (Moinard C. et al., 2005). За даними літератури, неокисний (аргіназний) шлях конкурує з NOS за субстрат, тобто, може обмежувати продукцію NO (Wu G. et al., 2009).

Таким чином, відтворення метаболічного синдрому призводить у тканинах піднижньощелепних СЗ до реципрокних змін окисного (NO-синтазного) й неокисного (аргіназного) шляхів метаболізму L-аргініну: посилення сумарної активності NOS і вмісту продуктів окиснення NO – нітрит-йонів, з одного боку, та зменшення активності орнітиндекарбоксилази, з іншого боку.

За результатами контрольної серії, у тканинах піднижньощелепних СЗ інтактних тварин загальний фон продукції O_2^- складає 0.89 ± 0.09 нмоль/г·с. Вироблення O_2^- НАДФН-залежними ЕТЛ (мікросомальним і NOS) і НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ складає відповідно 16.13 ± 0.77 нмоль/г·с та 16.80 ± 0.33 нмоль/г·с.

Моделювання МС призводить до достовірних змін продукції $\cdot\text{O}_2^-$ у тканинах піднижньощелепних СЗ. Так, загальний фон генерації $\cdot\text{O}_2^-$ підвищується на 42.7% ($p < 0.02$). Вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ НАДФН-залежними ЕТЛ (мікосомальним і NOS) зростає – на 48.8% ($p < 0.001$), а мітохондріальним ЕТЛ – на 53.2% ($p < 0.001$).

За нашими даними, концентрація ТБК-активних сполук у тканинах піднижньощелепних СЗ інтактних щурів до та після 1.5-годинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині складає відповідно – 24.6 ± 0.9 та 32.7 ± 1.2 мкмоль/кг. Приріст концентрації ТБК-активних сполук за час інкубації – 8.1 ± 0.6 мкмоль/кг.

Моделювання МС призводить до істотних змін показників пероксидації. Так, концентрація ТБК-активних сполук зростає в тканинах піднижньощелепних СЗ: до інкубації – на 52.4% ($p < 0.001$), після інкубації – на 51.4% ($p < 0.001$), що вказує на активацію у піднижньощелепних СЗ процесів ПОЛ.

Приріст концентрації ТБК-активних сполук за час 1.5-годинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині також збільшується в тканинах піднижньощелепних СЗ – на 48.1% ($p < 0.01$) – у порівнянні з даними інтактною групи, що вказує на суттєве зниження АО потенціалу.

Це також підтверджується істотним зменшенням активності у тканинах піднижньощелепних СЗ антиоксидантних ферментів.

Так, активність СОД зменшується з 0.24 ± 0.02 од. акт. до 0.15 ± 0.02 од. акт. (на 37.5%, $p < 0.02$). Активність каталази знижується з 2.79 ± 0.21 мккатал/кг до 1.80 ± 0.16 мккатал/кг (на 35.5%, $p < 0.01$).

За результатами дослідження, у тканинах піднижньощелепних СЗ інтактних тварин активність α -амілази становить – 75.4 ± 2.2 мг/год \times г, що узгоджується з даними літературних джерел (Коваленко О.В., 2012; Стасюк О.А., 2013).

За умов МС активність α -амілази у тканинах піднижньощелепних СЗ зменшується на 19.1% ($p < 0.01$).

Таким чином, відтворення метаболічного синдрому супроводжується у тканинах піднижньощелепних СЗ білих щурів достовірним зниженням активності α -амілази, що вказує на порушення білоксинтезуючої функції цих залоз.

2. Роль ізоформ NO-синтаз у патогенезі порушень окиснювальних процесів та функції слинних залоз за умов відтворення експериментального метаболічного синдрому

При введенні селективного інгібітора nNOS 7-NI за умов моделювання МС активність NOS у тканинах піднижньощелепних СЗ у порівнянні з даними другої серії достовірно не змінюється, проте концентрація нітрит-йонів зменшується – на 24.8% ($p < 0.02$). Останні розглядаються як «депо» оксиду азоту та за умов зниження його вироблення конститутивними NOS нітритредуктазний шлях стає важливим механізмом продукції NO, необхідного для забезпечення певного рівня кровопостачання тканин та їх функціонування (Реутов В.П. та співавт., 2005; Lundberg J.O. et al., 2009). Значення цього шляху значно зростає при порушеннях кисневого режиму тканин.

Призначення селективного інгібітора iNOS аміногуанідину за умов відтворення МС супроводжується значним зменшенням сумарної активності

NOS, яка на 58.0% ($p < 0.001$) поступається даним другої серії. Концентрація нітрит-йонів при цьому знижується на 52.3% ($p < 0.001$).

Введення селективного інгібітора nNOS 7-NI за умов моделювання MC не призводить до суттєвих змін активності орнітиндекарбоксилази в тканинах СЗ, у той час як введення селективного інгібітора iNOS аміногуанідину – на 28.2% ($p < 0.01$) – підвищує активність цього ферменту в порівнянні з даними другої серії.

Таким чином, за умов моделювання MC активність сумарної NOS у тканинах СЗ підвищується, головним чином, за рахунок iNOS. Пригнічення iNOS супроводжується у піднижньощелепних СЗ активацією конкуруючого аргіназного шляху метаболізму L-аргініну, що виявляється у збільшенні активності орнітиндекарбоксилази.

Введення селективного інгібітора nNOS 7-NI за цих умов суттєво не позначається на величині загального фону продукції $\cdot O_2^-$, проте підвищує його вироблення НАДФН-залежними ЕТЛ (мікосомальним і NOS) і НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ – відповідно на 15.5% ($p < 0.001$) та 14.5% ($p < 0.001$) у порівнянні з даними другої серії.

Застосування селективного інгібітора iNOS аміногуанідину за умов MC також істотно не позначається на величині загального фону продукції $\cdot O_2^-$, але достовірно зменшує продукцію $\cdot O_2^-$ НАДФН-залежними ЕТЛ мікосомальним і NOS) і НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ – відповідно на 10.5% ($p < 0.01$) та 18.1% ($p < 0.001$) у порівнянні з даними другої серії.

Отримані нами результати свідчать, що надлишкова продукція $\cdot O_2^-$ НАДФН-залежними ЕТЛ (мікосомальним і NOS) і НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ у тканинах піднижньощелепних СЗ білих щурів за умов експериментального MC пов'язана з функціонуванням iNOS.

Введення селективного інгібітора nNOS 7-NI за умов MC підвищує у гомогенаті піднижньощелепних СЗ концентрацію ТБК-активних сполук: до інкубації – на 15.5% ($p < 0.01$), після інкубації – на 13.7% ($p < 0.01$) у порівнянні з даними другої серії. Проте за цих умов приріст концентрації ТБК-активних сполук за час інкубації тканин СЗ у прооксидантному залізоаскорбатному буферному розчині достовірно не відрізняється від результату другої серії.

Одержані результати свідчать, що за умов експерименту функціональна активність nNOS у тканинах піднижньощелепних СЗ обмежує реакції ПОЛ, що, вочевидь, пов'язано з сигнальною функцією низьких концентрацій NO, що виробляється nNOS.

У той же час, введення 7-NI за умов експерименту достовірно не позначається на активності СОД та підвищує активність каталази – на 33.9% ($p < 0.05$) – у порівнянні з даними другої серії.

Ці зміни вказують, що активація nNOS сприяє зниженню активності каталази, що очевидно пов'язано зі здатністю NO зв'язуватися з активним центром цього ферменту та пригнічувати його активність, зокрема, через утворення ферікаталази-NO (Kim Y.S., Han S., 2000).

Внесення селективного інгібітора iNOS аміногуанідину за умов експериментального MC достовірно знижує у гомогенаті піднижньощелепних СЗ

як концентрацію ТБК-активних сполук до інкубації – на 38.5% ($p < 0.01$) – та після інкубації – на 38.8% ($p < 0.001$), так і величину приросту їх концентрації за час інкубації у прооксидантному буферному розчині – на 39.1% ($p < 0.001$) у порівнянні з даними другої серії, що вказує на суттєве обмеження ПОЛ за цих умов зі значним підвищенням антиоксидантного потенціалу тканин СЗ.

При цьому, оптимізація АО захисту також підтверджується підвищенням активності АО ферментів – СОД – на 46.7% ($p < 0.05$) та каталази – на 49.4% ($p < 0.01$).

Отримані результати свідчать, що стан ВРО та АО захисту у тканинах піднижньощелепних СЗ істотно залежить від функціонального стану іNOS.

Введення за умов відтворення МС селективного інгібітора nNOS 7-NI знижує активність α -амілази в тканинах піднижньощелепних СЗ – на 23.0% ($p < 0.01$) – у порівнянні з даними другої серії.

Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури щодо участі nNOS у забезпеченні білоксинтезуючої функції СЗ (Lomniczia A., Suburo A.M., Elverdinc J.C. et al., 2000; Sayardoust S, Ekström J., 2003; Proctor G.B., Carpenter G.H., 2007).

У той же час введення селективного інгібітора іNOS аміногуанідину підвищує активність α -амілази – на 10.2% ($p < 0.05$) – у порівнянні з даними другої серії.

3. Вплив субстрату NOS на окиснювальні процеси та функції слинних залоз за умов відтворення експериментального метаболічного синдрому

При внесенні L-аргініну за умов моделювання МС активність NOS у тканинах піднижньощелепних СЗ у порівнянні з даними другої серії достовірно не змінюється, проте концентрація нітрит-йонів зменшується – на 28.9% ($p < 0.05$).

Звертає на себе увагу, що за умов експерименту у тканинах піднижньощелепних СЗ на 23.9% ($p < 0.05$) підвищується активність орнітиндекарбоксилази.

Таким чином, отримані нами дані не виявляють феномен «аргінінового парадоксу» при оцінці активності NOS у тканинах піднижньощелепних СЗ щурів за умов відтворення МС. Проте введення L-аргініну за цих умов істотно обмежує зниження активності орнітиндекарбоксилази, що, вочевидь, пов'язано з оптимізацією функціонування неокисного (аргіназного) шляху метаболізму цієї амінокислоти.

Введення щурам L-аргініну за умов відтворення МС достовірно не позначається на величині загального фону продукції $\cdot\text{O}_2^-$ та продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ, але зменшує вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ НАДФН-залежними ЕТЛ – на 15.0% ($p < 0.01$) у порівнянні з даними другої серії.

Отриманий результат підтверджує здатність L-аргініну попереджати роз'єднання переносу електронів в оксигеназних ферментах, запобігаючи тим самим утворенню $\cdot\text{O}_2^-$ (Xia Y. et al., 1998).

Введення тваринам L-аргініну під час відтворення МС достовірно не позначається на концентрації ТБК-активних продуктів та їх прирості за час

півторигодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині у порівнянні з даними другої серії.

Оцінка активності АО ферментів (СОД і каталази) у тканинах піднижньощелепних СЗ за умов експериментального МС також не виявила достовірних відмінностей отриманих результатів від даних другої серії.

Введення тваринам L-аргініну під час моделювання МС достовірно не впливає на величину активності α -амілази у тканинах піднижньощелепних СЗ у порівнянні з даними другої серії.

Таким чином, введення білим щурам L-аргініну за умов експериментального МС суттєво не впливає на білоксинтезуючу функцію піднижньощелепних слинних залоз.

4. Роль пероксинітриту у патогенезі порушень окиснювальних процесів та функції слинних залоз за умов відтворення експериментального метаболічного синдрому

При внесенні L-селенометіоніну за умов моделювання МС активність NOS і концентрація нітрит-йонів 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 піднижньощелепних СЗ підвищується активність орнітиндекарбоксилази – на 25.6% ($p < 0.05$) у порівнянні з даними другої серії.

Таким чином, дисбаланс NOS та аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну у тканинах піднижньощелепних СЗ за умов експериментального МС є пероксинітрит-залежним процесом.

Введення білим щурам L-селенометіоніну за цих умов достовірно не впливає на величину загального фону продукції O_2^- у тканинах СЗ, але знижує його вироблення 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 O_2^- НАДФН-залежним (мікросомальним та NOS) і НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ при дії скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну, за нашою думкою, відображує здатність пероксинітриту порушувати у клітинах функціонування цих ланцюгів (інактивувати НАДН- та НАДФН-залежні оксидоредуктази, руйнувати FeS-кластери) (Szabó S. et al., 2007). У мітохондріях пероксинітрит пригнічує комплекси МФК I (НАДН-дегідрогеназа), МФК II (сукцинатдегідрогеназа), 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 (Radi R. et al., 2002; Brown G.C., Borutaite V., 2004; Pearce L.L. et al., 2005). Нітрування пероксинітритом Mn-СОД запобігає дисмутації O_2^- з подальшою участю останнього в утворенні пероксинітриту (MacMillan-Crow L.A., Thompson J.A., 1999). Тобто, цей механізм функціонує з ознаками «зачарованого» кола.

Введення тваринам L-селенометіоніну за умов відтворення МС достовірно зменшує концентрацію ТБК-активних сполук: до інкубації – на 21.9% ($p < 0.001$), після інкубації – на 23.2% ($p < 0.001$). 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 приросту концентрації ТБК-активних сполук за час інкубації при призначенні L-селенометіоніну вказує на цього здатність обмежувати зниження АО потенціалу в тканинах СЗ за умов моделювання МС, 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.

Введення тваринам L-селенометіоніну за умов моделювання МС підвищує у тканинах піднижньощелепних СЗ активність α -амілази – на 16.4% ($p < 0.02$) у порівнянні з даними другої серії.

Таким чином, призначення білим щурам скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну за умов експериментального МС істотно покращує білоксинтезуючу функцію піднижньощелепних СЗ.

5. Роль NF- κ B у механізмах порушень окиснювальних процесів та функції слинних залоз за умов відтворення експериментального метаболічного синдрому

Введення як JSH-23, так і метформіну гідрохлориду, за умов експерименту викликає достовірне зменшення сумарної активності NOS, 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- κ B-залежної активації транскрипції гена iNOS (Napetschnig J., Wu H., 2013).

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 експериментального МС у тканинах піднижньощелепних 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.

Застосування JSH-23 за умов відтворення МС істотно не позначається на величині загального фону продукції $\cdot\text{O}_2^-$ у тканинах піднижньощелепних СЗ, але знижує його вироблення НАДФН і НАДН-залежними ЕТЛ – відповідно на 22.8% ($p < 0.001$) та 26.9% ($p < 0.001$) у порівнянні з даними другої серії.

Застосування метформіну гідрохлориду за умов експерименту також достовірно не впливає на величину загального фону продукції $\cdot\text{O}_2^-$ у тканинах піднижньощелепних СЗ, проте знижує його генерацію НАДФН і НАДН-залежними ЕТЛ – відповідно на 20.5% ($p < 0.001$) та 25.4% ($p < 0.001$) у порівнянні з даними другої серії.

Введення JSH-23 за умов моделювання МС знижує концентрацію ТБК-активних сполук: до інкубації – на 14.1% ($p < 0.001$), після інкубації – на 15.6% ($p < 0.001$) у порівнянні з результатом другої серії. Проте приріст концентрації ТБК-активних сполук за час інкубації у прооксидантному залізоаскорбатному буферному розчині достовірно не відрізняється від даних другої серії.

Застосування метформіну гідрохлориду за умов експерименту також знижує концентрацію ТБК-активних сполук: до інкубації – на 9.1% ($p < 0.05$), після інкубації – на 12.5% ($p < 0.01$) у порівнянні з результатом другої серії. Приріст концентрації ТБК-активних сполук за час інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині також не відрізняється від даних другої серії.

Отримані нами результати свідчать, що розвиток 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 – малоновий діальдегід), здатні регулювати redox-чутливі фактори транскрипції – NF- κ B і AP-1 – через відповідні протеїнкіназні каскади (Дадали В.А., Дубинина Е.Е., 2010; Yadav U.C., Ramana K.V., 2013). Таким чином, у цьому випадку ми також 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 застосування JSH-23 та метформіну гідрохлориду.

Введення тваринам JSH-23 за умов моделювання МС підвищує у тканинах піднижньощелепних СЗ активність α -амілази – на 13.0% ($p < 0.05$) у порівнянні з даними другої серії.

Застосування за умов експерименту метформіну гідрохлориду не позначається на змінах активності α -амілази у тканинах піднижньощелепних СЗ у порівнянні з результатом другої серії.

Таким чином, призначення білим щурам інгібітора активації NF- κ B II JSH-23 за умов експериментального МС істотно покращує білоксинтезуючу функцію піднижньощелепних СЗ. Введення метформіну гідрохлориду суттєво не позначається на стані білоксинтезуючої функції піднижньощелепних СЗ при моделюванні МС.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведене теоретичне узагальнення і розв'язання наукової задачі, що полягає у визначенні ролі компонентів системи оксиду азоту (різних ізоформ NO-синтази, її субстрату, пероксинітриту) та транскрипційного ядерного фактора κ B у патогенезі функціонально-метаболических порушень піднижньощелепних СЗ щурів за умов відтворення експериментального метаболического синдрому.

1. Відтворення метаболического синдрому призводить у тканинах піднижньощелепних СЗ до реципрокних змін окисного (NO-синтазного) й неокисного (аргіназного) шляхів метаболізму L-аргініну: посилення сумарної

активності NOS (у 2.07 рази, $p < 0.001$) і вмісту продуктів окиснення NO – нітрит-йонів (у 1.33 рази, $p < 0.05$), з одного боку, та зменшення активності орнітиндекарбоксилази (на 25.5%, $p < 0.01$), з іншого.

2. Відтворення метаболічного синдрому супроводжується у тканинах піднижньощелепних СЗ посиленням загального фону продукції O_2^- (на 42.7%, $p < 0.02$) та його генерації мітохондріальним (на 53.2%, $p < 0.001$) і НАДФН – залежними ЕТЛ (мікосомальним і NOS, на 48.8%, $p < 0.001$), активацією процесів пероксидного окиснення ліпідів, зниженням антиоксидантного потенціалу, активності супероксиддисмутази (на 37.5%, $p < 0.02$) та каталази (на 35.5%, $p < 0.01$), порушеннями білоксинтезуючої функції цих залоз.

3. За умов моделювання МС активність сумарної NOS у тканинах СЗ підвищується, головним чином, за рахунок іNOS. Пригнічення іNOS супроводжується у піднижньощелепних СЗ активацією конкуруючого аргіназного шляху метаболізму L-аргініну, що виявляється у збільшенні активності орнітиндекарбоксилази (на 28.2%, $p < 0.01$).

4. Функціональна активність nNOS за умов експериментального МС зменшує у тканинах піднижньощелепних СЗ продукцію супероксидного аніон-радикала НАДФН- і НАДН-залежним ЕТЛ, обмежує активацію пероксидного окиснення ліпідів, але знижує активність каталази та істотно не позначається на стані антиоксидантного потенціалу. Функціонування nNOS за умов відтворення МС сприяє збільшенню активності α -амілази у тканинах піднижньощелепних СЗ, що вказує на роль nNOS у забезпеченні їхньої білоксинтезуючої функції.

5. Функціональна активність іNOS за умов експериментального МС збільшує у тканинах піднижньощелепних СЗ продукцію супероксидного аніон-радикала НАДФН- і НАДН-залежним ЕТЛ, призводить до активації у них декомпенсованого пероксидного окиснення ліпідів, що супроводжується виснаженням антиоксидантного потенціалу, зменшенням активності СОД і каталази, порушенням білоксинтезуючої функції цих залоз.

6. Введення білим щурам екзогенного L-аргініну під час відтворення МС не супроводжується феноменом «аргінінового парадоксу» при оцінці активності NOS у тканинах піднижньощелепних СЗ, але оптимізує функціонування неокисного (аргіназного) шляху метаболізму цієї амінокислоти, знижує продукцію у тканинах СЗ супероксидного аніон-радикала НАДФН-залежними електронно-транспортними ланцюгами (на 15.0%, $p < 0.01$) без істотних змін стану процесів пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантного потенціалу.

7. Дисбаланс NOS та аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну та активація вільнорадикальних реакцій у тканинах піднижньощелепних СЗ за умов експериментального МС є пероксинітрит-залежними процесами. Введення білим щурам скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну за цих умов знижує у тканинах СЗ активність NOS (на 27.4%, $p < 0.01$) і концентрацію нітрит-йонів (40.3%, $p < 0.01$), підвищує активність ферменту аргіназного шляху метаболізму L-аргініну – орнітиндекарбоксилази (на 25.6%, $p < 0.05$), знижує продукцію супероксидного аніон-радикала НАДФН-залежними (на 6.1%, $p < 0.05$) і НАДН-залежним (на 10.3%, $p < 0.001$) електронно-транспортними ланцюгами, обмежує активність пероксидного окиснення ліпідів і підвищує стан антиоксидантного

захисту та білоксинтезуючої функції СЗ.

8. Введення інгібіторів активації NF-κB JSH-23 та метформіну гідрохлориду під час відтворення МС знижує сумарну активність NOS (відповідно на 35.5%, $p < 0.001$, та 20.2%, $p < 0.05$) і концентрацію продуктів окиснення NO – нітрит-йонів (на 36.2%, $p < 0.01$) – у тканинах піднижньощелепних СЗ, пригнічує у них продукцію супероксидного аніон-радикала НАДФН-залежними (на 22.8%, $p < 0.001$, та 20.5%, $p < 0.001$) і НАДН-залежним (на 26.9%, $p < 0.001$, та 25.4%, $p < 0.001$) електронно-транспортними ланцюгами, обмежує утворення вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ТБК-активних сполук – на 14.1%, $p < 0.001$, та 9.1%, $p < 0.05$) без істотних змін антиоксидантного потенціалу. Призначення інгібітора ядерної транслокації NF-κB JSH-23 за умов експерименту покращує білоксинтезуючу функцію піднижньощелепних СЗ, що не є характерним при застосуванні метформіну гідрохлориду.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Одержані результати обґрунтовують доцільність клінічного дослідження ефективності застосування засобів, що впливають на активність ізоформ NO-синтаз і NF-κB-сигналізації, з метою попередження та корекції пошкодження СЗ за умов метаболічного синдрому.

2. На підставі отриманих даних доцільно рекомендувати проведення клінічних досліджень ефективності застосування L-селенометіоніну та інгібіторів активації NF-κB як перспективних засобів корекції функціонально-метаболічного стану СЗ за умов МС.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Роль слинних залоз у механізмах ауторегуляції рівня оксиду азоту в організмі ссавців та їх порушень / В.О. Костенко, А.М. Єлінська, Л.І. Ляшенко, І.В. Нагорняк, О.А.Стасюк // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2013. – Т.13, №2. – С. 10-14. (Безпосередньо дисертанту належать дані щодо ролі слинних залоз у порушенні механізму ауторегуляції утворення оксиду азоту в організмі щурів за умов метаболічного синдрому).

2. 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 мед. та біол.– 2014. – № 2. – С. 139-142. (Особиста участь дисертанта – в аналізі літературних даних, в організації та проведенні досліджень слинних залоз, інтерпретації результатів, написанні статті).

3. Єлінська А.М. Роль пероксинітриду у механізмах вільнорадикальних процесів у слинних залозах за умов відтворення експериментального метаболічного синдрому / А.М. Єлінська, Н.В. Соловйова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2014. – Т.14, №3. – С. 198-201. (Особиста участь дисертанта – в аналізі літературних даних, в організації та проведенні досліджень, інтерпретації результатів, написанні статті).

4. Єлінська А.М. Роль ядерного фактора кВ у механізмах порушень окиснювальних процесів у слинних залозах за умов відтворення експериментального метаболічного синдрому / А.М. Єлінська, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2014. – Т.14, №4. – С. 192-195. (Особиста участь дисертанта – в аналізі літературних даних, в організації та проведенні досліджень, інтерпретації результатів, написанні статті).

5. Єлінська А.М. NO- та NF-кВ –залежні механізми порушення білоксинтезуючої функції слинних залоз щурів за умов експериментального метаболічного синдрому / / А.М. Єлінська, В.О. Костенко // Світ мед. та біол.– 2014. – № 4. – С. 120-123. (Особиста участь дисертанта – в аналізі літературних даних, в організації та проведенні досліджень, інтерпретації результатів, написанні статті).

6. NO- и пероксинитрит-зависимые изменения продукции супероксидного анион-радикала в органах крыс при экспериментальном метаболіческом синдроме / В.А. Костенко А.Н. Елинская, Л.И. Ляшенко, Н.В. Соловьева, В.В. Талаш // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2014. – №2 (46). – С. 74–77. (Особиста участь дисертанта – в аналізі літературних даних, в організації та проведенні досліджень слинних залоз, інтерпретації результатів, написанні статті).

7. Роль NF-кВ-опосредованных эффектов NO в механизмах метаболіческих расстройств при избыточном образовании оксида азота / Н.В. Соловьева, Л.И. Ляшенко, В.В. Талаш, А.Н. Елинская, Б.О. Шаталин // Актуальные проблемы патофизиологии : XVIII межгор. конф. мол. ученых. – СПб., 2012. – С. 114–116. (Безпосередньо здобувачу належать дані щодо ролі NF-кВ- та NO-синтаз у патогенезі метаболічних розладів у СЗ за умов МС).

8. NF-кВ- та NO-залежні механізми метаболічних розладів при надмірному утворенні в організмі оксиду азоту / В.О. Костенко, Н.В. Соловйова, Л.І. Ляшенко, В.В. Талаш, А.М. Єлінська, Б.В. Сорокін, Д.О. Хміль, Б.О. Шаталін // VI конгрес патофізіологів України : мат. // Таврический медико-биол. вестн. – 2012. – Т.15, №3. – Ч.2. – С.342-343. (Безпосередньо здобувачу належать дані щодо ролі NF-кВ- та NO-синтаз у патогенезі метаболічних розладів у СЗ за умов МС).

9. Патологічний системогенез при метаболічному синдромі / В.О. Костенко, Н.В. Соловйова, А.М. Єлінська, Л.І. Ляшенко, В.В. Талаш, О.П. Шумейко // Медична наука в практику охорони здоров'я : Всеукр. наук.-практ. конф. : мат. доп. (Полтава, 23 листопада 2012 р.). – Полтава, 2012. – С. 70. (На підставі проведених здобувачем досліджень сформульована концепція загальних закономірностей патологічного системогенезу за умов МС).

10. Дизрегуляторні механізми ушкодження слинних залоз та пародонта за умов надлишкового утворення оксиду азоту / В.О. Костенко, О.В. Богданов, А.М. Єлінська, Л.І. Ляшенко, І.В. Нагорняк // Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів : наук.-практ. конф. (Тернопіль, 31 жовтня – 1 листопада 2013 р.) : мат. // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2013. – №2.

– С. 254. (Безпосередньо здобувачу належать дані щодо впливу надлишкового утворення NO на метаболізм у СЗ за умов МС).

11. NO-зависимые механизмы расстройств окислительного обмена при экспериментальном метаболическом синдроме / А.Н. Елинская, Л.И. Ляшенко, Н.В. Соловьева, В.В. Талаш // Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье : XVII Всерос. мед.-биол. конф. молодых исследователей (с международным участием) : тезисы. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2014. – С. 149-150. [Фундам. наука клин. мед. – 2014. – Т. 17. – С. 149-150]. (Безпосередньо здобувачу належать дані щодо ролі ізоформ NO-синтаз у патогенезі розладів окиснювальних процесів у СЗ за умов МС).

12. Роль NF-κB у механізмах NO-залежних порушень вільнорадикальних процесів за умов експериментального метаболічного синдрому / В.О. Костенко, А.М. Єлінська, Л.І. Ляшенко, Н.В. Соловйова, В.В. Талаш // Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології : мат. VI Пленуму наук. тов. патофізіологів України та наук.-практ. конф. за участю міжнародних спеціалістів, Вінниця, 23-25 вересня 2014 р. – Вінниця, 2014. – С. 37-38. (Безпосередньо здобувачу належать дані щодо ролі NF-κB- та NO-синтаз у патогенезі вільнорадикальних порушень у СЗ за умов МС).

13. Вплив інгібіторів NF-κB на активність NO-синтази в тканинах щурів за умов відтворення експериментального метаболічного синдрому та інтоксикацій / Л.І. Ляшенко, А.М. Єлінська, В.В. Талаш, Н.В. Соловйова, В.О. Богданов, І.В. Нагорняк // Медична наука в практику охорони здоров'я : Всеукр. наук.-практ. конф. : мат. доп. (Полтава, 21 листопада 2014 р.). – Полтава, 2014. – С. 83. (Безпосередньо здобувачу належать дані щодо ролі NF-κB- та NO-синтаз у патогенезі метаболічних розладів у СЗ за умов МС).

14. Пат. 93517 Україна, МПК G09B 23/28. Спосіб моделювання метаболічного синдрому / Кайдашев І.П., Костенко В.О., Талаш В.В., Єлінська А.М., Ляшенко Л.І., Соловйова Н.В. ; № и 2014 02769 ; заявл. 19.03.2014, опубл. 10.10.2014, Бюл. № 19.

АНОТАЦІЯ

Єлінська А.М. NO- та NF-κB-залежні механізми ураження слинних залоз щурів за умов експериментального метаболічного синдрому. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. – Сумський державний університет МОН України. – Суми, 2015.

Дисертація присвячена вирішенню наукової задачі, яка полягає у визначенні ролі компонентів системи оксиду азоту (різних ізоформ NO-синтази (NOS), її субстрату, пероксинітриту) та транскрипційного ядерного фактора κB у патогенезі функціонально-метаболічних порушень піднижньощелепних слинних залоз (СЗ) щурів за умов відтворення експериментального метаболічного синдрому (МС).

У роботі показано, що відтворення МС призводить у тканинах СЗ до реципрокних змін окисного (NO-синтазного, головним чином, за рахунок

гіперактивності індуцибельної NOS (iNOS)) й неокисного (аргіназного) шляхів метаболізму L-аргініну та посилення загального фону продукції супероксидного аніон-радикала (O_2^-) та його генерації мітохондріальним і НАДФН-залежними (мікосомальним і NOS) електронно-транспортними ланцюгами (ЕТЛ) з подальшою активацією процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) і зниженням антиоксидантного (АО) потенціалу.

Виявлено, що функціональна активність нейрональної NOS (nNOS) за умов експериментального МС зменшує у тканинах піднижньощелепних СЗ продукцію O_2^- НАДФН- і НАДН-залежним ЕТЛ, обмежує активацію ПОЛ, але знижує активність каталази та істотно не позначається на стані АО потенціалу. Функціонування nNOS за умов відтворення МС сприяє збільшенню активності α -амілази у тканинах піднижньощелепних СЗ.

Показано, що дисбаланс NOS та аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну та активація вільнорадикальних реакцій у тканинах піднижньощелепних СЗ за умов експериментального МС є пероксинітрит- та NF- κ B-залежними процесами. Введення білим щурам скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну та інгібіторів активації NF- κ B JSH-23 (4-метил-N-(3-фенілпропіл)бензол-1,2-діаміну) та метформіну гідрохлориду під час відтворення МС знижує у тканинах СЗ активність NOS, продукцію O_2^- НАДФН-залежними і НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ, обмежує активність ПОЛ і підвищує стан АО захисту. Призначення L-селенометіоніну та інгібітора ядерної транслокації NF- κ B JSH-23 за умов експерименту покращує білоксинтезуючу функцію піднижньощелепних СЗ, що не є характерним при застосуванні метформіну гідрохлориду.

Ключові слова: метаболічний синдром, оксид азоту, NO-синтази, L-аргінін, пероксинітрит, L-селенометіонін, ядерний фактор κ B, слинні залози.

АННОТАЦІЯ

Елинская А.Н. NO- и NF- κ B-зависимые механизмы повреждения слюнных желез крыс в условиях экспериментального метаболического синдрома. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.04 - патологическая физиология. - Сумской государственный университет МОН Украины. - Сумы, 2015.

Диссертация посвящена решению научной задачи, которая заключается в определении роли компонентов системы оксида азота (разных изоформ NO-синтазы, ее субстрата, пероксинитрита) и транскрипционного ядерного фактора κ B в патогенезе функционально-метаболических нарушений поднижнечелюстных слюнных желез (СЖ) крыс в условиях воспроизведения экспериментального метаболического синдрома (МС).

Эксперименты выполнены на 85 белых крысах-самцах линии Вистар массой 180-230 г. Используются экспериментальные и биохимические методы исследования слюнных желез.

В работе показано, что воспроизведение МС приводит в тканях поднижнечелюстных СЖ к реципрокным изменениям окислительного (NO-

синтазного) и неокислительного (аргиназного) путей метаболизма L-аргинина (усиление суммарной активности NO-синтаз (NOS) и содержания продуктов окисления NO - нитрит-ионов, с одной стороны, и уменьшение активности орнитиндекарбоксилазы, с другой). Этот процесс сопровождается усилением общего фона продукции супероксидного анион-радикала ($\cdot\text{O}_2^-$) и его генерации митохондриальной и НАДФН-зависимыми электронно-транспортными цепями (микросомальной и NOS), активацией процессов пероксидного окисления липидов (ПОЛ), снижением антиоксидантного (АО) потенциала, активности супероксиддисмутазы и каталазы, нарушениями белоксинтетической функции СЖ.

Выявлено, что в условиях моделирования МС активность суммарной NOS в тканях СЖ повышается, главным образом, за счет индуцибельной NOS (iNOS). Угнетение iNOS сопровождается в поднижнечелюстных СЖ активацией конкурирующего аргиназного пути метаболизма L-аргинина, что выражается в увеличении активности орнитиндекарбоксилазы.

Показано, что функциональная активность нейрональной NOS (nNOS) в условиях экспериментального МС уменьшает в тканях поднижнечелюстных СЖ продукцию $\cdot\text{O}_2^-$ НАДФН- и НАДН-зависимыми электронно-транспортными цепями, ограничивает активацию ПОЛ, но снижает активность каталазы и существенно не влияет на АО потенциал. Функционирование nNOS в условиях воспроизведения МС способствует увеличению активности α -амилазы в тканях поднижнечелюстных СЖ. Функциональная активность iNOS в условиях эксперимента увеличивает в тканях поднижнечелюстных СЖ продукцию $\cdot\text{O}_2^-$ НАДФН- и НАДН-зависимыми электронно-транспортными цепями, приводит к активации в них декомпенсированного ПОЛ, сопровождается истощением антиоксидантного потенциала, уменьшением активности СОД и каталазы, нарушением белоксинтетической функции этих желез.

Выявлено, что введение крысам экзогенного L-аргинина при воспроизведении МС не сопровождается феноменом «аргининового парадокса» при оценке активности NOS в тканях поднижнечелюстных СЖ крыс, но оптимизирует функционирование неокислительного (аргиназного) пути метаболизма этой аминокислоты, снижает продукцию в тканях СЖ $\cdot\text{O}_2^-$ НАДФН-зависимыми электронно-транспортными цепями.

Показано, что дисбаланс NOS и аргиназного путей метаболизма L-аргинина и активация свободнорадикальных реакций в тканях поднижнечелюстных СЖ в условиях экспериментального МС является пероксинитрит- и NF- κ B-зависимыми процессами. Введение белым крысам скэвнджера пероксинитрита L-селенометионина и ингибиторов активации NF- κ B JSH-23 (4-метил-N-(3-фенилпропил) бензол-1,2-диамина) и метформина гидрохлорида при воспроизведении МС снижает в тканях СЖ активность NOS, продукцию $\cdot\text{O}_2^-$ НАДФН-зависимыми и НАДН-зависимым (митохондриальным) электронно-транспортными цепями, ограничивает активацию ПОЛ и повышает состояние АО защиты. Назначение L-селенометионина и ингибитора ядерной транслокации NF- κ B JSH-23 в условиях эксперимента улучшает белоксинтезирующую функцию

поднижнечелюстных СЖ, что не характерно при применении метформина гидрохлорида.

Ключевые слова: метаболический синдром, оксид азота, NO-синтазы, L-аргинин, пероксинитрит, L-селенометионин, ядерный фактор κB, слюнные железы.

SUMMARY

Yelinska A.M. NO- and NF-κB-dependent mechanisms affecting salivary glands in rats under modeled metabolic syndrome. – A manuscript.

Thesis for a Candidate of Medical Sciences degree on Specialty 14.03.04. – Pathological Physiology. – Sumy State University, Ministry of Education and Science of Ukraine. – Sumy, 2015.

This dissertation is devoted to solving the problem which consists in the determining the role of NO-system components (different isoforms of NO-synthase, its substrate, peroxynitrite) and transcription nuclear factor κB in the pathogenesis of functional and metabolic disorders of submandibular salivary glands (SG) in rats under modeled metabolic syndrome (MS).

This work has demonstrated the modeling of MS in SG tissues results in reciprocal changes in oxidative (mainly, NO-synthase way due to iNOS hyperactivation) and non-oxidative (arginase) metabolic pathways of L-arginine and enhancing the total production of anion-radical superoxide (O_2^-) production, and its generation by mitochondrial and NADPH-dependent electron transport chains (microsomal and NOS) with following activation of processes of lipid peroxidation and reducing of antioxidant (AO) potential.

It has been found out the functional activity of nNOS in modeled MS reduces the O_2^- production by NADPH-dependent and NADH-dependent electron transport chains (ETC), limits lipid peroxidation, but does not suppress the catalase activity and does not affect sufficiently on AO potential SG tissues. Functioning of nNOS in modeled MS promotes the growth of α-amylase activity in the tissues of submandibular SG.

This research has revealed the imbalance of NOS and arginase ways of L-arginine metabolism and activation of free-radical reactions in the tissues of submandibular SG in modeled MS is caused by peroxynitrite-dependent as well as NF-κB-dependent processes.

The introduction of peroxynitrite scavenger L-selenomethionine and NF-κB activation inhibitors as JSH-23 and metformin hydrochloride under the experimental MS lowered NOS activity, O_2^- production by NADPH-dependent and NADH-dependent (mitochondrial) ETC, limited lipid peroxidation activity and increased of AO protection in the SG tissues.

L-selenomethionine introduction and an inhibitor of nuclear translocation NF-κB JSH-23 (4-methyl-N-(3-phenylpropyl)benzene-1,2-diamine) under experimental conditions improves protein-synthesizing function by submandibular SG that is far from being typical when metformin hydrochloride is administered.

Key words: metabolic syndrome, nitric oxide, NO-synthase, L-arginine, peroxynitrite, L-selenomethionine, salivary glands, nuclear factor κB.