

Ліпополісахаридіндукована системна запальна відповідь обтяжує розвиток окисно-нітрозативного стресу в слинних залозах щурів при їх алкогольному ураженні

Р.С. Козаєва¹, М.О. Клименко¹, В.О. Костенко²

¹ Чорноморський національний університет імені Петра Могили, Миколаїв;
e-mail: mykola.klymenko@chnu.edu.ua;

² Полтавський державний медичний університет; e-mail: patofziolog@umsa.edu.ua

*Досліджували роль ліпополісахарид (ЛПС)-індукованої системної запальної відповіді (СЗВ) у розвитку окисно-нітрозативного стресу в слинних залозах щурів при їх алкогольному ураженні, яке відтворювали внутрішньошлунковим (через зонд) введенням 40%-го етанолу в дозі 24 мг/кг двічі на день протягом 14 діб. СЗВ моделювали внутрішньоочеревинним введенням ЛПС *Salmonella typhi* по 0,4 мг/кг протягом 1-го тижня та одноразово щотижнево впродовж наступних 7 тиж. Виявлено, що тривале введення етанолу на тлі СЗВ призводило до зростання вмісту прозапальних чинників (фактора некрозу пухлин α , інтерлейкіну-6), а також маркера запалення – С-реактивного протеїну – у крові, що перевищувало відповідні показники при окремому введенні ЛПС *Salmonella typhi* або алкоголю. За цих умов у тканинах піднижньоощелепних слинних залоз було вищим вироблення супероксидного аніон-радикала дихальним ланцюгом мітохондрій – на 25,9 та 30,5%, мікосомальними монооксигеназами та NO-синтазою – на 19,0 та 27,1%, НАДФН-оксидазою фагоцитів – на 29,5 та 30,0%; була збільшена активність індукційної NO-синтази – на 15,5 та 83,6%, концентрація пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів – на 32,5 та 58,3%, S-нітрозотіолів – на 20,2 та 22,7%. Ці зміни супроводжувалися більш істотним зменшенням у гомогенаті піднижньоощелепних слинних залоз активності α -амілази та концентрації аквапорину-5, що погіршує процес екскреції слинними залозами білків та води. Зроблено висновок, що введення 40%-го етанолу на тлі ЛПС-індукованої СЗВ викликає у піднижньоощелепних слинних залозах більш значний розвиток окисно-нітрозативного стресу та рівень їх дисфункції порівняно з окремим застосуванням ЛПС та алкоголю.*

Ключові слова: ліпополісахаридіндукована системна запальна відповідь; алкоголь; окисно-нітрозативний стрес; слинні залози.

ВСТУП

За підрахунками Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), надмірне вживання алкоголю є третім за значенням фактором ризику для життя у розвинутих країнах світу [1]. Споживання спиртних напоїв неминуче впливає на органи порожнини рота, змінює транспортування різних сполук через слизову оболонку, викликає пародонтопатії та ксеростомію [2]. Тривале вживання алкоголю призводить до дистрофічних змін у слинних

залозах (СЗ) [3], що збільшує ризик розвитку карієсу та захворювань ясен [4]. Показано, що вплив етанолу на СЗ проявляється змінами морфометричних показників їх кінцевих відділів та вивідних протоків, які відповідають часу формування хронічної алкогольної залежності [5].

Нещодавно велике популяційне дослідження показало, що надмірне споживання алкоголю сприяє підвищенню концентрації ліпідів і інсуліну в крові та окружності талії

[6]. Крім того, вживання алкоголю пов'язане з розвитком інсулінорезистентності [7]. Відомо, що ці чинники є компонентами метаболічного синдрому та асоціюються з одночасним розвитком низькоінтенсивного хронічного дифузного запалення [8]. Характерною рисою цього процесу є його тривалий перебіг, що супроводжується загальними ознаками у вигляді системної запальної відповіді (СЗВ), діагностичними маркерами якої вважається посилене вироблення про- та протизапальних цитокінів, активних форм кисню та азоту (АФК/АФА відповідно) та білків гострої фази [9]. Для експериментального відтворення СЗВ використовують внутрішньоочеревинне введення ліпополісахариду (ЛПС) *Salmonella typhi*, який викликає опосередковану через Toll-подібні рецептори (TLR) 4 активацію експресії генів прозапальних цитокінів та прооксидантних білків, пов'язану з транслокацією у ядро транскрипційного ядерного фактора κB [10].

Відомо, що алкоголь неоднозначно впливає на утворення деяких прозапальних медіаторів, зокрема, АФК/АФА [11]. Крім того залишаються нез'ясованими закономірності розвитку окисного та нітрозативного стресу у великих СЗ при надмірному споживанні алкоголю на тлі СЗВ.

Метою нашої роботи було вивчення ролі ЛПС-індукованої СЗВ у розвитку окисно-нітрозативного стресу в піднижньощелепних СЗ щурів при їх алкогольному ураженні.

МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на 28 щурів-самцях лінії Вістар масою 205–220 г, розподілених на 4 групи: 1-ша – контрольна – тваринам внутрішньошлунково через зонд вводили ізотонічний розчин хлориду натрію 2 рази на день ($n = 7$); 2-га – з відтворенням алкогольного ураження СЗ; у 3-й – моделювали ЛПС-індуковану СЗВ ($n = 7$); у 4-й – алкогольне ураження СЗ відтворювали протягом 2 останніх тижнів моделювання

ЛПС-індукованої СЗВ ($n = 7$). Алкогольне ураження СЗ відтворювали внутрішньошлунковим (через зонд) введенням 40%-го розчину етанолу в дозі 24 мг/кг 2 рази на день протягом 14 діб [12]. СЗВ моделювали внутрішньоочеревинним введенням ЛПС *S. typhi* по 0,4 мг/кг протягом 1-го тижня та одноразово щотижнево впродовж наступних 7 тиж [13]. Тварин декапітували під інгаляційним ефірним наркозом, дотримуючись положень «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Концентрацію цитокінів – інтерлейкінів (ІЛ)-6 і 10, фактора некрозу пухлин α (ФНП- α) – та С-реактивного білка (СРБ) у сироватці крові визначали імуноферментним методом з використанням відповідних наборів Rat ELISA Kit («MyBioSource.com», США). Швидкість продукування в гомогенаті СЗ супероксидного аніон-радикала ($\cdot\text{O}_2^-$) оцінювали при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм з використанням спектрофотометра Ulab 101 (Китай) з індукторами: нікотинамідаденіндинуклеотидом відновленим (НАДН, «Sigma-Aldrich Inc.», США) для оцінки продукції $\cdot\text{O}_2^-$ дихальним ланцюгом мітохондрій, нікотинамідаденіндинуклеотидфосфатом відновленим (НАДФН, «Sigma-Aldrich, Inc.», США) – мікосомальними монооксигеназами та NO-синтазою (NOS), ЛПС *S. typhi* – НАДФН-оксидазою лейкоцитів [14].

Для оцінки показників нітрозативного стресу у гомогенаті піднижньощелепних СЗ спектрофотометрично визначали активність загальної NOS (за різницею концентрації нітрит-іонів до та після інкубації гомогенату в середовищі, що містить L-аргінін та НАДФН) [15] та її конститутивних ізоформ (сNOS, при додаванні 1%-го розчину аміногуанідину гідрохлориду, «Sigma-Aldrich, Inc.», США) [16]. Активність індукбельної ізоформи NOS (iNOS) визначали за формулою: активність iNOS = активність за-

гальної NOS – активність cNOS. Для оцінки здатності cNOS у неспряженому стані продукувати $\cdot O_2^-$ замість NO розраховували індекс спряження (coupling) cNOS як відношення активності cNOS до швидкості вироблення $\cdot O_2^-$ НАДФН-залежними електронно-транспортними ланцюгами. Досліджували вміст пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів [15] та низькомолекулярних нітрозотіолів [17].

Для оцінки функціонального стану піднижньощелепних СЗ у їх гомогенаті визначали активність α -амілази спектрофотометрично за методикою Каравея за допомогою набору реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна, м. Дніпро) та концентрацію аквапорину-5 імуноферментним методом з використанням набору Rat Aquaporin 5 ELISA Kit («MyBioSource.com», США).

Отримані результати статистично обробляли з використанням пакету програм Microsoft Office Excel з розширенням Real Statistics. Для перевірки розподілу на нормальність було застосовано розрахунок критерію Шапіро-Уїлка. Оскільки варіаційні ряди відповідали нормальному розподілу, то для їх порівняння використовували критерій t Стьюдента для незалежних вибірок.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Введення алкоголю на вмісті у сироватці крові ФНП- α та ІЛ-6 вірогідно не позначалося, проте концентрація СРБ підвищувалася на

26,3% ($P < 0,05$; табл. 1). Вміст ІЛ-10 перевищував значення контрольної групи на 22,7%.

Раніше проведений систематичний огляд експериментальних і клінічних досліджень з прийому алкоголю і змін при цьому продукції цитокінів та гострофазних білків виявив, що зв'язок між прийомом етанолу та вмістом СРБ, ІЛ-6 і ФНП- α є несуттєвим [18]. Повідомляється про можливість як зменшення вмісту СРБ у людей, які помірно споживають алкоголь [19], так і дозозалежного лінійного збільшення цього показника при зловживанні ним [20]. З розвитком у хворих алкогольного гепатиту виявлялись ознаки СЗВ: нейтрофільний лейкоцитоз, підвищення вмісту СРБ, збільшення швидкості осідання еритроцитів, підвищення рівня фібриногену та феритину. Ці зміни часто супроводжувалися збільшенням великих СЗ [21].

Введення ЛПС призводило до зміни вмісту маркерів СЗВ у сироватці крові щурів: підвищувалися концентрації прозапальних цитокінів – ФНП- α (на 58,8%) і ІЛ-6 (на 79,5%) – та СРБ (на 69,0%), зменшувався вміст протизапального ІЛ-10 (на 50,9%), що свідчить про адекватність моделі СЗВ. Але при застосуванні алкоголю на тлі СЗВ вміст ФНП- α , ІЛ-6 та СРБ був вірогідно вищим – на 19,2, 28,5 та 16,8% відповідно, ніж при окремому введенні ЛПС, та на 60,7, 98,4 та 56,4% відповідно, ніж при окремому введенні алкоголю. Проте концентрація ІЛ-10 істотно не відрізнялася від такої при окремому введенні ЛПС.

Таблиця 1. Показники системної запальної відповіді у сироватці крові щурів при окремому та поєднаному введенні алкоголю та ліпополісахариду *S. typhi* ($M \pm m$)

| Умови досліджу | Цитокіни, пг/мл | | | С-реактивний білок, нг/мл |
|--|--------------------------------|-----------------|--------------------|---------------------------|
| | Фактор некрозу пухлин α | Інтерлейкін-6 | Інтерлейкін-10 | |
| Контроль | 38,6 \pm 2,5 | 21,5 \pm 1,6 | 21,6 \pm 1,3 | 3,733 \pm 0,099 |
| Введення ліпополісахариду | 61,3 \pm 3,0* | 38,6 \pm 1,5* | 10,6 \pm 0,9* | 6,309 \pm 0,176* |
| Введення алкоголю | 45,5 \pm 5,2 | 25,0 \pm 1,4 | 26,5 \pm 0,8* | 4,714 \pm 0,181* |
| Поєднане введення алкоголю та ліпополісахариду | 73,1 \pm | 49,6 \pm | 7,8 \pm 1,1*,*** | 7,371 \pm |
| | 4,3*,**,*** | 4,0*,**,*** | | 0,231*,**,*** |

Примітка: в табл. 1–5 * $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно зі значенням групи з окремим введенням ліпополісахариду; *** $P < 0,05$ порівняно зі значенням групи з окремим введенням алкоголю.

У цілому одержані результати вказують, що надмірна алкоголізація організму щурів за умов СЗВ викликає додаткове зростання вмісту в крові прозапальних цитокінів – ФНП- α і ІЛ-6 – та СРБ, які вважаються індукторами окисно-нітрозативного стресу [22].

Введення 40%-го розчину етанолу в добовій дозі 48 мг/кг протягом 14 діб викликає дистрофічні явища у піднижньощелепних СЗ, що характеризуються зменшенням діаметра просвіту кінцевих відділів та розмірів епітеліоцитів, десквамацією протокових епітеліоцитів, зменшенням кількості секреторних гранул у гранулярних протоках, порушеннями мікроциркуляторного русла, збільшенням перипротокової та периацинарної кількості плазмоцитів і мастоцитів (у стані дегрануляції) [5, 12].

Для з'ясування ролі окисно-нітрозативного стресу в механізмах ушкодження піднижньощелепних СЗ нами було досліджено закономірності утворення в них АФК/АФА. Введення алкоголю згідно з умовами експерименту вірогідно збільшувало генерацію у тканинах піднижньощелепних СЗ $\cdot\text{O}_2^-$ (табл. 2) дихальним ланцюгом мітохондрій на 41,5%, мікросомальними монооксигеназами та NOS – на 34,0%, НАДФН-оксидазою лейкоцитів – на 34,5%.

Раніше було показано, що пов'язані з впливом алкоголю ушкодження мітохондрій, зокрема їх ДНК, посттрансляційні модифікації білків, а також індукція етанолом цитохрому P450-2E1 (CYP2E1) не тільки супроводжуються посиленням генерації АФК, але зростають при дії останніх

за принципом «замкнутого» кола [23, 24]. Водночас у виділених з крові хворих на алкогольну залежність лейкоцитах виявлялося порушення «дихального вибуху» внаслідок зниження активності НАДФН-оксидази, що автори пов'язують з прямою дією етанолу [25]. Підвищення продукції $\cdot\text{O}_2^-$ НАДФН-оксидазою фагоцитів може розглядатися як наслідок впливу прозапальних цитокінів (ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-12, ФНП- α та хемокинів) у разі надмірного утворення АФК мітохондріями та ендоплазматичним ретикулумом, зокрема через активацію редоксчутливих транскрипційних чинників (NF- κ B, AP-1 тощо) [16, 26].

При відтворенні СЗВ введенням ЛПС *S. typhi* генерація $\cdot\text{O}_2^-$ у тканинах піднижньощелепних СЗ підвищувалася при індукції дихального ланцюга мітохондрій на 46,6%, мікросомальних монооксигеназ та NOS – на 43,0%, НАДФН-оксидази лейкоцитів – на 34,5%, що є закономірним наслідком опосередкованих через TLR шляхів активації синтезу прозапальних цитокінів.

При введенні алкоголю на тлі ЛПС-індукованої СЗВ продукція АФК у тканинах піднижньощелепних СЗ істотно вірогідно збільшувалася. При цьому вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ дихальним ланцюгом мітохондрій перевищувало відповідні результати груп з окремим введенням ЛПС та алкоголю – на 25,9 та 30,5%, мікросомальними монооксигеназами та NOS – на 19,0 та 27,1%, НАДФН-оксидазою фагоцитів – на 29,5 та 30,0%.

Значне зростання продукції $\cdot\text{O}_2^-$ за цих умов, очевидно, пов'язане з виникненням додаткових шляхів генерації АФК при дії ета-

Таблиця 2. Швидкість продукції супероксидного аніон-радикала різними джерелами у тканинах піднижньощелепних слинних залоз при окремому та поєднаному введенні алкоголю та ліпополісахариду *S. typhi* ($M \pm m$)

| Умови дослідю | Джерела генерації супероксидного аніон-радикала, нмоль/с·г | | |
|--|--|-------------------------------------|---------------------------|
| | Мітохондрії | Мікросомальні монооксигенази та NOS | НАДФН-оксидаза лейкоцитів |
| Контроль | 17,97 \pm 1,02 | 14,55 \pm 0,82 | 1,74 \pm 0,10 |
| Введення ліпополісахариду | 26,35 \pm 1,02* | 20,81 \pm 0,61* | 2,34 \pm 0,09* |
| Введення алкоголю | 25,42 \pm 1,30* | 19,49 \pm 0,75* | 2,33 \pm 0,08* |
| Поєднане введення алкоголю та ліпополісахариду | 33,17 \pm 1,49*,**,*** | 24,77 \pm 0,37*,**,*** | 3,03 \pm 0,07*,**,*** |

нолу на тлі розвитку ЛПС-індукованої СЗВ. З одного боку, алкоголь викликає 1-електронне відновлення кисню у мітохондріальному та мікросомальному електронно-транспортних ланцюгах. З іншого боку, надходження ЛПС, як патогенасоційованого молекулярного патерну, через активацію TLR4 та залежних від них NF-κB- та AP-1-асоційованих сигнальних шляхів забезпечує утворення АФК різними джерелами та дає змогу легко індукувати інші прозапальні медіатори [27]. Зміна за цих умов окисно-відновного потенціалу, у свою чергу, ще більше активує редоксчутливі транскрипційні чинники, зокрема, NF-κB [26]. При цьому помірний окисний стрес посилюється і спричиняє ще більше утворення прооксидантних та запальних медіаторів.

Разом зі збільшенням швидкості утворення АФК при дії етанолу та розвитку СЗВ підвищується продукція АФА (табл. 3). Введення алкоголю підвищувало загальну активність NOS та її індукцйбельної ізоформи на 23,1 та 41,6% відповідно. Активність сNOS при цьому знижувалася на 39,2%.

Наше дослідження підтверджує точку зору, що етанол по-різному впливає на іNOS і сNOS, включаючи ендотеліальну та нейрональну ізоформу, в різних клітинах або тканинах [28]. Раніше повідомлялося про збільшення концентрації іNOS у плазмі крові хворих на алкоголізм [29]. Активація синтезу цього ізоферменту може бути можливою за умов порушення у залежних осіб кишкового бар'єра з розвитком ендотоксикозу [30]. Виявлене в експерименті на щурах, яким вводили алкоголь, зниження каталітичної ак-

тивності сNOS дослідники пов'язують з більшим зв'язуванням ендотеліальної ізоформи NOS з інгібувальним білком кавеоліном-1 та меншою взаємодією з кальмодуліном [31].

Введення ЛПС викликало підвищення в гомогенаті піднижньощелепних СЗ NO-синтазної активності – загальної та індукцйбельної – на 86,8 та 125,0% відповідно. Активність сNOS, навпаки, зменшувалася на 42,0%. Ці результати підтверджують дані інших дослідників та узгоджуються зі здатністю ЛПС активувати транскрипційні фактори, зокрема NF-κB, які можуть впливати на експресію гена іNOS [32].

Введення алкоголю на тлі СЗВ ще більше сприяло збільшенню в гомогенаті піднижньощелепних СЗ NO-синтазної активності. При цьому загальна активність NOS на 73,8% перевищувала результат групи з окремим застосуванням 40%-го етанолу. Активність іNOS за цих умов на 15,5 та 83,6% була вищою за результати груп з окремим введенням ЛПС та алкоголю відповідно. Водночас активність сNOS вірогідно не відрізнялася від значень груп з окремим введенням ЛПС та алкоголю.

Серед механізмів генерації АФК разом з такими джерелами, як мікросомальні монооксигенази, мітохондрії, НАДФН-оксидаза лейкоцитів, ксантинооксидаза, ліпо- та циклооксигенази, останнім часом значна увага приділяється функціонуванню неспряженої сNOS [33]. У всіх дослідних групах індекс спряження сNOS істотно поступався контролю. Це свідчить про те, що сNOS замість NO продукує $\cdot\text{O}_2^-$, утворюючи «замкнуте» коло взаємопосилень рівня оксидативного

Таблиця 3. Активність ізоформ NO-синтази в тканинах піднижньощелепних слинних залоз при окремому та поєднаному введенні алкоголю та ліпополісахариду *S. typhi* (M ± m)

| Умови досліджу | Активність NO-синтази, мкмоль(NO ₂ ⁻)/хв·г·білка | | | Індекс спряження сNOS |
|--|---|---------------|----------------------|-----------------------|
| | загальна | конститутивна | індуцибельна | |
| Контроль | 7,67 ± 0,39 | 1,76 ± 0,09 | 5,91 ± 0,34 | 0,122 ± 0,007 |
| Введення ліпополісахариду | 14,33 ± 0,79* | 1,02 ± 0,19* | 13,31 ± 0,64* | 0,049 ± 0,009* |
| Введення алкоголю | 9,44 ± 0,30* | 1,07 ± 0,06* | 8,37 ± 0,35* | 0,055 ± 0,004* |
| Поєднане введення алкоголю та ліпополісахариду | 16,41 ± 0,71*,*** | 1,04 ± 0,23* | 15,37 ± 0,53*,**,*** | 0,042 ± 0,009* |

Таблиця 4. Вміст (мкмоль/г) активних форм азоту в тканинах піднижньощелепних слинних залоз при окремому та поєднаному введенні алкоголю та ліпополісахариду *S. typhi* (M ± m)

| Умови досліджу | Вміст пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів | Вміст низькомолекулярних нітрозотіолів |
|--|---|--|
| Контроль | 0,91 ± 0,04 | 0,75 ± 0,02 |
| Введення ліпополісахариду | 1,23 ± 0,05* | 0,99 ± 0,03* |
| Введення алкоголю | 1,03 ± 0,11 | 0,97 ± 0,03* |
| Поєднане введення алкоголю та ліпополісахариду | 1,63 ± 0,06*, **, *** | 1,19 ± 0,03*, **, *** |

стресу і неспряженості сNOS.

Одночасна продукція $\cdot\text{O}_2^-$ та NO створює умови для утворення більш токсичних активних метаболітів, зокрема, пероксинітриду. Іншим «депо» NO, потенційно здатним забезпечувати реутилізаційний синтез цієї молекули у високих концентраціях з ризиком розвитку нітрозативного стресу, є S-нітрозотіоли. При введенні алкоголю концентрація пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів у тканинах піднижньощелепних СЗ (табл. 4) суттєво не відрізнялася від значення контрольної групи. Вочевидь, «депонування» NO за цих умов відбувалося внаслідок утворення S-нітрозотіолів. Вміст останніх у СЗ на 29,3% перевищував контроль.

Введення ЛПС *S. typhi* викликало підвищення у тканинах піднижньощелепних СЗ концентрації пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів на 35,2%, S-нітрозотіолів – на 32,0%. При дії алкоголю на тлі СЗВ вміст у тканинах піднижньощелепних СЗ пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів перевищував на 32,5 та 58,3%, а S-нітрозотіолів – на 20,2 та 22,7% результати груп з окремим введенням ЛПС та алкоголю

відповідно. Це відповідає даним щодо збільшення за цих умов індукцйбельного синтезу NO при збільшенні продукції $\cdot\text{O}_2^-$.

Як маркери функціонального стану СЗ нами було досліджено в їх гомогенаті активність α -амілази та концентрацію аквапорину-5, що утворює у СЗ водні канали, які здійснюють транспорт рідини через біологічні мембрани [34]. Окреме введення алкоголю та ЛПС *S. typhi* вірогідно знижувало в гомогенаті піднижньощелепних СЗ активність α -амілази (табл. 5) – на 21,2 та 23,8% відповідно, а концентрацію аквапорину-5 – на 41,2 та 37,3%. Тобто рівень функціональної неповноцінності СЗ відповідає показникам розвитку в них окисдатовно-нітрозативного стресу.

Введення алкоголю на тлі ЛПС-індукованої СЗВ значно зменшувало в гомогенаті піднижньощелепних СЗ активність α -амілази та концентрацію аквапорину-5, які були нижчими за значення групи з окремим введенням ЛПС на 14,5 та 43,7%, а групи з окремим застосуванням 40%-го етанолу – на 17,3 та 40,0% відповідно. Тобто рівень функціональної неповноцінності СЗ відповідає наведеним вище показникам розвитку в них окисно-нітрозативного стресу.

Таблиця 5. Показники функціонального стану піднижньощелепних слинних залоз при окремому та поєднаному введенні алкоголю та ліпополісахариду *S. typhi* (M ± m)

| Умови досліджу | Активність α -амілази, мг/год · г | Концентрація аквапорину-5, пг/мл |
|--|--|----------------------------------|
| Контроль | 68,18 ± 0,95 | 0,51 ± 0,02 |
| Введення ліпополісахариду | 51,98 ± 0,71* | 0,32 ± 0,02* |
| Введення алкоголю | 53,73 ± 0,55* | 0,30 ± 0,02* |
| Поєднане введення алкоголю та ліпополісахариду | 44,42 ± 0,95*, **, *** | 0,18 ± 0,01*, **, *** |

ВИСНОВКИ

1. Введення алкоголю на тлі ЛПС-індукованої системної запальної відповіді супроводжується зростанням прозапальної гіперцитокінемії, що не компенсується вмістом протизапального ІЛ-10, а також істотним збільшенням вмісту СРБ, що перевищує такий при окремому введенні ЛПС *S. typhi* або 40%-го етанолу.

2. Введення алкоголю на тлі ЛПС-індукованої системної запальної відповіді викликає більш значний розвиток окисно-нітрозативного стресу у СЗ та рівень їх дисфункції порівняно з окремим застосуванням ЛПС або алкоголю, що виявляється у збільшенні продукції супероксидного аніон-радикала (мікросомальними монооксигеназами, дихальним ланцюгом мітохондрій, НАДФН-оксидазою фагоцитів), надмірній активації іNOS, зростанні вмісту активних метаболітів азоту (пероксинітритів і S-нітрозотіолів), зменшенні активності α -амілази та концентрації аквапорину-5.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

R.S. Kozaeva¹, M.O. Klymenko¹, V.O. Kostenko²

LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE ENHANCES THE DEVELOPMENT OF OXIDATIVE-NITROSATIVE STRESS IN SALIVARY GLANDS OF RATS UNDER ALCOHOL DAMAGE

¹ Petro Mohyla Black Sea National University, Mykolayiv; e-mail: mykola.klymenko@chmmu.edu.ua;

² Poltava State Medical University, Ukraine; e-mail: patofziolog@umsa.edu.ua

We addressed the role of lipopolysaccharide (LPS)-induced systemic inflammatory response (SIR) in the development of oxidative-nitrosative stress in the salivary glands of rats

under the influence of alcohol. Ethanol (40%) at the dose of 24 mg/kg was administered intraperitoneally (ip) twice per day for 14 days. SIR was induced by ip administration of LPS (*Salmonella typhi*) at the dose 0.4 mg/kg for 1 week followed by a weekly LPS administration for 7 weeks. We found that long-term administration of ethanol in the background of LPS-induced SIR increased the circulating level of proinflammatory markers (TNF α , IL-6) and C-reactive protein and this increase exceeded the respective values when LPS and alcohol were administered separately. Under these conditions, in submandibular salivary glands, the superoxide anion production by mitochondria respiratory chain was increased by 25.9 and 30.5%, by microsomal monoxygenases and NO synthase by 19.0 and 27.1%, by phagocyte NADPH-oxidase by 29.5 and 30.0%. The activity of inducible NO-synthase increased by 15.5 and 83.6%, the concentration of peroxy-nitrites of alkali and alkali-earth metals elevated by 32.5 and 58.3%, and S-nitrosothiols raised by 20.2 and 22.7%. These changes were accompanied by a decrease in α -amylase activity and the aquaporin-5 concentration that impairs water and protein excretion by salivary glands. We conclude that administration of ethanol in the background of LPS-induced SIR results in more pronounced development of oxidative-nitrosative stress in the submandibular salivary glands and more marked dysfunction compared to separate use of LPS and alcohol.

Key words: lipopolysaccharide-induced systemic inflammatory response; alcohol; oxidative-nitrosative stress; salivary glands.

REFERENCES

1. Global status report on alcohol and health. Geneva: World Health Organization; 2018.
2. Rajesh E, Sangeetha Priya P, Babu NA, Masthan KMK. A review on effects of alcohol in oral diseases. *Ind J Publ Health Res Dev.* 2019;10(11):3159-61.
3. Merlo C, Bohl L, Carda C, et al. Parotid sialosis: morphometrical analysis of the glandular parenchyme and stroma among diabetic and alcoholic patients. *J Oral Pathol Med.* 2010 Jan;39(1):10-5.
4. Lee KC, Mandel L. Wine and Dental Destruction: Case Report. *New York State Dent J.* 2017 Apr;83(3):22-5.
5. Shevchenko KV, Yeroshenko GA, Vilkhova OV, et al. Remodeling of the duct system of the rat submandibular salivary glands in chronic ethanol intoxication. *Wiad Lek.* 2020;73(1):128-33.
6. Kim SK, Hong SH, Chung JH, Cho KB. Association Between Alcohol Consumption and Metabolic Syndrome in a Community-Based Cohort of Korean Adults. *Med Sci Monit.* 2017;23:2104-10.
7. Magis DC, Jandrain BJ, Scheen AJ. Alcohol, insulin sensitivity and diabetes. *Rev Med Liege.* 2003 Jul-Aug; 58(7-8):501-7.
8. Stafeev IS, Menshikov MY, Tsokolaeva ZI et al. Molecular

- mechanisms of latent inflammation in metabolic syndrome. Possible role of sirtuins and peroxisome proliferator-activated receptor type γ . *Biochemistry (Mosc)*. 2015 Oct;80(10):1217-26.
9. Chen Y, Liu S, Leng SX. Chronic Low-grade Inflammatory Phenotype (CLIP) and Senescent Immune Dysregulation. *Clin Ther*. 2019 Mar;41(3):400-9.
 10. Yelins'ka AM, Shvaykovs'ka OO, Kostenko VO. Influence of ammonium pyrrolidine dithiocarbamate on the production of reactive oxygen and nitrogen species in tissues of periodontium and salivary glands in rats exposed to *Salmonella typhi* lipopolysaccharide. *Fiziol Zh*. 2018;64(5):63-9. [Ukrainian].
 11. Ceni E, Mello T, Galli A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World J Gastroenterol*. 2014;20(47):17756-72.
 12. Yeroshenko GA, Shevchenko KV, Yakushko OS. Morphometric characteristics of rat salivary glands hemomicrovasculature capacity component under normal conditions and in ethanol chronic intoxication. *Svit Med Biol*. 2018;(3):149-52.
 13. Yelins'ka AM, Shvaykovs'ka OO, Kostenko VO. Epigallocatechin-3-gallate prevents disruption of connective tissue in periodontium and salivary glands of rats during systemic inflammation. *Wiad Lek*. 2018;71(4):869-73.
 14. Kostenko VO, Tsebrzhins'kii OI. Production of superoxide anion radical and nitric oxide in renal tissues sutured with different surgical suture material. *Fiziol Zh*. 2000; 46(5):56-62. [Ukrainian].
 15. Akimov O Ye, Kostenko VO. Functioning of nitric oxide cycle in gastric mucosa of rats under excessive combined intake of sodium nitrate and fluoride. *Ukr Biochem J*. 2016; 88(6):70-5.
 16. 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 Biochim J*. 2019;91(1):80-5.
 17. Gaston B, Reilly J, Drazen JM et al. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(23):10957-61.
 18. The effect of alcohol on biological markers associated with the risk of coronary insufficiency: a systematic review and meta-analysis of interventional studies. *Liki Ukrayini*. 2011;(6):14-21. [Russian].
 19. Sierksma A, van der Gaag M, Klufft C et al. Moderate alcohol consumption reduces plasma C-reactive protein and fibrinogen levels; a randomized, diet-controlled intervention study. *Eur J Clin Nutr*. 2002; 56:1130-6.
 20. Danovska M, Alexandrova M, Peychinska D, Gencheva I. Alcohol abuse enhances systemic inflammatory response in patients after spontaneous intracerebral haemorrhage. *J IMAB*. 2010; 16(3):27-31
 21. Ryzhkova OV Alcoholic liver disease. Irkutsk: ISMU; 2021.82 p. [Russian].
 22. Di Meo S, Venditti P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:9829176.
 23. Abdelmegeed MA, Ha SK, Choi Y, Akbar M, Song BJ. Role of CYP2E1 in Mitochondrial Dysfunction and Hepatic Injury by Alcohol and Non-Alcoholic Substances. *Current Mol Pharmacol*. 2017;10(3):207-25.
 24. Song B.-J., Akbar M, Abdelmegeed M et al. Mitochondrial dysfunction and tissue injury by alcohol, high fat, nonalcoholic substances and pathological conditions through post-translational protein modifications. *Redox Biol*. 2014; 3C:109-23.
 25. Vergis N, Khamri W, Beale K et al. Defective monocyte oxidative burst predicts infection in alcoholic hepatitis and is associated with reduced expression of NADPH oxidase. *Gut*. 2017;66:519-29.
 26. Akimov OYe, 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.
 27. Guijarro-Muñoz I, Compte M, Álvarez-Cienfuegos A et al. Lipopolysaccharide activates Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated NF- κ B signaling pathway and proinflammatory response in human pericytes. *J Biol Chem*. 2014 Jan 24;289(4):2457-68.
 28. Deng XS, Deitrich RA. Ethanol metabolism and effects: nitric oxide and its interaction. *Current Clin Pharmacol*. 2007;2(2):145-53.
 29. Zoga M, Tzavellas E, Ioannidis A, et al. Total Nitric Oxide and Inducible Nitric Oxide Synthase in Alcohol-dependent Individuals During Detoxification Therapy. *In Vivo*. 2014; 28(6):1175-9.
 30. Tang Y, Forsyth CB, Farhadi A, et al. Nitric oxide-mediated intestinal injury is required for alcohol-induced gut leakiness and liver damage. *Alcoholism, Clin Exp Res*. 2009;33:1220-30.
 31. Wang X, Abdel-Rahman AA. Effect of chronic ethanol administration on hepatic eNOS activity and its association with caveolin-1 and calmodulin in female rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;289(3):G579-85.
 32. Arias-Salvatierra D, Silbergeld EK, Acosta-Saavedra LC, Calderon-Aranda ES. Role of nitric oxide produced by iNOS through NF- κ B pathway in migration of cerebellar granule neurons induced by Lipopolysaccharide. *Cell Signal*. 2011 Feb;23(2):425-35.
 33. Karbach S, Wenzel P, Waisman A, Munzel T, Daiber A. eNOS uncoupling in cardiovascular diseases – the role of oxidative stress and inflammation. *Current Pharm Des*. 2014;20(22):3579-94.
 34. Delporte C, Bryla A, Perret J. Aquaporins in Salivary Glands: From Basic Research to Clinical Applications. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2):166.

*Матеріал надійшов
до редакції 18.10.2021*