

Вплив сульфорафану на показники оксидативно-нітрозативного стресу в тканинах слюзових залоз щурів за умов ліпополісахаридіндукованої системної запальної відповіді

Т.О. Романцева, В.О. Костенко

Полтавський державний медичний університет; e-mail: v.kostenko@pdmu.edu.ua

*Висока поширеність синдрому сухого ока, що супроводжує патології, асоційовані із системною запальною відповіддю (СЗВ) та оксидативно-нітрозативним стресом, зумовлює потребу в пошуку ефективних цитопротекторів для слюзових залоз. Одним із них є сульфорафан – природна сполука з вираженою антиоксидантною та протизапальною активністю. Досліджено вплив сульфорафану на показники оксидативно-нітрозативного стресу в тканинах слюзових залоз щурів за умов ліпополісахарид (ЛПС)-індукованої СЗВ. Експеримент проведено на статевозрілих білих щурах лінії Вістар, яких було розподілено на 3 групи: 1-ша – контрольна; 2-га – тваринам моделювали СЗВ, індуковану внутрішньоочеревинним введенням ЛПС *Salmonella typhi*; у 3-й – щурам внутрішньошлунково через зонд щодня протягом останнього тижня відтворення ЛПС-індукованої СЗВ призначали сульфорафан (10 мг/кг, внутрішньошлунково). Вивчали утворення супероксидного аніон-радикала (O_2^-), активність конститутивних та індукційної ізоформ NO-синтази (cNOS, iNOS відповідно), орнітиндекарбоксилази, вміст пероксинітритів, S-нітрозотіолів і аквапорину-5 у гомогенаті слюзових залоз. Введення сульфорафану супроводжувалося достовірним зменшенням утворення O_2^- : мікросомами на 28,6%, мітохондріями на 32,4%, НАДФН-оксидазою лейкоцитів на 50,7%, а також зниженням активності iNOS на 36,4%. Водночас активність cNOS зростала на 89,3%, орнітиндекарбоксилази – на 58,9%, індекс спряження cNOS підвищувався на 157%. Концентрація пероксинітритів і S-нітрозотіолів знижувалася на 60,1 і 13,7% відповідно. Вміст аквапорину-5 майже повністю відновлювався – до $0,51 \pm 0,01$ пг/мл щодо $0,27 \pm 0,01$ пг/мл у тварин 2-ї групи. Зроблено висновок про ефективну цитопротекторну дію сульфорафану на слюзові залози за умов ЛПС-індукованої СЗВ.*

Ключові слова: сульфорафан; системна запальна відповідь; ліпополісахарид; оксидативно-нітрозативний стрес; оксид азоту; NO-синтаза; аквапорин-5; слюзові залози.

ВСТУП

Слюзові залози є невід’ємною частиною системи, відповідальної за формування водного шару слізної плівки, що зволожує, захищає та забезпечує трофіку поверхні ока. Їхня функціональна активність відіграє ключову роль у збереженні оптичної прозорості рогівки, антибактеріальному захисті та відновленні пошкоджених епітеліальних клітин [1]. Порушення секреції та складу слюзової рідини, як наслідок дисфункції слюзових залоз, лежить

в основі патогенезу синдрому сухого ока – мультифакторного запального захворювання, що поширене серед пацієнтів із метаболічними порушеннями, автоімунними хворобами та посттравматичними станами [2, 3].

Одним з центральних патогенетичних чинників ураження залоз зовнішньої секреції у різних клінічних ситуаціях виступає системна запальна відповідь (СЗВ), яка може формуватися внаслідок ендотоксемії, травми, інфекційних захворювань та інтоксикацій [4].

У таких випадках залози стають мішенню прозапального цитокінового каскаду, що призводить до ушкодження ацинарних клітин, зменшення секреції, порушення бар'єрної функції та індукування апоптозу [5, 6]. Показано, що як низько-, так і високоінтенсивні фенотипи СЗВ супроводжуються генералізованим оксидативно-нітрозативним стресом – надлишковим утворенням активних форм кисню й азоту, що запускає каскад негативних молекулярних реакцій, таких як пероксидне окиснення ліпідів, нітרוзування білків і порушення функцій мітохондрій [4, 7].

За даними попередніх досліджень, відтворення ліпополісахарид (ЛПС)-індукованої СЗВ призводить до виражених змін в окисно-нітрозативному статусі слюзових залоз, зокрема до підвищення генерації супероксидного аніон-радикала (O_2^-), пероксинітритів та продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), порушення активності антиоксидантних ферментів та дисрегуляції метаболізму оксиду азоту (NO), що свідчить про активацію механізмів ушкодження за цих умов [8].

Ключовими регуляторами відповіді на оксидативно-нітрозативний стрес у слюзових залозах виступають транскрипційні фактори NF- κ B (англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) і Nrf2 (англ. nuclear factor erythroid-derived 2-like 2), які найчастіше відіграють протилежні функції в регуляції запалення та окисного гомеостазу. Активація NF- κ B ініціює експресію генів прозапальних цитокінів, адгезивних молекул і ферментів, що продукують активні форми кисню й азоту. Nrf2 навпаки активує транскрипцію антиоксидантних ферментів (глутатіонредуктази, супероксиддисмутази, гемоксигенази-1 тощо), сприяючи зменшенню наслідків оксидативно-нітрозативного стресу [4]. Однак за умов надмірної активації NF- κ B або дисбалансу в системі NF- κ B/Nrf2 протизапальні та антиоксидантні механізми втрачають ефективність, сприяючи прогресуванню та хронізації запалення.

Ці дані відкривають перспективи засто-

сування природних біоактивних сполук, здатних регулювати активність зазначених транскрипційних шляхів. Однією з найбільш перспективних серед таких молекул є сульфорафан – ізотіоціанат, що походить із глюкорафаніну, природного глюкозинолату, наявного в броколі та інших хрестоцвітних овочах. Він виявляє виражені цитопротекторні властивості щодо клітин органа зору при таких захворюваннях, як вікова макулярна дегенерація, діабетична ретинопатія, катаракта та кератоконус [9]. Його захисна дія реалізується переважно через активацію Nrf2-залежних антиоксидантних шляхів (Keap1 – Nrf2 – антиоксидант респонсивний елемент, Nrf2 – гемоксигеназа-1), пригнічення NF- κ B-залежного запального каскаду, а також через вплив на протеїнкіназу, активована аденозинмонофосфатом, та сигнальний шлях, асоційований з механістичною мішенню рапаміцину (mTOR), що забезпечує зниження окисного ушкодження клітин сітківки, рогівки та кришталика [9–11]. Саме ці властивості обґрунтовують перспективність вивчення сульфорафану як потенційного засобу корекції оксидативно-нітрозативного стресу в інших структурах ока, зокрема в тканинах слюзових залоз.

Незважаючи на зростаючу кількість публікацій, спрямованих на вивчення сульфорафану у контексті нейропротекції, гепатопротекції та антиканцерогенезу, дані про його вплив на тканини слюзових залоз, особливо за умов СЗВ, залишаються обмеженими.

Метою нашого дослідження була оцінка впливу сульфорафану на показники оксидативно-нітрозативного стресу в тканинах слюзових залоз щурів за умов ЛПС-індукованої СЗВ.

МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на 21 білому щурі лінії Вістар масою 180–220 г, розподілених на 3 групи по 7 тварин: 1-ша – контрольна; 2-га – тваринам моделювали ЛПС-інду-

ковану СЗВ; у 3-й – шурам внутрішньошлунково через зонд щодня протягом останнього тижня відтворення ЛПС-індукованої СЗВ призначали сульфорафан у дозі 10 мг/кг у ізотонічному розчині хлориду натрію [12]. Тваринам інших груп вводили еквівалентний об'єм розчинника.

Для відтворення СЗВ використовували ЛПС *Salmonella typhi* (“Sigma-Aldrich, Inc.”, США) в дозі 0,4 мкг/кг. ЛПС вводили тричі впродовж 1-го тижня, а протягом наступних 7 тиж – раз на тиждень [8].

При проведенні дослідження дотримувалися принципів біомедичної етики. Дозвіл на проведення експериментальної роботи надано комісією з питань етики та біоетики Полтавського державного медичного університету (протокол № 210 від 23.11.2022 р.). Евтаназію тварин здійснювали під внутрішньоочеревинним тіопенталовим наркозом (50 мг/кг).

Швидкість продукції $\cdot\text{O}_2^-$ у 10%-му гомогенаті сльозових залоз визначали за допомогою спектрофотометра Ulab 101 (Китай) за кольоровою реакцією з нітросинім тетразолієм. Для оцінки ролі окремих джерел утворення цієї сполуки застосовували специфічні індуктори: нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений (НАДН) – для дослідження внеску мітохондріального електронно-транспортного ланцюга; нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений (НАДФН) – мікросомальних монооксигеназ і NO-синтази (NOS); ліпополісахарид *S. typhi* (“Sigma-Aldrich, Inc.”, США) – НАДФН-оксидази лейкоцитів [13].

Загальну активність NOS оцінювали за зміною концентрації нітритів у 10%-му гомогенаті сльозових залоз після інкубації з L-аргініном (субстрат ферменту) та НАДФН [14]. Щоб ідентифікувати активність конститутивної NOS (сNOS), до середовища додавали 1%-й розчин аміногуанідину гідрохлориду (“Sigma-Aldrich, Inc.”, США), який інгібує індукцибельну ізоформу ферменту (іNOS) [15]. Активність останньої обчислювали як різницю між загальною NOS-активністю та

сNOS. Індекс спряження сNOS визначали як співвідношення активності сNOS до швидкості утворення $\cdot\text{O}_2^-$ НАДФН-залежними ланцюгами.

Вміст пероксинітритів лужних і лужно-земельних металів вимірювали у 10%-му гомогенаті сльозових залоз, використовуючи їх реакцію з йодидом калію в 0,2 М фосфатному буфері (pH 7,0). Оптичну щільність фіксували при довжині хвилі 355 нм [14]. Концентрацію S-нітрозотіолів визначали спектрофотометрично з використанням реактиву Гріса до та після їх окиснення хлоридом ртуті [16].

Для оцінки функціонального стану сльозових залоз у їхньому гомогенаті вимірювали концентрацію аквапорину-5 імуноферментним методом з використанням набору Rat Aquaporin 5 ELISA Kit (“MyBioSource.com”, США).

Аналіз результатів проводили з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel з додатковим модулем Real Statistics. Нормальність розподілу перевіряли за допомогою критерію Шапіро–Уїлка. При відповідності нормальному розподілу застосовували критерій t Стюдента для незалежних вибірок; у разі відхилення – використовували непараметричний тест Мана–Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За умов моделювання ЛПС-індукованої СЗВ у гомогенаті сльозових залоз вірогідно зростало утворення $\cdot\text{O}_2^-$ в усіх досліджуваних ензимних системах (табл. 1). Зокрема, швидкість його продукції мікросомальними монооксигеназами та NOS зростала на 64,6%, мітохондріями – на 70,3%, НАДФН-оксидазою лейкоцитів – на 131% порівняно з контролем.

Введення сульфорафану за умов експерименту сприяло вираженому зниженню продукції $\cdot\text{O}_2^-$ у гомогенаті сльозових залоз. Зокрема, швидкість його генерації мітохондріальним дихальним ланцюгом і НАДФН-оксидазою лейкоцитів знижувалася до рівня, близького до показників контролю. Порів-

Таблиця 1. Вплив сульфорафану на швидкість продукції супероксидного аніон-радикала у гомогенаті слюзових залоз за умов ліпополісахаридіндукованої системної запальної відповіді ($M \pm m$)

Умови досліджу	Джерела генерації супероксидного аніон-радикала, нмоль/с·г		
	Мікросомальні монооксигенази та NO-синтаза	Дихальний ланцюг мітохондрій	НАДФН-оксидаза лейкоцитів
Контроль	12,39 $\pm$ 0,45	16,64 $\pm$ 0,60	1,88 $\pm$ 0,15
Відтворення системної запальної відповіді	20,40 $\pm$ 0,75*	28,33 $\pm$ 02,60*	4,36 $\pm$ 0,28*
Введення сульфорафану на тлі системної запальної відповіді	14,57 $\pm$ 0,59*,**	19,16 $\pm$ 1,06**	2,15 $\pm$ 0,32**

Примітка: тут і в табл. 2 і 3: *P < 0,05 порівняно з контролем; **P < 0,05 порівняно зі значеннями тварин з системною запальною відповіддю.

няно зі значеннями 2-ї групи продукція цієї сполуки мікросомальними монооксигеназами та NOS була нижчою на 28,6%, дихальним ланцюгом мітохондрій – на 32,4%, НАДФН-оксидазою лейкоцитів – на 50,7%.

Отримані результати свідчать, що моделювання ЛПС-індукованої СЗВ супроводжується значним підвищенням утворення $\cdot O_2^-$ у гомогенаті слюзових залоз. Активація всіх досліджуваних джерел генерації активних форм кисню підтверджує розвиток інтенсивного оксидативного стресу на тлі СЗВ. Найбільш виражене зростання продукції $\cdot O_2^-$ було характерно для НАДФН-оксидази лейкоцитів, що відображає високу активність запально-клітинної відповіді при дії ЛПС. Це узгоджується з відомими механізмами активації фагоцитарної ланки імунітету, зокрема через стимуляцію NF- κ B-залежної експресії прозапальних білків [17].

На цьому фоні введення сульфорафану демонструвало потужну антиоксидантну дію, про що свідчить статистично значуще зниження швидкості утворення $\cdot O_2^-$ усіма електронно-транспортними ланцюгами. Особливо ефективним виявився вплив сульфорафану на активність НАДФН-оксидази лейкоцитів.

Одержані результати підтверджують дані літератури щодо здатності сульфорафану активувати транскрипційний фактор Nrf2 та одночасно інгібувати NF- κ B-опосередковані прозапальні сигнальні шляхи, що забезпечує

двобічну – антиоксидантну й протизапальну – дію [10, 11]. За умов СЗВ це дає змогу не лише зменшити надмірну генерацію активних форм кисню, а й частково відновити редокс-гомеостаз у секреторних тканинах, зокрема слюзових залозах.

Співвідношення активності ферментів NO-синтазного та аргіназного шляхів обміну L-аргініну розглядається як чутливий маркер функціонально-метаболічного стану слюзових залоз, особливо за умов запального процесу. Це зумовлено тим, що продукти цих шляхів – оксид азоту (NO) та поліаміни – беруть участь у регуляції судинного тону, клітинної проліферації, імунної відповіді та підтриманні редокс-гомеостазу [18, 19]. Порушення балансу між цими метаболічними напрямками може сприяти розвитку оксидативного та нітрозативного стресу, що є важливою ланкою патогенезу запальних уражень секреторних органів.

Відтворення ЛПС-індукованої СЗВ спричиняла вірогідне підвищення загальної активності NOS у гомогенаті слюзових залоз (табл. 2) – на 87,5% порівняно з контролем. Це зростання відбувалося переважно через iNOS, активність якої зростала на 101,0%. Водночас активність орнітиндекарбоксилази – ферменту аргіназного шляху метаболізму L-аргініну, що функціонально конкурує з NOS, – знижувалася на 39,6%. Активність cNOS так само зменшувалася на 56,9%, що

Таблиця 2. Вплив сульфорафану на активність ферментів NO-синтазного та аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну у гомогенаті слюзових залоз за умов ліпополісахаридіндукованої системної запальної відповіді ($M \pm m$)

Умови досліджу	Активність NO-синтази, мкмоль(NO_2^-)/ хв·г·білка			Активність орнітинде- карбоксилази, нмоль/г·хв
	загальна	конститутивна	індуцибельна	
Контроль	$7,03 \pm 0,35$	$0,65 \pm 0,04$	$6,39 \pm 0,32$	$250,1 \pm 16,9$
Відтворення системної запальної відповіді	$13,18 \pm 0,53^*$	$0,28 \pm 0,04^*$	$12,90 \pm 0,49^*$	$151,1 \pm 10,6^*$
Введення сульфора- фану на тлі системної запальної відповіді	$8,74 \pm 0,32^{***}$	$0,53 \pm 0,06^{**}$	$8,21 \pm 0,30^{***}$	$240,1 \pm 30,8^{**}$

свідчить про порушення регуляції NO-залежної сигналізації за умов експерименту.

Застосування сульфорафану за умов ЛПС-індукованої СЗВ призводило до зниження загальної та індукційної активності NOS на 33,7 і 36,4% відповідно порівняно з результатами 2-ї групи. Одночасно відзначалося достовірне підвищення активності орнітиндекарбоксилази на 58,9% та cNOS – на

89,3%, що свідчить про відновлення балансу між аргіназним та NO-синтазним шляхами метаболізму L-аргініну.

ЛПС-індукована СЗВ супроводжувалася достовірним зниженням індексу спряження cNOS (рис. 1) до $0,014 \pm 0,002$ порівняно з контролем ($0,053 \pm 0,004$), що свідчить про порушення ефективності ферментативного синтезу NO та переважання генерації $\cdot\text{O}_2^-$.

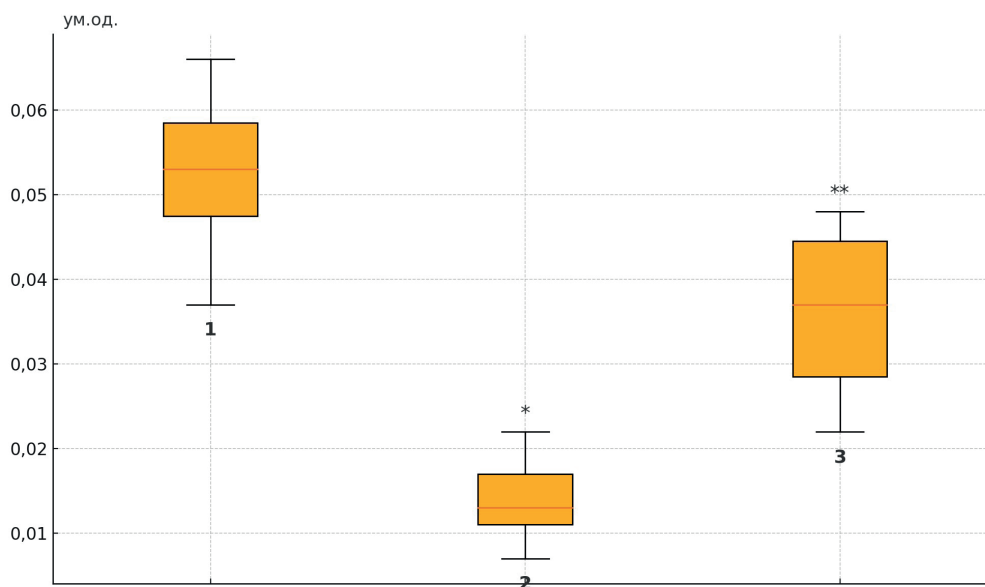


Рис. 1. Індекс спряження конститутивних ізоформ NO-синтази у гомогенаті слюзових залоз контрольних тварин (1), після відтворення ліпополісахаридіндукованої системної запальної відповіді (2) та введення на її тлі сульфорафану (3). * $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно зі значеннями тварин з системною запальною відповіддю

Введення сульфорафану за цих умов експерименту сприяло суттєвому зростанню цього індексу на 157%, до $0,036 \pm 0,004$, що вказує на часткове відновлення спряженого функціонування cNOS у тканинах слюзових залоз.

Одержані результати узгоджуються з даними літератури про ключову роль iNOS у розвитку нітрозативного стресу при СЗВ, зокрема внаслідок надмірного утворення пероксинітриту через взаємодію NO з O_2^- . На тлі активації iNOS фіксувалося значне зниження активності cNOS. Одночасно активність орнітиндекарбоксилази вірогідно зменшувалася. Це свідчить про порушення фізіологічного, регульованого синтезу NO та пригнічення біосинтезу поліамінів, ймовірно, як наслідок виснаження пулу L-аргініну або епігенетичної супресії аргіназного шляху [19].

Порушення функціонування cNOS за умов СЗВ підтверджується також достовірним зниженням індексу спряження цього ізоферменту. Це свідчить про неузгодженість між продукцією NO та генерацією O_2^- , що зумовлює переважання шкідливого вільнорадикального навантаження над сигнальною дією NO [20].

Здатність сульфорафану пригнічувати надмірну прозапальну активацію NOS, імовірно, пов'язана з блокуванням NF- κ B-опосередкованої транскрипції [21]. Водночас зростання активності орнітиндекарбоксилази може свідчити про активацію аргіназного шляху та відновлення вмісту поліамінів, необхідних для репаративних процесів [19]. Важливо, що сульфорафан сприяв також значному підвищенню індексу спряження cNOS,

що вказує на часткове відновлення фізіологічного функціонування cNOS і, відповідно, покращення редокс-гомеостазу в тканинах слюзових залоз.

У моделі ЛПС-індукованої СЗВ спостерігалось достовірне підвищення вмісту пероксинітритів лужних і лужноземельних металів, а також S-нітрозотіолів у гомогенаті слюзових залоз (табл. 3) – на 211 і 23,4% відповідно порівняно з контролем. Це свідчить про надмірну активацію нітрозативного стресу, що формується як наслідок взаємодії надлишково продукованого NO (переважно через iNOS) із O_2^- з утворенням пероксинітриту [22]. Одночасне накопичення S-нітрозотіолів, що є стабільними резервними формами NO, також свідчить про порушення регуляції в системі NO-залежної сигналізації та про ризик подальшого спонтанного або ферментативного вивільнення NO у високих концентраціях, що може поглиблювати тканинне ушкодження [23].

Застосування сульфорафану на тлі СЗВ демонструвало виражений коригуючий ефект – вміст пероксинітритів знижувався на 60,1%, а S-нітрозотіолів – на 13,7% порівняно з відповідними значеннями 2-ї групи. Це підтверджує, що сульфорафан здатний не лише зменшувати продукцію супероксидного аніон-радикала та NO (через пригнічення iNOS), але й потенційно сприяє активації механізмів детоксикації активних форм азоту. Подібна дія, ймовірно, реалізується через Nrf2-залежну індукцію антиоксидантних білків, а також супресію NF- κ B-опосередкованих

Таблиця 3. Вплив сульфорафану на вміст активних форм азоту в гомогенаті слюзових залоз за умов ліпополісахаридіндукованої системної запальної відповіді ($M \pm m$)

Умови досліджу	Вміст пероксинітритів лужних і лужноземельних металів, мкмоль/г	Вміст низькомолекулярних S-нітрозотіолів, мкмоль/г
Контроль	$1,15 \pm 0,06$	$0,77 \pm 0,01$
Відтворення системної запальної відповіді	$3,58 \pm 0,38^*$	$0,95 \pm 0,02^*$
Введення сульфорафану на тлі системної запальної відповіді	$1,43 \pm 0,08^{***}$	$0,82 \pm 0,05^{**}$

прозапальних реакцій [4].

Для оцінки функціонального стану слюзових залоз у гомогенаті тканин визначали концентрацію аквапорину-5 – мембранного білка, що формує водні канали в секреторному епітелії та забезпечує транспортування води через біологічні мембрани, визначаючи об'єм і склад слюзової рідини [24]. Відтворення ЛПС-індукованої СЗВ достовірно знижувало вміст аквапорину-5 у гомогенаті слюзових залоз (рис. 2) – до $0,27 \pm 0,01$ пг/мл гомогенату, що на 48,1% менше, ніж у контрольній групі. Така динаміка вказує на порушення секреторної функції внаслідок запального ураження та оксидативно-нітрозативного стресу, що призводить до дефіциту водного компонента слюзової плівки. Зниження концентрації цього білка є також опосередкованим маркером деструкції ацинарних клітин або порушення сигнальних шляхів, які регулюють його експресію, зокрема каскадів, пов'язаних з NF- κ B і прозапальними цитокінами [25].

Застосування сульфорафану за умов експерименту сприяло майже повному від-

новленню концентрації аквапорину-5 – до $0,51 \pm 0,01$ пг/мл, що на 88,9% перевищувало значення 2-ї групи. Такий ефект можна пояснити здатністю сульфорафану активувати транскрипційний фактор Nrf2, який не лише ініціює експресію антиоксидантних ферментів, а й може, як і деякі біофлавоноїди, опосередковано пригнічувати прозапальні сигнали, що негативно впливають на регуляцію аквапорину-5 [26]. Окрім того, антиоксидантний і протизапальний потенціал сульфорафану сприяє збереженню цілісності клітинних мембран і функціонального стану секреторного епітелію залоз.

Отримані результати свідчать, що сульфорафан чинить виражену антиоксидантну, антинітрозативну та цитопротекторну дію на тканини слюзових залоз за умов ЛПС-індукованої СЗВ, знижуючи утворення $\cdot\text{O}_2^-$, нормалізуючи NO-залежні метаболічні шляхи та сприяючи збереженню функціональної активності залоз, що обґрунтовує перспективність його подальшого дослідження як засобу цільової цитопротекції при запальних ураженнях органа зору.

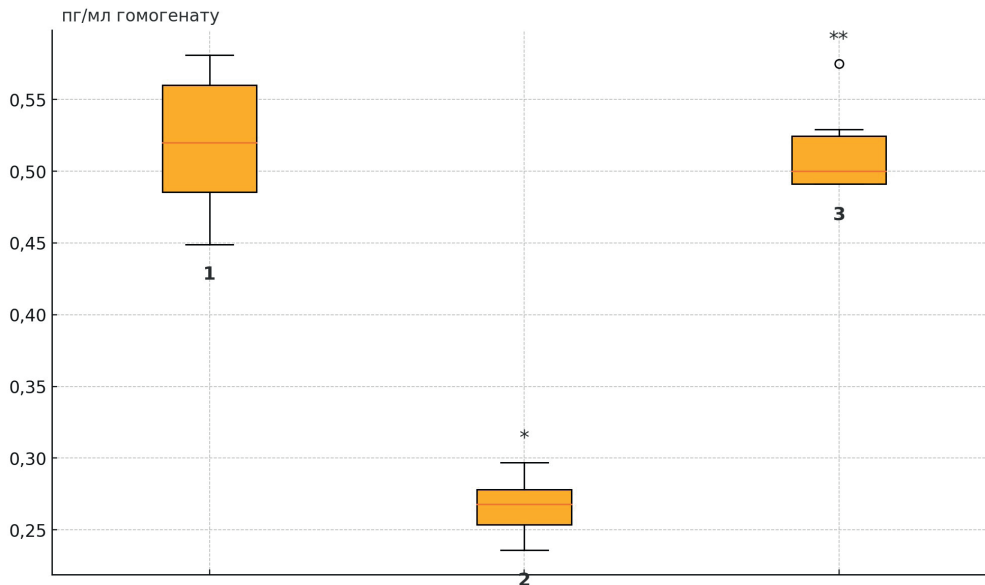


Рис. 2. Концентрація аквапорину-5 у гомогенаті слюзових залоз контрольних тварин (1), після відтворення ліпополісахаридіндукованої системної запальної відповіді (2) та введення на її тлі сульфорафану (3). * $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно зі значеннями тварин з системною запальною відповіддю

ВИСНОВКИ

Введення сульфорафану за умов відтворення ЛПС-індукованої системної запальної відповіді сприяє значному зменшенню проявів оксидативного й нітрозативного стресу у тканинах слізозових залоз внаслідок зниження продукції супероксидного аніон-радикала мікросомальними монооксигеназами та NO-синтазою, дихальним ланцюгом мітохондрій і НАДФН-оксидазою лейкоцитів, нормалізації процесу спряження конститутивних ізоформ NO-синтази, зменшення утворення активних форм азоту (пероксинітритів і S-нітрозотіолів). Одночасно відновлюється активність конститутивних ізоформ NO-синтази, підвищується активність орнітиндекарбоксилази та майже до контрольного значення відновлюється концентрація аквапорину-5.

Отримані результати свідчать про ефективну цитопротекторну дію сульфорафану на слізозові залози за умов ЛПС-індукованої системної запальної відповіді.

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.

T.O. Romantseva, V.O. Kostenko

EFFECT OF SULFORAPHANE ON OXIDATIVE AND NITROSATIVE STRESS MARKERS IN LACRIMAL GLAND TISSUES OF RATS UNDER LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE

Poltava State Medical University; Poltava;
e-mail: v.kostenko@pdmu.edu.ua

The high prevalence of dry eye syndrome, often associated with systemic inflammatory response (SIR) and oxidative/nitrosative stress, underscores the need to develop effective cytoprotective agents targeting the lacrimal glands. Sulforaphane, a naturally occurring compound with potent antioxidant and anti-inflammatory properties, has emerged

as a promising therapeutic candidate. This study evaluated the effects of sulforaphane on oxidative/nitrosative stress parameters in the lacrimal glands of rats subjected to lipopolysaccharide (LPS)-induced systemic inflammatory response (SIR). The experiment was conducted on adult male Wistar rats, randomly assigned to three groups: 1st group was control; 2nd group included rats modeled with SIR induced by intraperitoneal administration of *Salmonella typhi* LPS; the 3rd group, rats received sulforaphane (10 mg/kg, intragastrically) daily during the final week of LPS-induced SIR induction. The following markers were assessed in lacrimal gland homogenates: superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) production, activities of constitutive and inducible nitric oxide synthase (cNOS and iNOS), ornithine decarboxylase activity, peroxynitrite levels, S-nitrosothiols, and aquaporin-5 concentration. Sulforaphane administration resulted in a significant reduction $\text{O}_2^{\cdot-}$ production by 28.6% in microsomes, 32.4% in mitochondria, and 50.7% in NADPH oxidase of leukocytes. Inducible NOS activity decreased by 36.4%, while cNOS and ornithine decarboxylase activities increased by 89.3% and 58.9%, respectively; the cNOS coupling index rose by 157%; peroxynitrite and S-nitrosothiol concentrations decreased by 60.1% and 13.7%, respectively. Aquaporin-5 levels were nearly restored to normal, 0.51 ± 0.01 pg/ml vs. 0.27 ± 0.01 pg/ml in the 2nd group. These findings confirm the cytoprotective efficacy of sulforaphane on the lacrimal glands under LPS-induced SIR.

Key words: sulforaphane; systemic inflammatory response; lipopolysaccharide; oxidative/nitrosative stress; nitric oxide; NO-synthase; aquaporin-5; lacrimal glands.

REFERENCES

1. Pflugfelder SC, Stern ME. Biological functions of tear film. *Exp Eye Res.* 2020 Aug;197:108115. doi: 10.1016/j.exer.2020.108115.
2. Bosello F, Vanzo A, Zaffalon C, Polinelli L, Saggin F, Bonacci E, Pedrotti E, Marchini G, Bosello O. Obesity, body fat distribution and eye diseases. *Eat Weight Dis.* 2024 May 6;29(1):33. doi: 10.1007/s40519-024-01662-8.
3. Pieńczykowska K, Bryl A, Mrugacz M. Link between metabolic syndrome, inflammation, and eye diseases. *Int J Mol Sci.* 2025 Feb 28;26(5):2174. doi: 10.3390/ijms26052174.
4. 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.
5. Sekijima H, Hiramoto K, Kozawa S. A decrease in the tear secretion volume in a mouse model with ulcerative colitis. *Cutan Ocul Toxicol.* 2020 Dec;39(4):363-9. doi: 10.1080/15569527.2020.1825471.
6. de Campos TDP, da Cruz Rodrigues KC, Pereira RM, Anaruma CP, Dos Santos Canciglieri R, de Melo DG, da Silva ASR, Cintra DE,ROPelle ER, Pauli JR, de Moura LP. The protective roles of clusterin in ocular

- diseases caused by obesity and diabetes mellitus type 2. *Mol Biol Rep.* 2021 May;48(5):4637-45. doi: 10.1007/s11033-021-06419-5.
7. Frenkel Y, Chernov V, Kostenko H, Chopra H, Gautam RK, Kostenko V. Dietary supplementation with resveratrol attenuates serum melatonin level, pro-inflammatory response and metabolic disorder in rats fed high-fructose high-lipid diet under round-the-clock lighting. *Pathophysiology.* 2023 Feb 19;30(1):37-47. doi: 10.3390/pathophysiology30010005.
 8. Mykytenko AO, Matsytska YK, Akimov OY. Influence of lipopolysaccharide and the general adaptation syndrome on the development of oxidative-nitrosative stress in the lacrimal glands of rats. *Fiziol Zh.* 2023;69(2):71-7. doi:10.15407/fz69.02.071.
 9. Zhang Y, Zhao X, Liu Y, Yang X. Sulforaphane and ophthalmic diseases. *Food Sci Nutr.* 2024 May 22;12(8):5296-311. doi: 10.1002/fsn3.4230.
 10. Otoo RA, Allen AR. Sulforaphane's multifaceted potential: From neuroprotection to anticancer action. *Molecules.* 2023 Oct 1;28(19):6902. doi: 10.3390/molecules28196902.
 11. Song H, Wang YH, Zhou HY, Cui KM. Sulforaphane alleviates LPS-induced inflammatory injury in ARPE-19 cells by repressing the PWRN2/NF-kB pathway. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2022 Dec;44(6):868-76. doi: 10.1080/08923973.2022.2090954.
 12. Okulicz M, Hertig I. Acute sulforaphane action exhibits hormonal and metabolic activities in the rat: in vivo and in vitro studies. *Czech J Anim Sci.* 2016;61(1):22-31. doi: 10.17221/8665-CJAS.
 13. 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].
 14. Akimov OY, 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 Nov-Dec;88(6):70-5. doi: 10.15407/ubj88.06.070.
 15. 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. doi: 10.15407/ubj91.01.080.
 16. Gaston B, Reilly J, Drazen JM, Fackler J, Ramdev P, Arnette D, Mullins ME, Sugarbaker DJ, Chee C, Singel DJ, Loscalzo J, Stamler JS. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993 Dec 1;90(23):10957-61. doi: 10.1073/pnas.90.23.10957.
 17. Kannan G, Paul BM, Thangaraj P. Stimulation, regulation, and inflammaging interventions of natural compounds on nuclear factor kappa B (NF-kB) pathway: a comprehensive review. *Inflammopharmacology.* 2025 Jan;33(1):145-62. doi: 10.1007/s10787-024-01635-4.
 18. Chen CL, Hsu SC, Ann DK, Yen Y, Kung HJ. Arginine signaling and cancer metabolism. *Cancers (Basel).* 2021 Jul 15;13(14):3541. doi: 10.3390/cancers13143541.
 19. Xuan M, Gu X, Li J, Huang D, Xue C, He Y. Polyamines: their significance for maintaining health and contributing to diseases. *Cell Commun Sign.* 2023;21:348. doi: 10.1186/s12964-023-01373-0.
 20. Panday S, Kar S, Kavdia M. How does ascorbate improve endothelial dysfunction? A computational analysis. *Free Radic Biol Med.* 2021 Mar;165:111-26. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.031.
 21. Sampaio de Holanda G, Dos Santos Valença S, Maran Carra A, Lopes Lichtenberger RC, Franco OB, Ribeiro BE, Bittencourt Rosas SL, Santana PT, Lima Castelo-Branco MT, Pereira de Souza HS, Schanaider A. Sulforaphane and albumin attenuate experimental intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res.* 2021 Jun;262:212-23. doi: 10.1016/j.jss.2021.01.014.
 22. Prolo C, Piacenza L, Radi R. Peroxynitrite: a multifaceted oxidizing and nitrating metabolite. *Curr Opin Chem Biol.* 2024 Jun;80:102459. doi: 10.1016/j.cbpa.2024.102459.
 23. Zhang C, Biggs TD, Devarie-Baez NO, Shuang S, Dong C, Xian M. S-Nitrosothiols: chemistry and reactions. *Chem Commun (Camb).* 2017 Oct 12;53(82):11266-77. doi: 10.1039/c7cc06574d.
 24. Zhang K, Di G, Bai Y, Liu A, Bian W, Chen P. Aquaporin 5 in the eye: Expression, function, and roles in ocular diseases. *Exp Eye Res.* 2023 Aug;233:109557. doi: 10.1016/j.exer.2023.109557.
 25. Sharif M, Anjum I, Shabbir A, Khurram Syed S, Mubeen I, Hassaan Shahid M, Sarwar K. Amelioration of ovalbumin-induced allergic asthma by juglans regia via downregulation of inflammatory cytokines and upregulation of aquaporin-1 and aquaporin-5 in mice. *J Trop Med.* 2022 Mar 30;2022:6530095. doi: 10.1155/2022/6530095.
 26. Kozaeva R, Klymenko MO, Katrushov OV, Kostenko VO. Bioflavonoids as agents for correcting nitro-oxidative stress and salivary gland functions in rats exposed to alcohol during modeled lipopolysaccharide-induced systemic inflammatory response. *Wiad Lek.* 2022;75(3):685-90. doi: 10.36740/WLEK202203121.

*Матеріал надійшов
до редакції 16.05.2025*