

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© Акімов О.Є.

УДК 616.33-098:599.323.4

DOI <https://doi.org/10.31718/mep.2022.26.1-2.01>

РОЛЬ АКТИВАЦІЇ ТРАНСКРИПЦІЙНОГО ФАКТОРА AP-1 У ЗМІНАХ ПРОДУКЦІЇ ТА УТИЛІЗАЦІЇ ОКСИДУ АЗОТУ У СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ШЛУНКА ЩУРІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ФТОРИДНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

Акімов О.Є.

Полтавський державний медичний університет

Millions of people are affected by excessive fluoride intake. The effect of fluorides on the activation or inhibition of redox-sensitive transcription factors remains poorly understood. The aim of this research is to examine the effect of activation of the transcription factor AP-1 on changes in the activity of inducible NO synthase and constitutive isoforms of NO synthase, concentrations of peroxynitrites of alkali and alkaline earth metals, concentrations of nitrites and nitrosothiols in the gastric mucosa of rats under conditions of chronic fluoride intoxication. The study was conducted on 18 adult male Wistar rats weighing 220-260 g. Experimental animals were randomly divided into 3 groups of 6 animals each: control, chronic fluoride intoxication group and AP-1 transcription factor blockade group. Chronic fluoride intoxication was simulated by the administration of sodium fluoride at a dose of 10 mg / kg for 30 days. AP-1 blockade was performed by administering SR11302 at a rate of 15 mg / kg twice a week. In the gastric mucosa, the following was studied: the activities of constitutive and inducible isoforms of NO synthase, the concentration of nitrites, peroxynitrites and nitrosothiols. Chronic fluoride intoxication reduces the activity of constitutive NO synthases by 37.73% and increases the activity of inducible NO synthase by 1.61 times. The concentration of peroxynitrites increases by 2.68 times, nitrites – by 1.74 times, and nitrosothiols – by 1.88 times. Blockade of AP-1 reduces the activity of inducible isoform by 2.11, does not affect the activity of constitutive isoforms, and reduces the concentration of peroxynitrites by 1.98 times, nitrites – by 2.10 times, and nitrosothiols – by 2.37 times. Activation of the transcription factor AP-1 under conditions of chronic excessive fluoride intake leads to increased production of nitric oxide in the gastric mucosa of rats, enhances its oxidation to nitrites, promotes the formation of nitrosyl groups in the reaction with low molecular weight donors of thiol groups and increases the peroxidation of nitric oxide with the formation of peroxynitrite.

Keywords: nitric oxide, activator protein-1, gastric mucosa, rats, peroxynitrite, nitrosothiols.

Впливу надлишкового надходження фтору на організм зазнають мільйони людей. Вплив фторидів на активацію чи інгібіцію редокс-чутливих транскрипційних факторів залишається недостатньо вивченим. Метою даної роботи є дослідження впливу активації транскрипційного фактора AP-1 на зміни активності індукцибельної NO-синтази та конститутивних ізоформ NO-синтази, концентрації пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів, концентрації нітритів та нітрозотіолів в слизовій оболонці шлунка щурів за умов хронічної фторидної інтоксикації. Дослідження проведено на 18 статевозрілих щурах-самцях лінії «Вістар» масою 220-260 г. Дослідні тварини були рандомізовано розподілені на 3 групи по 6 тварин у кожній: контрольна, група хронічної фторидної інтоксикації та група блокади транскрипційного фактора AP-1. Хронічну фторидну інтоксикацію відтворювали шляхом введення фториду натрію у дозі 10 мг/кг протягом 30 діб. Блокаду AP-1 здійснювали шляхом введення SR11302 з розрахунку 15 мг/кг два рази на тиждень. В слизовій оболонці шлунка досліджували: активності конститутивних та індукцибельної ізоформ NO-синтази, концентрацію нітритів, пероксинітритів та нітрозотіолів. Хронічна фторидна інтоксикація зменшує активність конститутивних NO-синтаз на 37,73% та збільшує активність індукцибельної NO-синтази у 1,61 рази. Концентрація пероксинітритів зростає в 2,68 рази, нітритів у 1,74 рази, а нітрозотіолів у 1,88 рази. Блокада AP-1 призводить до зниження активності iNOS в 2,11, не впливає на активність конститутивних ізоформ, знижує концентрацію пероксинітритів в 1,98 рази, нітритів в 2,10 рази, а нітрозотіолів в 2,37 рази. Активація транскрипційного фактора AP-1 за умов хронічного надлишкового надходження фторидів до організму призводить до збільшення продукції оксиду азоту в слизовій оболонці шлунка щурів, посилює його окиснення до нітритів,

*Цитування при атестації кадрів: Акімов О.Є. Роль активації транскрипційного фактора ар-1 у змінах продукції та утилізації оксиду азоту у слизовій оболонці шлунка щурів за умов хронічної фторидної інтоксикації // Проблеми екології і медицини. – 2022. – Т. 26, № 1-2. – С. 3-6.

сприяє утворенню нітрозильних груп у реакції з низькомолекулярними донорами тіолових груп та збільшує перекисне окиснення оксиду азоту із утворенням пероксинітриту.

Ключові слова: оксид азоту, активаторний протеїн-1, слизова оболонки шлунку, щури, пероксинітрит, нітрозотіоли.

Вступ

Екологічне забруднення ґрунтових вод та ґрунтів призводить до накопичення в продуктах харчування небезпечних для здоров'я речовин. Іони фтору, найактивнішого галогену у природі, можуть потрапляти до ґрунтів та водою внаслідок роботи промислових підприємств або надходити із більш глибоких ґрунтових порід (геохімічні провінції).

В Китаї прикладом геохімічної провінції, у якій наявний високий вміст фтору у ґрунтових породах, є провінція Гуйчжоу у південно-західному регіоні КНР. В цій провінції проблеми із надлишковим надходженням фторидів до організму вперше були відмічені у 1946 році [1]. Було встановлено, що однією з причин фторидної інтоксикації у цій провінції є готування їжі з використанням вугілля, яке природно збагачене фтором. Враховуючи кількість населення даної провінції (~38 мільйонів осіб), слід відмітити велику кількість людей, що перебувають під негативним впливом надлишку фторидів. В Україні прикладом такої геохімічної провінції є деякі райони Полтавської області, у яких наявна надлишкова концентрація фтору у воді та ґрунтах. Отже надлишкове аліментарне надходження фторидів до організму є проблемою не лише України, а й глобального світового рівня.

Окрім геохімічних провінцій використання певних фунгіцидних речовин може призводити до накопичення фторидів в організмі. Проведене американськими вченими дослідження виявило, що використання сульфурилфториду для знищення термітів в штаті Каліфорнія може призводити до отруєння людей внаслідок вивільнення залишків сульфурилфториду із обробленої деревини навіть після встановлення її «безпеки» [2].

Потрапляючи до організму фториди можуть викликати низку патологічних змін, які пов'язані із збільшенням під впливом іонів фтору продукції активних форм кисню (АФК) та активних форм азоту (АФА) [3]. АФК та АФА окрім своєї здатності ушкоджувати біологічні полімери мають властивість виступати сигнальними молекулами та активувати певні клітинні програми. Наприклад АФК можуть активувати такі транскрипційні фактори, як NF- κ B та активаторний протеїн-1 (AP-1) [4]. Тому не виключено є АФК-залежна активація AP-1 при надлишковому надходженні фторидів до організму. В науковій літературі наведена обмежена кількість наукових даних щодо ролі активації AP-1 при фторидній інтоксикації.

Метою даної роботи є дослідження впливу активації транскрипційного фактора AP-1 на зміни активності індуктибельної NO-синтази та конститутивних ізоформ NO-синтази, концентрації пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів, концентрації нітритів та нітрозотіолів в слизовій оболонці шлунка щурів за умов хронічної фторидної інтоксикації.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведене на 18 статевозрілих щурах-самцях лінії «Вістар» масою 220-260 г. Дослідні тварини були рандомізовано розподілені на 3 групи по 6 тварин у кожній. Перша група була контрольною. Друга група – це тварини, на яких відтворювалась

хронічна фторидна інтоксикація (група ХФ). Хронічну фторидну інтоксикацію відтворювали шляхом щоденного внутрішньошлункового введення водного розчину фториду натрію у дозі 10 мг/кг протягом 30 діб. Також тваринам цієї групи робили ін'єкцію 0,1 мл розчину натрію хлориду 0,9% внутрішньоочеревинно два рази на тиждень Третя група – це група блокади активації транскрипційного фактора AP-1 на фоні моделювання хронічної фторидної інтоксикації як у групі ХФ (група іAP-1). Блокаду активації транскрипційного фактора AP-1 здійснювали шляхом внутрішньоочеревинного введення водного розчину SR11302 з розрахунку 15 мг/кг два рази на тиждень [5]. Тварини з контрольної групи отримували фізіологічний розчин внутрішньошлунково та ін'єкцію 0,1 мл фізіологічного розчину внутрішньоочеревинно 2 рази на тиждень протягом 30 днів. Всі маніпуляції проводились згідно «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей».

Виведення тварин з експерименту здійснювалось під тіопенталовим наркозом шляхом забору крові з правого шлуночка серця. Слизова оболонка шлунка відділялась від підлеглих тканин скапелем на холоді та гомогенізувалась з трис-буферним розчином (pH=7,4) для отримання 10% гомогенату. Всі біохімічні дослідження проводились в 10% гомогенаті з використанням спектрофотометра Ulab 101.

Активності конститутивних (cNOS) та індуктибельної (iNOS) ізоформ NO-синтази визначали за методом Єлінської А.М. [6]. Метод базується на визначенні приросту нітритів після інкубації у трис-буферному розчині (pH=7,4), який містить 0,3 мл 320 мМ розчину L-аргініну, 0,1 мл 8 мМ розчину НАДФ відновленого та специфічний інгібітор iNOS – аміногуанідин гідрохлорид. Концентрацію нітритів (NO₂⁻) визначали за допомогою реактиву Грісса у модифікації Ілосвая. Концентрацію пероксинітритів лужних та лужноземельних металів (ONOO⁻) визначали за допомогою специфічної реакції між ONOO⁻ та йодидом калію з утворенням атомарного йоду [6]. Концентрацію низькомолекулярних нітрозотіолів (S-NO) визначали по приросту концентрації нітритів після інкубації гомогенату слизової оболонки шлунку у середовищі, що містить окиснювач нітрозильних груп – хлорид ртуті (II) [7].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили із використанням програми Excel із пакету програм Microsoft Office та підпрограми для неї Real Statistics 2019. Для визначення статистичної значущості різниці між отриманими даними застосовувався непараметричний дисперсійний аналіз за Хрускалом-Уолісом з послідовним попарним порівнянням за методом Манна-Уїтні. Різницю між групами вважали статистично значущою при p<0,05.

Результати та їх обговорення

Хронічна фторидна інтоксикація призводить до зменшення продукції оксиду азоту від конститутивних форм NO-синтази на 37,73% при порівнянні з контрольною групою (табл.). Разом із цим продукція оксиду азоту від індуктибельної ізоформи NO-синтази зростає у 1,61 рази. Таким чином, за умов моделювання хронічної фторидної інтоксикації в слизовій оболонці

шлунка щурів відбувається збільшення продукції оксиду азоту за рахунок посилення його продукції від індукцибельної ізоформи NO-синтази.

Концентрація пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів у слизовій оболонці шлунка за умов хронічної фторидної інтоксикації зростає в 2,68 раза. Концентрація нітритів зростає у 1,74 раза. Концентрація низькомолекулярних нітрозотіолів зростає у

1,88 раза. Отже, надлишкове надходження фторидів до організму призводить до накопичення у слизовій оболонці шлунка окиснених (ONOO⁻, NO₂⁻) та неокиснених метаболітів оксиду азоту. Переважання окремого шляху метаболізації оксиду за умов хронічного надлишкового надходження іонів фтору у слизовій оболонці шлунка не виявлено. Надлишковий оксид азоту утилізується всіма дослідженими шляхами.

Таблиця

Продукція та метаболізм оксиду азоту в слизовій оболонці шлунка щурів за умов хронічної фторидної інтоксикації (M±m)

| Досліджувані біохімічні параметри | Групи | | |
|---|------------|------------|---------------|
| | Контрольна | Група ХФІ | Група іАР-1 |
| Активність іNOS, мкмоль/хв на г білка | 4,51±0,51 | 7,25±0,76* | 3,44±0,23** |
| Активність сNOS, мкмоль/хв на г білка | 0,55±0,03 | 0,37±0,05* | 0,30±0,02* |
| Концентрація ONOO ⁻ , мкмоль/г | 0,92±0,08 | 2,47±0,12* | 1,25±0,03*/** |
| Концентрація NO ₂ ⁻ , нмоль/г | 5,62±0,38 | 9,78±0,38* | 4,66±0,23** |
| Концентрація S-NO, мкмоль/г | 0,34±0,03 | 0,64±0,06* | 0,27±0,03** |

Примітка: * - дані статистично значуще відрізняються від контрольної групи (p<0,05).

** - дані статистично значуще відрізняються від групи ХФІ (p<0,05).

Блокада активації транскрипційного фактора AP-1 за умов хронічної фторидної інтоксикації призводить до зниження активності іNOS в 2,11 раза порівняно з групою ХФІ. Статистично значущих відмінностей між активністю іNOS в слизовій оболонці шлунка в контрольній групі та її активністю у групі іАР-1 не виявлено. Активність сNOS при блокаді активації транскрипційного фактора AP-1 на фоні моделювання хронічної фторидної інтоксикації статистично значуще не змінюється при порівнянні з групою ХФІ. Проте, слід зазначити, що при порівнянні з контрольною групою активність сNOS знижується на 45,45%. Таким чином, блокада активації AP-1 за умов хронічної фторидної інтоксикації призводить до зниження продукції оксиду азоту в слизовій оболонці шлунка. Проте основним продуцентом оксиду азоту, аналогічно з групою ХФІ, залишається ідуцибельна ізоформа NO-синтази.

Концентрація ONOO⁻ при блокаді активації транскрипційного фактора AP-1 на фоні моделювання хронічної фторидної інтоксикації знижується в 1,98 раза при порівнянні з групою ХФІ, проте залишається збільшеною в 1,36 раза при порівнянні з контрольною групою. Концентрація нітритів в слизовій оболонці шлунка знижується в 2,10 раза, а концентрація нітрозотіолів зменшується в 2,37 раза при порівнянні з групою ХФІ. Статистично значущих відмінностей в концентрації нітритів та нітрозотіолів при порівнянні з контрольною групою не виявлено.

Нітрогену (II) оксид (NO) є важливим регулятором багатьох клітинних процесів. Проте він є нестійкою сполукою, оскільки його період напівжиття складає кілька хвилин та залежить від багатьох умов (парціального тиску кисню у тканині, температури, концентрації самого оксиду азоту, джерела його утворення, тощо). За умов температури людського організму (≈37°C) та фізіологічної концентрації кисню у тканинах оксид азоту легко піддається окисненню з утворенням нітритів (NO₂⁻) [8]. Окиснення оксиду азоту молекулярним киснем не завершується з утворенням нітритів. В подальшому за тих самих умов відбувається окиснення нітритів до нітратів (NO₃⁻), надлишок яких може виводяться нирками, або зберігатись у скелетних м'язах для подальшого відновлення до оксиду азоту (NO) [8]. Тому за фізіологічних умов окиснення

NO до нітритів можна розглядати як безпечний шлях утилізації надлишкового NO. Проте за умов ацидозу та накопичення великої кількості речовин із високим редоксним потенціалом (НАДН відновлений, ФАДН відновлений, тощо) можливе зменшення інтенсивності окиснення нітритів до нітратів та навіть відновлення нітритів до оксиду азоту (за допомогою нітрат-нітритредуктазних систем) [9]. Накопичення великої кількості нітритів, особливо при наявності АФК, створює умови для нітрування (приєднання простетичної групи NO₂⁻) білків, що змінює їхню активність та може надати їм антигенних властивостей [10]. Таким чином, збільшення концентрації нітритів у слизовій оболонці шлунка щурів за умов хронічної фторидної інтоксикації загрожує розвитком нітрування білків.

Утворення пероксинітриту з оксиду азоту є варіантом перекисного окиснення, оскільки структурно молекула пероксинітриту має пероксидний (O-O) зв'язок, на відміну від молекули нітрату, який має лише ковалентні зв'язки між атомами азоту та кисню. Пероксинітрит є більш потужним окиснювачем при порівнянні з нітритом і може безпосередню нітрувати залишки тирозину у білках в місці свого утворення [11]. Тому збільшення його утворення є завжди негативним явищем, яке може супроводжуватись ушкодженням слизової оболонки шлунка.

Нітрозотіоли є результатом взаємодії оксиду азоту із тиольними групами (-SH) із приєднанням до тиольної групи простетичної групи -NO. Ці сполуки є відносно інертними у оксидативно-відновному плані. Проте за певних умов можливе від'єднання простетичної групи -NO від нітрозотіолів, що збільшить локальну концентрацію оксиду азоту. Від'єднання оксиду азоту від нітрозотіолів відбувається при зменшенні водневого показника (pH), тобто при розвитку ацидозу у клітині [12]. Окрім ролі донаторів оксиду азоту за умов ацидозу клітини нітрозотіоли мають сигнальні функції. Деякі автори порівнюють вплив нітрозилування білків із їх фосфорилуванням, тобто приєднання нітрозильної групи до залишків цистеїну може як яктивувати, так і інгібувати білки, призводити до активації таких транскрипційних факторів як NF-κB та STAT-3 [13]. Тому утворення нітрозотіолів можна вважати найбільш безпечним механізмом утилізації надлишкового

оксиду азоту в слизовій оболонці шлунка за умов хронічної фторидної інтоксикації.

Причиною зниження активності індукцибельної ізоформи NO-синтази за при блокаді активації транскрипційного фактора AP-1 на фоні моделювання хронічної фторидної інтоксикації може бути зменшення утворення АФК. Надлишкове надходження іонів фтору може збільшувати продукцію АФК від мітохондріальних електронно-транспортних ланцюгів [14]. Посилена продукція АФК, в свою чергу активує транскрипційний фактор AP-1, що збільшує експресію підконтрольних йому генів (зокрема інтерлейкіну-1 β) [15]. Також слід зазначити, що AP-1 може контролювати експресію iNOS як незалежно від NF- κ B, так і синергічно з ним [16]. Враховуючи статистично значуще зниження активності iNOS під впливом інгібітора активації AP-1 та селективність SR11302, можна припустити, що збільшена активність цього ферменту під час хронічної фторидної інтоксикації більшою мірою пов'язана саме з активацією AP-1, ніж з NF- κ B. Варто зазначити, що зменшення активності iNOS не супроводжується зменшенням концентрації пероксинітритів до рівня контрольних тварин. Це може свідчити про те, що фторид-індуковані зміни в мітохондріях не опосередковуються активацією AP-1 та наявне збільшене продукування АФК в мітохондріях. Тому блокада активації AP-1 не є повноцінною патогенетичною терапією хронічної фторидної інтоксикації, хоча вона дозволяє зменшити продукцію та утилізацію оксиду азоту в слизовій оболонці шлунка. Дане питання потребує подальшого вивчення.

Висновки

Активация транскрипційного фактора AP-1 за умов хронічного надлишкового надходження фторидів до організму призводить до збільшення продукції оксиду азоту в слизовій оболонці шлунка щурів, посилює його окиснення до нітритів, сприяє утворенню нітрозильних груп у реакції з низькомолекулярними донорами тіолових груп та збільшує перекисне окиснення оксиду азоту із утворенням пероксинітриту.

Література

1. Guo J, Wu H, Zhao Z, Wang J et al. Review on Health Impacts from Domestic Coal Burning: Emphasis on Endemic Fluorosis in Guizhou Province, Southwest China. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2021; 258: 1-25.
2. Barreau T, Hoshiko S, Kreutzer R, Smorodinsky S et al. Sulfuryl Fluoride Poisonings in Structural Fumigation, a Highly Regulated Industry-Potential Causes and Solutions. *Int J Environ Res Public Health*. 2019; 16(11): 2026.
3. Mirsaeed-Ghazi F, Sharifzadeh M, Ashrafi-Kooshk MR, Karima S et al. Astaxanthin Decreases Spatial Memory and Glutamate Transport Impairment Induced by Fluoride. *Iran J Pharm Res*. 2021; 20(4): 238-254.
4. Lian S, Li S, Zhu J, Xia Y et al. Nicotine stimulates IL-8 expression via ROS/NF- κ B and ROS/MAPK/AP-1 axis in human gastric cancer cells. *Toxicology*. 2022; 466: 153062.
5. Акімов О.Є., Карпик З.І., Олейник К.І., Міщенко А.В. та співавт. Роль транскрипційних факторів κ B і AP-1 у змінах продукції та утилізації оксиду азоту у серці щурів за умов хронічної фторидної інтоксикації. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2021; 21(3): 185-189.
6. Yelins'ka AM, Akimov OYe, Kostenko VO. Role of AP-1 transcriptional factor in development of oxidative and nitrosative stress in periodontal tissues during systemic inflammatory response. *Ukr. Biochem. J*. 2019; 91(1): 80-85.
7. Akimov OY, Kostenko VO. Role of NF- κ B transcriptional factor activation during chronic fluoride intoxication in development of oxidative-nitrosative stress in rat's gastric mucosa. *J Trace Elem Med Biol*. 2020; 61: 126535.
8. Majerczak J, Kij A, Drzymala-Celichowska H, Kus K et al. Nitrite Concentration in the Striated Muscles Is Reversely Related to Myoglobin and Mitochondrial Proteins Content in Rats. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(5): 2686.
9. Wang Y, Chen W, Zhou J, Wang Y et al. Nitrate Metabolism and Ischemic Cerebrovascular Disease: A Narrative Review. *Front Neurol*. 2022; 13: 735181.
10. Peng R, Wang L, Yu P, Carrier AJ et al. Exacerbated Protein Oxidation and Tyrosine Nitration through Nitrite-Enhanced Fenton Chemistry. *J Agric Food Chem*. 2022; 70(1): 353-359.
11. Jiang M, Zhao XM, Jiang ZS, Wang GX et al. Protein tyrosine nitration in atherosclerotic endothelial dysfunction. *Clin Chim Acta*. 2022; 529: 34-41.
12. Li W, Wang D, Lao KU, Wang X. Buffer concentration dramatically affects the stability of S-nitrosothiols in aqueous solutions. *Nitric Oxide*. 2022; 118: 59-65.
13. Fukuto JM, Perez-Tenero C, Zarenkiewicz J, Lin J et al. Hydropersulfides (RSSH) and Nitric Oxide (NO) Signaling: Possible Effects on S-Nitrosothiols (RS-NO). *Antioxidants (Basel)*. 2022; 11(1): 169.
14. Wang HW, Liu J, Wei SS, Zhao WP et al. Mitochondrial respiratory chain damage and mitochondrial fusion disorder are involved in liver dysfunction of fluoride-induced mice. *Chemosphere*. 2020; 241: 125099.
15. Kong L, Barber T, Aldinger J, Bowman L et al. ROS generation is involved in titanium dioxide nanoparticle-induced AP-1 activation through p38 MAPK and ERK pathways in JB6 cells. *Environ Toxicol*. 2022; 37(2): 237-244.
16. Ahmad N, Ansari MY, Bano S, Haqqi TM. Imperatorin suppresses IL-1 β -induced iNOS expression via inhibiting ERK-MAPK/AP1 signaling in primary human OA chondrocytes. *Int Immunopharmacol*. 2020; 85: 106612.

Матеріал надійшов до редакції 18.02.2022 р.