

Особливості активності індукцибельної (iNOS) синтази у тканині міокарда щурів із інсулінорезистентністю та ожирінням за умов належного та обмеженого забезпечення йодом

Тодорів Т.В.

Івано-Франківський національний медичний університет, Івано-Франківськ, Україна

E-mail: taniastrokosh@gmail.com

Ключові слова:

- iNOS
- міокард
- інсуліно-резистентність

Анотація

Кардіоваскулярні та ендокринні захворювання (такі як цукровий діабет, ожиріння та йододефіцит) є головними медичними проблемами у всьому світі. В основі пошкодження судин та розвитку патологічних змін різних органів важливу роль має ендотеліальна дисфункція, NO-синтазна система та продуктів окисної модифікації білків (ОМБ). Дослідження проведені на нелінійних щурах, рандомізованих методом випадкової вибірки із інсулінорезистентністю, ожирінням за умов обмеженого та належного забезпечення йодом. Визначали активність індукцибельної (iNOS) синтази у тканині міокарда та стан ОМБ у сироватці крові та тканині міокарда. Збільшення рівня експресії iNOS у дослідних групах може бути тригером для довгострокових сигналів, які щодо розвитку запального процесу можуть носити як активуючий, та пригнічуючий характер. iNOS виступає як медіатор запалення (особливо на початковому етапі), що є важливим маркером для ризику розвитку серцево-судинних захворювань. Виявлено, що за умов інсулінорезистентності, ожиріння на тлі обмеженого та належного забезпечення йодом, зростає рівень окисно-модифікованих білків, що характеризується зростанням аліфатичних альдегідо- і кетондинітрофенілгідразонів нейтрального та основного характеру у сироватці крові та тканині міокарда.

Вступ

Кардіоваскулярні та ендокринні захворювання (такі як цукровий діабет, ожиріння та йододефіцит) є головними медичними проблемами у всьому світі. Згідно з результатами досліджень, у хворих на цукровий діабет ризик розвитку ішемічної хвороби серця, інфаркту міокарда та інших серцево-судинних захворювань зростає у 2-4 рази [1], що зумовлює значні економічні наслідки для пацієнта та національної системи охорони здоров'я.

В основі пошкодження судин та у розвитку патологічних змін різних органів важливу роль має ендотеліальна дисфункція. Ендотелій, який впливає на ендотеліальні рецептори в низьких концентраціях, має здатність синтезувати потужні вазоактивні речовини та індукувати вазодилатацію [2]. Важливим патогенетичним зв'язком між цими станами є оксид азоту (NO), який синтезується з амінокислоти L-аргініну. iNOS є макрофагальною ізоформою NO-синтази, яка присутня судинної мережі присутня не лише в макрофагах, а й у ендотеліальних клітинах, лімфоцитах, клітинах гладеньких м'язів [3]. Активація її відбувається під впливом запальних цитокінів та бактеріальних ендотоксинів.

За умов окисного стресу при патологічному процесі ендопатогенами виступають продукти перексидного окиснення, зокрема, окиснювальна модифікація білків (ОМБ) які є достовірними маркерами ураження тканин при вільнорадикальній патології [4].

Прогресуюче збільшення частоти захворювань серцево-судинної системи кровообігу за останнє десятиріччя зумовлює актуальність цієї проблеми і її медико-соціальне значення.

Тому метою роботи було дослідження активності індукцибельної (iNOS) синтази у тканині міокарда щурів та оцінити стан окислювальної модифікації білків (ОМБ) сироватки крові та тканин міокарда при інсулінорезистентності, ожирінні за умов належного та обмеженого забезпечення йодом.

Матеріал та методи

Дослідження проведені на нелінійних щурах, рандомізованих методом випадкової вибірки. Тварини були розділені на такі групи: 1-ша – інтактні (контрольна, n=15), 2-га - тварини з IP (n=15), 3-тя – тварини з ожирінням (n=15), 4-та - тварини, які перебували на йододефіцитній дієті (n=15), 5-та – тварини із IP за умов ЙД та 6-та - тварини із ожирінням та йододефіцитом (n=15).

Тварини контрольної групи (n=15) перебували на стандартному харчовому раціоні. Із метою моделювання IP до питної води тварин впродовж восьми тижнів додавали 10 % розчин фруктози [5]. Стан ЙД відтворювали шляхом двохмісячного утримання щурів на йододефіцитній дієті [6]. Для моделювання ожиріння тварини перебували на висококалорійній дієті [7]. Контроль за відтворенням аліментарного ожиріння здійснювали шляхом зважування тварин, вимірювання назально-анальної довжини та розрахунку індексу маси тіла (ІМТ). Для оцінки тиреоїдного статусу тварин методом імуноферментного аналізу вивчали вміст вільних трийодтироніну (fT₃) і тироксину (fT₄), тиреотропного гормону (ТТГ) у сироватці крові та визначали індекс fT₃/fT₄. Вуглеводний обмін вивчали за вмістом глюкози та інсуліну у сироватці крові натще з наступним обчисленням індексу НОМА-IP (Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance). Дослідженням активності iNOS визначали за методом Сумбаєва *in vivo* [?].

Щурів виводили з експерименту шляхом декапітації під кетаміновим наркозом (100 мг/кг маси тіла). Утримання та вигодовування тварин проводили відповідно до законодавства України (Закон України # 3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження 2006), Наказу МОЗ України # 281 від 01.11.2000 р. "Про міри по подальшому вдосконаленню організаційних норм роботи з використанням експериментальних тварин" та принципів Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986).

Статистичний аналіз результатів здійснено за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Excel та Statistica 5.5 (Multiple Regression) із використанням методів варіаційної статистики. Визначали середньоарифметичне значення (M), стандартну похибку (m), критерій Стьюдента (t), коефіцієнт вірогідності (p). За вірогідні приймали значення p < 0,05.

Результати дослідження

У результаті проведеного експерименту при інсулінорезистентності виявили збільшення рівня iNOS у 2,5 рази (p₁₋₂ < 0,001) в тканині міокарда щодо даних контролю (Табл. 24.1). Цукровий діабет, як відомо, спричинений руйнуванням інсулінсекретуючих клітин підшлункової залози. NO приймає участь в механізмах ушкодження цих клітин. Зв'язування інсуліну з рецепторами супроводжується активацією синтезу NO індукцибельною формою NO-синтази. При цьому спостерігали активацію переокисної декструкції протеїнів у сироватці крові та тканині міокарда (зростання E₃₅₆ – на 78,1%, p₁₋₂ < 0,05; E₃₇₀ – на 72,5%, p₁₋₂ < 0,01; E₄₃₀ – на 42,6%, p₁₋₂ < 0,05; E₅₃₀ – на 50,0%, p₁₋₂ < 0,01 та E₃₅₆ – на 58,9%, p₁₋₂ < 0,05; E₃₇₀ – на 55,2%, p₁₋₂ < 0,01; E₄₃₀ – у два рази, p₁₋₂ < 0,01; E₅₃₀ – у два рази, p₁₋₂ < 0,001 відповідно щодо даних контролю (Табл. 24.2).

При ожирінні та йододефіциті спостерігаємо збільшення iNOS у два рази (p₁₋₃ < 0,001) та на 43,3% (p₁₋₄ < 0,05). Окисний стрес і запалення тісно взаємопов'язані, оскільки окисний стрес може зумовлювати запалення, а окисний стрес і запалення зумовлюють пошкодження клітин. Запальні стани, внаслідок виділення прозапальних цитокінів, підвищують експресію iNOS у макрофагах та гладком'язових клітинах. У 3-й дослідній групі спостерігаємо вільнорадикальне пошкодження білкових біомолекул у сироватці крові та тканині міокарда, зокрема, збільшення ОМБ: E₃₅₆ – на 42,6% (p₁₋₃ < 0,05), E₃₇₀ – на 39,2% (p₁₋₂ < 0,01), E₄₃₀ – на 30,9% (p₁₋₃ < 0,05), E₅₃₀ – на 33,3% (p₁₋₃ < 0,01) та E₃₅₆ –

Табл. 24.1.: Зміни активності iNOS у сироватці крові та міокарді інтактних тварин, щурів із інсуліно-резистентністю, ожирінням та йододефіцитом ($M \pm m$).

Показник	1-ша контрольна (інтактні тварини)	2-га дослідна (інсуліно-резистентні тварини)	3-тя дослідна (тварини з ожирінням)	4-та дослідна (йододефіцитні тварини)	5-та дослідна (інсуліно-резистентні тварини за умов йододефіциту)	6-та дослідна (тварини з ожирінням за умов йододефіциту)
iNOS (нмоль/хв×мг)	10,4±1,25	25,9±2,14 p ₁₋₂ <0,001	20,9±2,05 p ₁₋₃ <0,001	14,9±1,42 p ₁₋₄ <0,05 p ₂₋₄ <0,001 p ₃₋₄ <0,05	28,3±3,86 p ₁₋₅ <0,001 p ₄₋₅ <0,001	26,2±3,22 p ₁₋₆ <0,001 p ₄₋₆ <0,01

Табл. 24.2.: Зміни вмісту продуктів окиснювальної модифікації білків (ОМБ) у сироватці крові та міокарді інтактних тварин, щурів із інсулінорезистентністю, ожирінням та йододефіцитом ($M \pm m$).

	E ₃₅₆ , нм	E ₃₇₀ , нм	E ₄₃₀ , нм	E ₅₃₀ , нм
ОМБ, сироватка крові				
1-ша контрольна (інтактні тварини)	1,48 ± 0,21	1,25 ± 0,16	0,68 ± 0,08	0,06 ± 0,06
2-га дослідна (інсулінорезистентні тварини)	2,35 ± 0,31 p ₁₋₂ < 0,05	1,94 ± 0,28 p ₁₋₂ < 0,05	0,97 ± 0,09 p ₁₋₂ < 0,05	0,09 ± 0,007 p ₁₋₂ < 0,01
3-тя дослідна (тварини з ожирінням)	2,11 ± 0,20 p ₁₋₃ < 0,05	1,74 ± 0,16 p ₁₋₃ < 0,05	0,89 ± 0,05 p ₁₋₃ < 0,05	0,08 ± 0,007 p ₁₋₂ < 0,05
4-та дослідна (йододефіцитні тварини)	0,88 ± 0,11 p ₁₋₄ < 0,05 p ₂₋₄ < 0,001 p ₃₋₄ < 0,001	0,79 ± 0,11 p ₁₋₄ < 0,05 p ₂₋₄ < 0,01 p ₃₋₄ < 0,01	0,46 ± 0,06 p ₁₋₄ < 0,05 p ₂₋₄ < 0,01 p ₃₋₄ < 0,001	0,05 ± 0,006 p ₂₋₄ < 0,05 p ₃₋₄ < 0,01
5-та дослідна (інсулінорезистентні тварини за умов йододефіциту)	2,21 ± 0,26 p ₁₋₅ < 0,05 p ₄₋₅ < 0,001	1,78 ± 0,17 p ₁₋₅ < 0,05 p ₄₋₅ < 0,001	0,94 ± 0,09 p ₁₋₅ < 0,05 p ₄₋₅ < 0,001	0,08 ± 0,007 p ₁₋₅ < 0,05 p ₄₋₅ < 0,01
6-та дослідна (тварини із ожирінням за умов йододефіциту)	1,99 ± 0,11 p ₁₋₆ < 0,05 p ₄₋₆ < 0,001	1,65 ± 0,16 p ₄₋₆ < 0,001	0,88 ± 0,04 p ₁₋₆ < 0,05 p ₄₋₆ < 0,001	0,07 ± 0,007 p ₄₋₆ < 0,05
ОМБ, міокард				
1-ша контрольна (інтактні тварини)	0,96 ± 0,13	1,02 ± 0,1	0,56 ± 0,09	0,05 ± 0,005
2-га дослідна (інсулінорезистентні тварини)	1,71 ± 0,32 p ₁₋₂ < 0,05	1,76 ± 0,22 p ₁₋₂ < 0,01	1,12 ± 0,16 p ₁₋₂ < 0,01	0,10 ± 0,01 p ₁₋₂ < 0,001
3-тя дослідна (тварини з ожирінням)	1,49 ± 0,18 p ₁₋₃ < 0,05	1,66 ± 0,19 p ₁₋₃ < 0,01	0,96 ± 0,1 p ₁₋₃ < 0,01	0,09 ± 0,008 p ₁₋₃ < 0,001
4-та дослідна (йододефіцитні тварини)	1,35 ± 0,12 p ₁₋₄ < 0,05	1,33 ± 0,1 p ₁₋₄ < 0,05	0,82 ± 0,08 p ₁₋₄ < 0,05	0,08 ± 0,008 p ₁₋₄ < 0,01 p ₂₋₄ < 0,05
5-та дослідна (інсулінорезистентні тварини за умов йододефіциту)	2,41 ± 0,43 p ₁₋₅ < 0,01 p ₄₋₅ < 0,05	2,86 ± 0,44 p ₁₋₅ < 0,001 p ₂₋₅ < 0,05 p ₃₋₅ < 0,05 p ₄₋₅ < 0,01	1,79 ± 0,27 p ₁₋₅ < 0,001 p ₂₋₅ < 0,01 p ₃₋₅ < 0,01	0,17 ± 0,02 p ₁₋₅ < 0,001 p ₃₋₅ < 0,01
6-та дослідна (тварини із ожирінням за умов йододефіциту)	1,93 ± 0,41 p ₁₋₆ < 0,05	2,35 ± 0,41 p ₁₋₆ < 0,01 p ₄₋₆ < 0,05	1,34 ± 0,24 p ₁₋₆ < 0,01	0,12 ± 0,02 p ₁₋₆ < 0,01 p ₄₋₆ < 0,001

на 55,2% (p₁₋₃ < 0,05), E₃₇₀ – на 62,7% (p₁₋₃ < 0,01), E₄₃₀ – на 71,4% (p₁₋₃ < 0,01), E₅₃₀ – на 80,0% (p₁₋₃ < 0,001) відповідно щодо даних контролю. При ізольованому йододефіциті виявили різнонаправлені зміни інтенсивності перекисної деструкції протеїнів у досліджуваних тканинах. Зокрема, у сиро-

ватці крові виявили зменшення вмісту ОМБ E_{356} – на 40,5% ($p_{1-4} < 0,05$), E_{370} – на 36,8% ($p_{1-4} < 0,01$), E_{430} – на 32,4% ($p_{1-4} < 0,05$), E_{530} – на 16,7% ($p_{1-4} < 0,05$) та збільшення фракцій у тканині міокарда: E_{356} – на 40,6% ($p_{1-4} < 0,05$), E_{370} – на 30,4% ($p_{1-4} < 0,05$), E_{430} – на 46,4% ($p_{1-4} < 0,05$), E_{530} – на 60,0% ($p_{1-4} < 0,01$) щодо даних у інтактних тварин.

Комбінована ендокринопатія зумовлює більше виражені зміни, зокрема, при інсулінорезистентності на тлі обмеженого забезпечення йодом у міокарді спостерігаємо збільшення активності iNOS у 2,7 рази ($p_{1-5} < 0,001$) та при ожирінні на тлі йододефіциту - збільшення активності iNOS у 2,5 рази ($p_{1-6} < 0,001$) щодо даних контролю. iNOS є високоінформаційним біомаркером ендотеліальної дисфункції, яка більше виражена при комбінованих ендокринопатіях. Такий розвиток призвів до суттєвої інтенсифікації ПООБ у тканині міокарда 5-ї та 6-ї дослідних груп. Зокрема, збільшення вмісту ОМБ E_{356} – у 2,5 рази ($p_{1-5} < 0,01$), E_{370} – у 2,8 рази ($p_{1-5} < 0,001$), E_{430} – у 3,2 рази ($p_{1-5} < 0,001$), E_{530} – у 3,4 рази ($p_{1-5} < 0,001$) та ОМБ E_{356} – у два рази ($p_{1-6} < 0,05$), E_{370} – у 2,3 рази ($p_{1-6} < 0,01$), E_{430} – у 2,4 рази ($p_{1-6} < 0,01$), E_{530} – у 2,4 рази ($p_{1-6} < 0,01$) відповідно щодо даних контролю.

Висновки

Збільшення рівня експресії iNOS у досліджуваних тканинах за вказаних експериментальних умов може бути тригером для довгострокових сигналів, які щодо розвитку запального процесу можуть носити як активуючий, так і пригнічуючий характер. Зростання активності iNOS є важливим маркером для ризику розвитку серцево-судинних захворювань.

Виявлено, що за умов інсулінорезистентності, ожиріння на тлі обмеженого та належного забезпечення йодом зростає рівень перекисної деструкції білків, що посилює пошкодження тканин міокарда.

Література

- [1] De Rosa S, Arcidiacono B, Chiefari E, Brunetti A, Indolfi C, Foti DP. Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: Genetic and Epigenetic Links. *Frontiers in Endocrinology* [Internet]. 2018 Jan 17;9. Available from: <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00002>
- [2] Пенішкевич ЯІ, Кучук ОП, Кузьо ОО. Роль ендотеліну-1 у патогенезі розвитку діабетичної ретинопатії. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія*. 2016;2(15):114-116.
- [3] Kot L, Konopelnyuk V, Dvorshchenko K, Vereschaka V, et al. NO-synthase activity and nitric oxide content in lymphoid cells of thymus and spleen of rats under conditions of diet-induced obesity. *The Ukrainian Biochemical Journal* [Internet]. 2021 Jul 8;93(3):84-91. Available from: <https://doi.org/10.15407/ubj93.03.084>
- [4] Denefil OV, Riabokon MO, Ryabokon SS, Usynskyi RS. Changes of lipid peroxide oxidation indices and antioxidant system in rats' internal organs under the influence of cardiotoxic dose of adrenalin. *Bukovinian Medical Herald* [Internet]. 2018 Dec 30;22(4 (88)):20-26. Available from: <https://doi.org/10.24061/2413-0737.XXII.4.88.2018.82>
- [5] Shuprovych A, Hurina N, Korpacheva-Zinych O. Disorders of uric acid metabolism in rats with fructose-induced experimental insulin resistance syndrome. *Fiziologichnyi zhurnal* [Internet]. 2011 Mar 2;57(1):72-81. Available from: <https://doi.org/10.15407/fz57.01.072>
- [6] Hlozhyk I, Strokosh T, Voronych-Semchenko N. Microelement status in rats under iodine deficiency and insulin resistance. *ТЕКА Arch Commis Med Sci*. 2017;5(1):67-72.
- [7] Marushchak MI, Myalyuk OP, Klishch IM. Experimental alimentary obesity: apoptosis, antioxidant system, macro- and microelements in the liver. *Medical and Clinical Chemistry* [Internet]. 2015 Dec 29;17(4). Available from: <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2015.v17.i4.5680>