ПРОТИВОВЪЗПАЛИТЕЛЕН ПОТЕНЦИАЛ НА ЕКСТРАКТ ОТ ДЪРВЕСИНА НА ЧЕРНИЦА: ЕФЕКТИ ВЪРХУ ТРАНСКРИПЦИОННИТЕ НИВА НА COX-2 И INOS В ПРЕАДИПОЦИТИ

Милка Нашар, Милена Пашева, Десислава Иванова, Диана Иванова

*Катедра по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика
Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна*

ANTIINFLAMMATORY POTENTIAL OF MULBERRY HEARTWOOD EXTRACT: EFFECTS ON THE TRANSCRIPTIONAL LEVELS OF COX-2 AND INOS IN PREADIPOCYTES

Milka Nashar, Milena Pasheva, Desislava Ivanova, Diana Ivanova

*Department of Biochemistry, Molecular Medicine and Nutrigenomics
Medical University “Prof. Dr Paraskev Stoyanov” - Varna*

РЕЗЮМЕ

Връзката възпаление – оксидативен стрес в мастна тъкан е фактор в появата на метаболитни нарушения, инсулинова резистентност и диабет. В мастната тъкан индуцируемите изоформи на ензимите циклооксигеназа и азотно окисна синтаза играят роля в механизма на развитие на диабета и неговите усложнения. Екстрактът от дървесина на черница има антиоксидантни свойства, но до сега няма данни за ефекта му върху тези ензими в условия на оксидативен стрес. Преадипоцитна клетъчна линия бе подложена на третиране с различни концентрации на екстракта в модел на оксидативен стрес, индуциран с третичен бутилов хидропероксид. Получените резултати показваха, че изследваният екстракт има инхибиращо действие върху експресията на двата ензима, като този ефект е значително подчертан в условия на оксидативен стрес. Тези резултати дават основание да се счита, че екстрактът от черница би имал благотворен ефект в превенцията и контрола на заболявания, свързани с нарушен метаболизъм в мастната тъкан.

Ключови думи: черница, преадипоцити, оксидативен стрес, COX-2, iNOS

ABSTRACT

The inflammation-oxidative stress relationship in adipose tissue could be a factor in the onset of metabolic disorders, insulin resistance and diabetes. In adipose tissue the inducible isoforms of the enzymes cyclooxygenase and nitric oxide synthase are recognized to play a role in the development of type 2 diabetes and its complications. The mulberry heartwood extract is known to possess antioxidant properties but there is a lack of data about its effects on these enzymes under oxidative stress. In the present study various concentrations of the extract were applied on a preadipocyte cell culture under tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress. The results obtained revealed that the extract inhibited the expression of both enzymes. This effect was markedly significant under oxidative stress conditions. Based on these results we concluded that the mulberry heartwood extract could have a beneficial effect in the prevention and control of diseases associated with impaired metabolism in adipose tissue.

Keywords: Mulberry, preadipocytes, oxidative stress, COX-2, iNOS

ВЪВЕДЕНИЕ

Оксидативният стрес в мастна тъкан увеличава риска от появата на възпаление, а оттам и до развитие на метаболитни нарушения, инсулиновата резистентност и диабет тип 2. Освен провъзпалителните адипокини и цитокини ключова роля в тези процеси имат и провъзпалителните ензими, чийто синтез се индуцира при оксидативен стрес, както и от различни провъзпалителни фактори. Простагландин-ендопероксид синтаза-2, известна също като циклооксигеназа-2 (COX-2), е индуцируем ензим, чийто ефект се изразява в продукцията на голямо количество простагландини, които стават амплификатори на възпалителния отговор (22). Индуцируемата азотно окисна синтаза (iNOS) се свързва със свръхпродукция на азотен оксид, който става медиатор на патологични процеси (2) и действа синергично с други възпалителни медиатори (22). Вещества, които са способни да потиснат индуцирането на COX-2 и iNOS, са потенциални противовъзпалителни средства, като антиоксидантните им свойства имат решаваща роля за това (6).

Черницата (*Morus nigra* L.) е дървесен растителен вид, чиито плодове, листа и кората на корените притежават противовъзпалително, диуретично, хипогликемично и хипотензивно действие (3,11,19). Освен като лечебно растение черницата има и други традиционни приложения - сърцевината на дървесината се използва като материал за бъчви, за съхранение и отлежаване на алкохолни напитки. Въпреки че алкохолните екстракти от дървесина на черница имат специфичен фитохимичен състав (5), доколкото ни е известно, все още няма данни за техните биологични ефекти. Наскоро беше установено, че етанолов екстракт от дървесина на черница проявява изразена антиоксидантна активност, ясно корелираща с високо полифенолно съдържание (18).

Целта на настоящото изследване бе да се установи какъв е ефектът на 40% етанолов екстракт от дървесина на черница върху експресията на гените за COX-2 и iNOS в модел на клетъчен оксидативен стрес в преадипоцити.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Обработка на дървесината и приготвяне на екстракта

Дървесината беше обработена по популярната технология на „опушване“, при която треските се варят 10 минути, след което се накисват в студена вода за 24 часа и се сушат за 15 минути

при температура 150-190°C. За приготвяне на извлеките е спазена пропорцията от традиционната рецепта за оцветяване на високоалкохолни напитки: 2g дървесина се поставят в 1 литър 40% етанол. Разтворът престоява в тъмни стъклени бутилки в продължение на 40 дни.

Дизайн на експеримента

Клетъчните линии, използвани в експериментите, са закупени от ATCC (American Type Culture Collection) – САЩ.

Клетки от преадипоцитна 3T3-L1 клетъчна линия (Swiss albino *Mus musculus*) бяха култивирани в DMEM хранителна среда (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza), с добавени към нея пеницилин/стрептомицин (100 U/ml крайна концентрация) и фетален телешки серум с крайна концентрация 10%. След инкубиране на тъмно при 37°C, 5% CO₂ и достигане на 70-80% конфлуентност, клетките бяха засяти в 6-ямкови фласки с първоначална гъстота 2x10⁵ кл/ямка и бяха подложени на различни третириания.

Бяха приготвени по три разреждания от екстракта от *M. nigra* (M) или 40% етанол (Et) в DMEM (без фенол ред), както следва: 6,25µl, 12,5µl или 25µl в 2 ml хранителна среда, съответно до крайна концентрация 0,3%, 0,6% и 1,25%. За индуциране на оксидативен стрес беше приложен третичен бутилов хидропероксид (tB), както е описано по-рано (24).

В зависимост от третирането бяха определени следните групи: група C (контрола нетретиранни клетки в хранителна среда), група tB (клетки с добавен оксидант в хранителната среда), групи M 0.3/0.6/1.25 и M 0.3+tB/0.6+tB/1.25+tB (клетки, третиран с крайна концентрация на екстракт от *M. Nigra*, съответно 0.3, 0.6 и 1.25%, без или в присъствието на оксидант), група Et 0.3/0.6/1.25 и Et 0.3+tB/0.6+tB/1.25+tB (клетки, третиран с крайна концентрация етанол, съответно 0.3, 0.6 и 1.25%, без или в присъствието на оксидант). След 24 часа инкубиране със съответното третиране клетките бяха подготвени за изолиране на РНК.

Генна експресия

Изолирането на обща РНК от клетките беше извършено с помощта на TriReagent, като при изпълнение на лабораторния протокол бяха следвани указанията на производителя (Ambion). С цел отстраняване замърсяването от геномна ДНК беше извършено ДНКазно третиране с DNase I RiboPure™-Blood Kit (Sigma). След получаване на чиста РНК беше осъществена реакция на обратна транскрипция за синтез на копи ДНК (кДНК) с помощта на Revertaid™ First Strand cDNA

Synthesis Kit (Fermentas). Амплификация на получената кДНК беше осъществена с количествен Real-Time PCR анализ в реално време (RT-PCR), с помощта на ген-специфични праймери. Праймерите бяха съставени с помощта на Real-Time PCR gene expression design tool със свободен достъп в интернет и синтезирани от Sigma-Aldrich (Germany) и Alpha DNA (Canada). Нуклеотидната последователност на праймерите, използвани за анализ на нивото на генната експресия на избрани гени, са представени в Таблица 1. Като ендогенна контрола, спрямо която се нормализират стойностите на флуоресценция, беше използван β -актин. Всички измервания бяха извършени в три повторения. Нивата на генната експресия са изчислени по $2^{-\Delta\Delta C_t}$ метода (13) и са представени в относителни единици, в сравнение с нетретирания контрола, при която нивото на експресия на анализирания ген се приема за единица.

Таблица 1. Нуклеотидна последователност на праймерите, използвани за RT-PCR анализ

ГЕН	НУКЛЕОТИДНА СЕКВЕНЦИЯ
β -actin (Sigma-Aldrich, Germany)	F: 5'-ACGGCCAGGTCATCACTATTG-3' R: 5'-CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAG-3'
COX-2 (Alpha DNA, Canada)	F: 5'-TGAGCAACTATTCCAAACCAGC-3' R: 5'-GCACGTAGTCTTCGATCACTATC-3'
iNOS (Alpha DNA, Canada)	F: 5'-GGCAGCCTGTGAGACCTTTG-3' R: 5'-GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC-3'

Статистически анализ

Получените стойности са представени като средна стойност от минимум три измервания $\pm$ стандартна грешка на средната стойност (Mean $\pm$ SEM). Статистическата обработка на данните е извършена с помощта на еднофакторен вариационен анализ (one-way ANOVA), последван от Dunnett's multiple comparison post test. Сравнения между всеки две независими групи е извършено със Student's t-test. За статистически достоверни се приемат стойности при $p < 0.05$. За статистическия анализ и графичното представяне на резултатите е използвана статистическата програма GraphPadPrism (v.5.00, GraphPad Software Inc.).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от промяна в транскрипционните нива на гените за COX-2 и iNOS под действието на изследвания екстракт са представени на Фигури 1 и 2. При третирането бяха приложени три нарастващи концентрации с цел установяване на евентуална зависимост на ефектите от процентното съдържание на екстракта в среда-

та за култивиране. Наред с това бяха приложени и същите концентрации етанол или етанол+оксидант с цел да се разграничат ефектите на екстрахираните от растението активни компоненти от тези на самия етанол като екстрагент. Концентрациите бяха подбрани въз основа на предварително проведен тест за цитотоксичност (17). Метаболизмът на третичния бутилов хидропероксид се асоциира с пероксидация на мембранните липиди и изчерпване на вътреклетъчните нива на глутатион (10,15,21). Ето защо това съединение широко се използва в научните изследвания като индуктор на клетъчен оксидативен стрес.

От двете фигури е видно, че приложеният оксидант предизвиква значително повишаване нивата на иРНК и на двата изследвани ензима в сравнение с нетретирания контрол (група tB).

Ефект върху нивата на иРНК за COX-2

Както е показано на Фигура 1, най-високата

концентрация на извлек от дървесина на *M. nigra* (1,25%) значително стимулира експресията на ензима спрямо нетретирания контрол ($p < 0.001$). Този ефект би могъл да бъде приписан на самия екстрагент, тъй като в клетките, третирани със същата концентрация етанол (Et 1.25), бяха отчетени многократно по-високи нива на иРНК за COX-2, както в сравнение с нетретирания контрол, така и с групата M1.25. В подкрепа на това допускане е и отчетеното многократно увеличение в нивата на иРНК за COX-2 в групата Et 1,25 + tB, вероятно поради кумулиране на индуциращия ефект на етанола и оксиданта. Потенциалът на етанола да индуцира експресията на COX-2 заедно с някои провъзпалителни цитокини е установен по-рано в подобни изследвания при преадипоцити (8). В същото време в клетките, претретирани с 1.25% екстракт с последващо прилагане на оксиданта (група M1.25+tB), беше установено потискане на експресията на ензима. Може да се предположи, че този ефект се дължи на екстрахираните в етанола активни растителни вещества. В предишно наше проучване беше установено, че *in vitro* антиоксидантната активност на екстракт от дървесина на

Фигура 1. Експресия на гена за COX-2 в 3T3-L1 преадипоцити, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на *t*-ButOОН индуциран оксидативен стрес; *** $p < 0.001$ спрямо C; ** $p < 0.01$ спрямо C; * $p < 0.05$ спрямо C; aa $p < 0.01$ спрямо Et 1,25; ab $p < 0.01$ спрямо Et 1,25+tB; ss $p < 0.01$ спрямо tB

черница силно корелира с високото му полифенолно съдържание (18).

Ефект върху нивата на иРНК за iNOS

Резултатите от анализа на генната експресия на iNOS показаха индуциране на транскрипционните нива на ензима в клетките, третирани със средната концентрация на екстракта (M0.6), докато в клетките, третирани с най-високата концентрация, нивата на иРНК бяха близки до тези в нетретирани контроли и значително по-ниски от тези в клетките, третирани с контролната концентрация етанол (група Et 1,25) ($p < 0.05$). И в този случай, както и по-горе, може да се предположи, че стимулиращият ефект на екстракта в група M0.6 се дължи на етанола, тъй като нивата на иРНК, измерени в клетките, третирани със същата контролна концентрация етанол (Et0.6), са близки до тези, индуцирани от оксиданта (група tB). Колкото до наблюдението, че екстрактът в най-високата си концентрация потиска експресията на iNOS (M1.25), може да се приеме, че този ефект се дължи на по-концентрираното количество полифеноли и други активни компоненти, екстрахирани от етанола. Този инхибиращ ефект на M1.25 се проявява и при прилагането му върху клетки с индуциран оксидативен стрес (група M1.25+tB). В тази група нивата на иРНК за iNOS бяха значително по-ниски от тези, отчетени в клетките, третирани с оксидант (tB), и в групата клетки, третирани едновременно с етанол и оксидант (Et 1,25+tB).

Доколкото ни е известно, представените от нас резултати са първите научни данни за ефекта на етанолов екстракт от дървесина на чер-

Фигура 2. Експресия на гена за iNOS в 3T3-L1 преадипоцити, третирани с нарастващи концентрации етанолов извлек от дървесина на *M. nigra* или етанол, в нормална хранителна среда или в условия на *t*-ButOОН индуциран оксидативен стрес; *** $p < 0.001$ и ** $p < 0.01$ спрямо C; *** $p < 0.001$ спрямо Et 0,3 и 1,25; ** $p < 0.01$ спрямо M 0,3 и 1,25; aaa $p < 0.001$ спрямо Et 1,25+tB; $p < 0.05$ спрямо Et 0,3+tB; bb $p < 0.01$ спрямо Et 0,6; $p < 0.05$ спрямо Et 1,25

ница върху транскрипционните нива на COX-2 и iNOS. Фактът, че този инхибиторен ефект е най-виден в условия на индуциран оксидативен стрес, навежда на мисълта, че антиоксидантните свойства на екстракта, дължащи се на богатото полифенолно съдържание (18), са тези, които допринасят за ограничаване на провъзпалителния статус в преадипоцити чрез потискане индукцията на двата ензима. Много автори докладват, че растителните екстракти, богати на полифеноли, проявяват противовъзпалителен потенциал, от една страна, чрез директно обезвреждане на активни кислородни форми, и от друга, чрез потискане експресията на редокс сензитивни гени, свързани с индукцията на провъзпалителни белтъци, включително и COX-2 и iNOS (14).

Двата изследвани от нас ензима имат ключова роля в патогенезата на голям брой хронични заболявания с различна етиология (7,16,23,27). Индукцията им в мастна тъкан се свързва най-често с развитие на инсулинова резистентност и с някои от усложненията при диабет (25). Така например установено е, че третиране с инхибитори на свръхпродукцията на азотен оксид води до облекчаване на диабетната невропатия (12,26,28). За лекарствата, инхибитори на COX-2, е показано, че ограничават развитието на ретинопатията и макроваскуларните усложнения при диабет (9,20), но пък могат да са причина за други усложнения (1,4). От тази гледна точка може да се очаква, че природни вещества с мощни антиоксидантни свойства биха намерили приложение

ние за превенцията на диабет тип 2, без нежеланите ефекти на конвенционалните лекарствени средства.

ИЗВОДИ

Резултатите от настоящото изследване дават основание да се обобщи, че благодарение на антиоксидантните си свойства екстрактът от черница потиска възникналото в условия на оксидативен стрес възпаление в мастната тъкан, медирано от индуцируемите изоформи на ензимите COX и NOS. Това разкрива потенциала на екстракта в превенцията и контрола на метаболитни нарушения, водещи до появата на диабет тип 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blackshear JL, Davidman M, Stillman MT. Identification of risk for renal insufficiency from nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arch Intern Med* 1983;143: 1130–1134.
2. Borutaite V, Moncada S, Brown GC. Nitric oxide from inducible nitric oxide synthase sensitizes the inflamed aorta to hypoxic damage via respiratory inhibition. *Shock*. 2005;23(4):319–23.
3. Chan KC, Yang MY, Lin MC, Lee YJ, Chang WC, Wang CJ. Mulberry leaf extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol- fed rabbits and in cultured aortic vascular smooth muscle cells. *J Agric Food Chem*. 2013; 61(11):2780–2788
4. Cheng HF, Harris RC. Renal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Curr Pharm Des* 2005;11: 1795–1804.
5. De Rosso MD, Cancian D, Panighe A, Vedova AD, Flamini R. Chemical compounds released from five different woods used to make barrels for aging wines and spirits: volatile compounds and polyphenols. *Wood Sci Tech*. 2009;43: 375–385
6. Dembinska-Kiec A, Mykkanen O, Kiec-Wilk B, Mykkanen H. Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *Br J Nutr* 2008; 99 E-Suppl. 1: ES109–ES117
7. Khaidar A, Marx M, Lubec B, Lubec G. L-Arginine reduces heart collagen accumulation in the diabetic db/db mouse. *Circulation* 1994;90: 479–483
8. Kiselova-Kaneva Y, Tasinov O, Vankova D, Ivanova D. Ethanol induces IL-6 and TNF- α cytokine and iNOS and COX-2 enzyme gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. *Scri Sci Med*. 2012; 44 (2): 31–3
9. Kohner EM. Aspirin for diabetic retinopathy. *BMJ* 2003;327: 1060–1061.
10. Kučera O, Endlicher R, Roušar T, Lotková H, Garnol T, Drahota Z, Červinková Z. The effect of tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress on lean and steatotic rat hepatocytes in vitro. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; Article ID 752506, 12 pages
11. Kumar A, Chauhan PK, Bhardwaj VS, Kumar R, Tyagi A. In vitro antioxidant and phytochemical investigations of ethanolic extracts of *Viola serpens* and *Morus nigra*. *J Chem Pharm Res*. 2011;3(4):166–171
12. Levy D, Tal M, Hoke A, Zochodne DW. Transient action of the endothelial constitutive nitric oxide synthase (ecNOS) mediates the development of thermal hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 2000;12: 2323–2332
13. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ method. *Methods*. 2001; 25 (4): 402–408
14. Marimoutou M, Le Sage F, Smadja J, Lefebvre d'Hellencourt C, Gonthier MP, Robert-Da Silva C. Antioxidant polyphenol-rich extracts from the medicinal plants *Antirhea borbonica*, *Doratoxylon apetalum* and *Gouania mauritiana* protect 3T3-L1 preadipocytes against H₂O₂, TNF α and LPS inflammatory mediators by regulating the expression of superoxide dismutase and NF- κ B genes. *J Inflamm (Lond)*. 2015;12:10. doi: 10.1186/s12950-015-0055-6. eCollection 2015
15. Martín C, Martínez R, Navarro R, Ruiz-Sanz JI, Lacort M, Ruiz-Larrea MB. tert-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: involvement of glutathione and free radicals. *Biochem Pharmacol*. 2001;62(6):705–12
16. Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain

- diseases. J Neuropathol Exp Neurol. 2004 S;63(9):901-10.
17. Pasheva M, Pavlov D, Tasinov O, Nashar M, Kiselova-Kaneva Y, Ivanova D. Cytoprotective and cytoproliferative effects of ethanol infusions from *Morus nigra* and *Cotinus coggygria* heartwood in 3T3-L1 preadipocytes. Scripta Scientifica Medica, 2013; 45, suppl. 6: 25-28
18. Pasheva M, Nashar M, Pavlov D, Slavova S, Ivanov D, Ivanova D. Antioxidant capacity of different woods traditionally used for coloring hard alcoholic beverages in Bulgaria. J Sci Technol. 2013;3 (1): 123-127
19. Pawlowska AM, Oleszek W, Braca A. Qualitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. J Agric Food Chem. 2008;56: 3377-3380
20. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. Am Heart J 1999; 138: S419-420.
21. Roy A, Sil PC. Tertiary butyl hydroperoxide induced oxidative damage in mice erythrocytes: Protection by taurine. Pathophysiology 2012;19 (2): 137-148
22. Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. Ann Ist Super Sanità 2007;43 (4): 394-405
23. Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, Arakawa S, Horike H, Komai N, et al. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. Am J Physiol Renal Physiol 2005;288: F1144-F1152,
24. Tasinov O, Kiselova-Kaneva Y, Ivanova D. *Sambucus ebulus* L. fruit aqueous infusion modulates GCL and GPx4 gene expression. Bulg J Agricult Sci 2013;19 (2): 143-146
25. Tian YF, Hsia TL, Hsieh CH, Huang DW, Chen CH, Hsieh PS. The importance of cyclooxygenase 2-mediated oxidative stress in obesity-induced muscular insulin resistance in high-fat-fed rats. Life Sci. 2011;89(3-4):107-14.
26. Vareniuk I, Pavlov IA, Obrosova IG. Inducible nitric oxide synthase gene deficiency counteracts multiple manifestations of peripheral neuropathy in a streptozotocin induced mouse model of diabetes. Diabetologia 2008;51: 2126-2133,
27. Zhai Y, Lu Q, Liu Y, Cheng Q, Wei Y, Zhang F et al. Over-production of nitric oxide by oxidative stress-induced activation of the TGF- β 1/PI3K/Akt pathway in mesangial cells cultured in high glucose. Acta Pharmacol Sin 2013; 34: 507-514
28. Zochodne DW, Misra M, Cheng C, Sun H. Inhibition of nitric oxide synthase enhances peripheral nerve regeneration in mice. Neurosci Lett 1997;228: 71-74

Адрес за кореспонденция:

Милка Аспарухова Нашар
 Катедра по биохимия, молекулна медицина и
 нутригеномика
 Медицински университет – Варна
 Ул. Марин Дринов №55
 9002 Варна, България
 e-mail: milka.nashar@mu-varna.bg