

© Фартушна А.М., Костенко В.О.

УДК 616.311.2-008.9-092.9: 615.916'175

СТАН ОКИСНЮВАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У ТКАНИНАХ ЯСЕН БІЛИХ ЩУРІВ У ДИНАМІЦІ ХРОНІЧНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ НІТРАТОМ НАТРІЮ

Фартушна А.М., Костенко В.О.

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

В експерименте на 40 белых крысах исследовано состояние процессов свободнорадикального окисления, антиоксидантной системы и энергетического обмена в тканях десны в динамике хронической интоксикации нитратом натрия (14, 30 и 90 сутки). Выявлено, что в условиях эксперимента в тканях десны отмечается прогрессирующее увеличение продукции супероксидного анион-радикала митохондриальной (начиная с 14-х суток интоксикации) и микросомальным (на 90-е сутки интоксикации) электронно-транспортными цепями. На 14-е сутки хронической интоксикации нитратом натрия в тканях десны выявляется увеличение активности антиоксидантного фермента каталазы без признаков активации процессов перексидного окисления липидов. В дальнейшем (на 30-е и 90-е сутки интоксикации) наблюдается активация этого процесса (увеличение концентрации ТБК-активных соединений) на фоне существенного снижения антиоксидантного потенциала (увеличение прироста концентрации ТБК-активных соединений за время 1.5 часовой инкубации в прооксидантном буферном растворе, уменьшение активности каталазы). Длительное введение избыточного количества нитрата натрия угнетает энергетический метаболизм в тканях десны крыс (уменьшается концентрация в тканях АТФ и АДФ, увеличивается содержание АМФ). В динамике изменений энергетического обмена в десне при хронической нитратной интоксикации отмечается определенная фазность: период активации биоэнергетических процессов, проявляющееся ростом энергетического потенциала, изменяется на 30-е сутки эксперимента периодом их прогрессирующего угнетения.

Ключевые слова: хроническая интоксикация нитратом натрия, свободнорадикальное окисление, антиоксидантная система, энергетический обмен, десна.

Епідеміологічні дослідження вказують на високу розповсюдженість основних стоматологічних захворювань у населення в екологічно несприятливих регіонах [1]. Захворювання пародонта (у т.ч. ясен) посідають друге місце по частоті та поширеності після карієсу. Частота гінгівітів у дітей та підлітків досягає від 30 до 80% випадків, у дорослих – 32-46% [5].

Недостатньо з'ясований патогенез захворювань ясен у мешканців екологічно несприятливих регіонів, зокрема, забруднених нітратами територій. Встановлено, що універсальний механізм дії нітратів пов'язаний з утворенням оксиду азоту (NO) [2,4]. Останній характеризується важкопрогнозованим характером дії на активність вільнорадикального окиснення, енергетичний обмін, проліферативні процеси, бере участь у патогенезі захворювань пародонта [7,15]. Зміни окислювальних процесів у тканинах ясен у динаміці хронічної інтоксикації нітратом натрію залишаються нез'ясованими.

Метою цієї роботи було вивчення стану процесів вільнорадикального окиснення, антиоксидантної системи та енергетичного обміну в тканинах ясен білих щурів у динаміці хронічної інтоксикації нітратом натрію.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження були проведені на 40 білих щурах лінії Вістар масою 180-210 г. У першій серії необхідні показники вивчали у інтактних тварин (контрольна серія); у другій, третій і четвертій – після відтворення хронічної інтоксикації нітратом натрію відповідно протягом 14, 30 та 90 діб.

Нітрат натрію вводили тваринам щоденно протягом терміну експерименту в дозі 200 мг/кг маси тіла у вигляді водного розчину. Введення здійснювали внутрішньошлунково за допомогою спеціального зонду. Використання цієї методики дозволяє відтворити над-

лишкове утворення NO та депонування його у вигляді парамагнітних комплексів з гемовим та негемовим залізом [2]. Евтаназію тварин виконували методом дислокації шийних хребців під ефірним наркозом.

Утворення супероксидного аніон-радикала (O_2^-) у тканинах ясен оцінювали при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм з індукторами у вигляді нікотинамідаденіндинуклеотиду відновленого (НАДН) та нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату відновленого (НАДФН) [6].

Рівень ПОЛ у тканинах оцінювали по утворенню в реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними продуктами забарвленого триметінового комплексу до і після 1,5-годинної інкубації [3]. Активність антиоксидантної системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час півторагодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю каталази [3].

Концентрацію аденозинтрифосфату (АТФ) у клітинах ясен визначали за допомогою вимірювання оптичної густини реагуючих речовин, яка пропорційна вмісту АТФ у пробі [12]. Вміст аденозинди- та монофосфату (АДФ і АМФ) визначали в одній пробі за допомогою сполучених реакцій [10]. На основі одержаних результатів обчислювали значення енергетичного потенціалу за формулою D.E. Atkinson [9].

Отримані дані піддавали статистичній обробці. Для перевірки розподілу на нормальність було застосовано розрахунок критерію Шапіро-Вілка. Якщо дані відповідали нормальному розподілу, то для їх порівняння використовували t-критерій Ст'юдента для незалежних вибірок. У випадку, коли ряди даних не підлягали нормальному розподілу, статистичну обробку здійснювали, використовуючи непараметричний метод – тест Мана-Вітні. Статистичні розрахунки прово-

дили з використанням програм "Microsoft Excel 2007" та "StatisticSoft 6.0".

Результати та їх обговорення

При відтворенні 14- та 30-добової інтоксикації нітратом натрію продукція \dot{O}_2^- мікросомальним елект-

ронно-транспортним ланцюгом (ЕТЛ) (табл. 1) істотно не змінюється, проте підвищується його утворення мітохондріями – відповідно до 24.42 ± 1.01 нмоль/г·с (на 14.4%, $p < 0,05$) та 27.67 ± 1.03 нмоль/г·с (на 29.7%, $p < 0,001$).

Таблиця 1
Зміни вільнорадикальних процесів та антиоксидантного захисту в тканинах ясен білих щурів за умов надлишкового надходження до організму нітрату натрію ($M \pm m$, $n=20$)

Показники	Інтактна група	Час введення нітрату натрію		
		14 діб	30 діб	90 діб
Продукція \dot{O}_2^- , нмоль/г·с мікросомальним ЕТЛ	18.42±0.64	19.57±0.96	20.26±1.07	22.34±0.58 *
Продукція \dot{O}_2^- мітохондріальним ЕТЛ	21.34±0.82	24.42±1.01 *	27.67±1.03 *	30.26±0.97 *
ТБК-реактанти, мкмоль/г до інкубації після інкубації приріст	27.1±2.8	26.5±3.3	35.3±2.5 *	37.3±2.1 *
	44.0±3.3	43.3±4.1	57.2±3.2 *	60.0±2.6 *
	16.9±1.3	16.8±1.6	21.9±1.2 *	22.7±1.0 *
Каталаза, мкат/г	2.84±0.28	3.57±0.14 *	1.99±0.13 *	1.56±0.10 *

Примітка. У табл. 1-2: * – $p < 0,05$ у порівнянні з даними інтактної серії.

За умов 90-добової інтоксикації нітратом натрію достовірно збільшується продукція \dot{O}_2^- не тільки мітохондріальним ЕТЛ – до 30.26 ± 0.97 нмоль/г·с (на 41.8%, $p < 0,001$), але і мікросомальним – до 22.34 ± 0.58 нмоль/г·с (на 21.3%, $p < 0,001$).

Збільшення продукції \dot{O}_2^- за умов утворення великої кількості NO з екзогенного джерела створює передумови для генерації високотоксичного пероксинітриту ($\cdot ONOO^-$), який, як сильний окиснювач, може здійснювати нітрування та нітрузування біомолекул [17].

При відтворенні 14-добової інтоксикації нітратом натрію достовірних змін концентрації ТБК-реактантів та їхнього приросту не виявлено. У той же час активність каталази достовірно збільшується – до 3.57 ± 0.14 мкат/г·с (на 25.7%, $p < 0,05$). Це, вочевидь, є реакцією на утворення надлишкової кількості АФК, оскільки активність цього ферменту індукується на рівні трансляції H_2O_2 [14].

За умов 30-денного введення нітрату натрію відмічається вірогідне зростання концентрації ТБК-реактантів до інкубації – до 35.29 ± 2.5 мкмоль/г (на 30.2%, $p < 0,05$) – та після 1,5-годинної інкубації тканин ясен в залізоаскорбатному буферному розчині – до 57.2 ± 3.2 мкмоль/г (на 30.0%, $p < 0,02$).

У цей же час виявляється суттєве підвищення приросту концентрації ТБК-реактантів за час інкубації – до 21.9 ± 1.2 мкмоль/г (на 29.6%, $p < 0,02$). Це вказує на розвиток антиоксидантної недостатності у тканинах ясен, що також підтверджується зниженням активності каталази – до 1.99 ± 0.13 мкат/г (на 29.9%, $p < 0,02$).

Вважається, що зниження активності каталази може бути пов'язано із зв'язуванням цього ферменту з продуктом метаболізму нітратів – NO – та утворенням менш активної ферікаталази-NO [11].

На 90 добу інтоксикації нітратом натрію виявлені зміни прогресують. Концентрація ТБК-реактантів до інкубації зростає – до 37.3 ± 2.1 мкмоль/г (на 37.6%, $p < 0,02$) – та після 1,5-годинної інкубації тканин ясен в залізоаскорбатному буферному розчині – до 60.0 ± 2.6 мкмоль/г (на 36.4%, $p < 0,01$). Приріст концентрації ТБК-реактантів за час інкубації підвищується – до 22.7 ± 1.0 мкмоль/г (на 34.3%, $p < 0,01$). Активність каталази знижується – до 1.56 ± 0.1 мкат/г (на 45.1%, $p < 0,01$).

Виснаження антиоксидантного потенціалу, в певній мірі, може бути зумовлене також NO-залежним пригніченням активності СОД через здатність NO взаємодіяти з іоном міді активного центру ферменту [13], порушенням глутатіонової й аскорбатної систем, зниженням вмісту вітаміну Е [8]. Адже всі перелічені сполуки є компонентами антиоксидантного захисту в тканинах пародонта.

Порушення енергетичного обміну розглядаються як один з головних механізмів ушкодження тканин за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію, який реалізується через утворення у ході біотрансформації нітрат- та нітрит-іонів оксиду азоту [2,4].

Через 14 діб від початку введення білим щурам нітрату натрію концентрація АТФ у тканинах ясен вірогідно зростає на 11.2% ($p < 0,02$) – до 2.08 ± 0.04 мкмоль/г (табл. 2).

Концентрація АМФ зменшується на 19.1% ($p < 0,001$) – до 0.72 ± 0.03 мкмоль/г. Відмічається зміна співвідношення аденіннуклеотидів, що супроводжується збільшенням величини енергетичного потенціалу – на 6.8% ($p < 0,02$) – до 0.663 ± 0.014 , що також підтверджує посилення ресинтезу макроергів. Такі зміни, вочевидь, відображують активацію біоенергетичних процесів при адаптації організму до впливу токсичного агента.

Зміни вмісту та співвідношення аденіннуклеотидів у тканинах ясен за умов надлишкового надходження до організму нітрату натрію ($M \pm m$, $n=20$)

Показники	Інтактна група	Час введення нітрату натрію		
		14 діб	30 діб	90 діб
АТФ, мкмоль/г	1.87±0.03	2.08±0.04 *	1.35±0.03 *	1.21±0.03 *
АДФ, мкмоль/г	1.26±0.03	1.35±0.06	1.11±0.04 *	0.98±0.03 *
АМФ, мкмоль/г	0.89±0.02	0.72±0.03 *	1.88±0.06 *	2.12±0.06 *
Сума аденін-нуклеотидів, мкмоль/г	4.02±0.09	4.14±0.18	4.34±0.15	4.31±0.13
Енергетичний потенціал	0.621±0.007	0.663±0.014 *	0.438±0.016 *	0.394±0.011 *

Через 30 діб від початку введення білим щурам нітрату натрію відмічається суттєве зниження концентрації АТФ і АДФ – відповідно на 27.8% ($p<0,001$) та 11.9% ($p<0,02$) – до 1.35±0.03 та 1.11±0.04 мкмоль/г. Вміст АМФ зростає – в 2.1 рази ($p<0,001$) – до 1.88±0.06 мкмоль/г, що свідчить про обмеження активності ресинтезу АТФ у тканинах ясен.

Енергетичний потенціал у цей термін зменшується – на 29.5% ($p<0,001$)- до 0.438±0.016, що свідчить про обмеження активності ресинтезу АТФ у тканинах ясен.

Така спрямованість зрушень зберігається в динаміці розвитку хронічної нітратної інтоксикації. Найбільш тяжкі порушення біоенергетичних процесів відмічаються за умов 90-денного введення нітрату натрію. В цей термін вміст АТФ і АДФ зменшується – відповідно на 35.3% ($p<0,001$) та 22.2% ($p<0,001$) – до 1.21±0.03 та 0.98±0.03 мкмоль/г. Концентрація АМФ зростає – в 2.4 рази ($p<0,001$) – до 2.12±0.06 мкмоль/г.

Енергетичний потенціал у цей термін зменшується – на 36.6% ($p<0,001$) – до 0.394±0.011, що свідчить про прогресування порушення ресинтезу АТФ у тканинах ясен.

Порушення біоенергетичних процесів у яснах за умов надлишкового надходження у організм нітрату натрію, вочевидь, опосередковуються утворенням продукту їх метаболізму – NO, який у великих концентраціях пригнічує у клітинах активність аконітази в циклі трикарбонових кислот, мітохондріальних ферментних комплексів (МФК) – НАДН-убіхіноноксидоредуктази (МФК-1), сукцинат-убіхіноноксидоредуктази (МФК-2), ключового ферменту гліколізу – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази [16]. Нітрозилування FeS груп (що беруть участь в транспорті електронів від флавінового компонента на убіхінон) в активному центрі МФК-1 і МФК-2 порушує окиснення основних субстратів тканинного дихання. Не виключається інгібуюча дія NO на інші флавінові ферменти, які містять FeS центри (наприклад, ацидо-КоА-дегідрогеназу, α -гліцерофосфатдегідрогеназу). Аконітаза (аконітат-гідратаза) пригнічується NO, ймовірно, за рахунок зв'язування з іоном двовалентного заліза, що входить в активний центр цього ферменту.

Висновки

1. У динаміці хронічної інтоксикації нітратом натрію у тканинах ясен білих щурів відмічається прогресивне збільшення продукції супероксидного аніон-радикала мітохондріальним (починаючи з 14-ї доби інтоксикації) та мікросомальним (на 90-ту добу інтоксикації) електронно-транспортними ланцюгами. На 14-ту добу хро-

нічної інтоксикації нітратом натрію в тканинах ясен виявляється збільшення активності антиоксидантного ферменту каталази без ознак активації процесів пероксидного окиснення ліпідів. У подальшому (на 30-ту та 90-ту добу інтоксикації) спостерігається активація цього процесу на тлі істотного зниження антиоксидантного потенціалу.

2. Тривале введення надлишкової кількості нітрату натрію пригнічує енергетичний метаболізм у тканинах ясен щурів. У динаміці змін енергетичного обміну в яснах при хронічній нітратній інтоксикації відмічається певна фазність: період активації біоенергетичних процесів, що виявляється зростанням енергетичного потенціалу, змінюється на 30-ту добу експерименту періодом їх прогресуючого пригнічення.

Література

1. Годованець О.І. Особливості клінічного перебігу хронічного катарального гінгівіту в дітей, що проживають на території з підвищеним рівнем нітратів у питній воді / О.І. Годованець, М.М. Рожко, З.Б. Попович // Галицький лікарський вісник. – 2007. – №3. – С.15-17.
2. Костенко В.О. Механізми порушення окисних процесів у тканинах при надлишковому утворенні оксиду азоту з ексогенних попередників / В.О. Костенко, А.Г. Костенко, С.В. Денисенко [та ін.] // Клін. та експ. патол. – 2004. – Т.3, № 2 (Ч.1). – С.202-204.
3. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / [Л.В.Беркало, О.В.Бобович, Н.О.Боброва та ін.]; За ред. І.П.Кайдашева. – Полтава, 2003. – 320 с.
4. Реутов В.П. Цикл оксида азота как механизм стабилизации содержания NO и продуктов его превращения в организме млекопитающих / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, А.И. Гоженко [и др.] // Актуал. пробл. трансп. мед. – 2008. – № 1 (11). – С. 22-28.
5. Фера О.В. Особливості розвитку захворюваності органів ротової порожнини серед дітей міста Ужгород віком 6-12 років / О.В. Фера, М.О. Фера, Г.-С.І. Сваявчик, О.М. Рошко // Наук. вісн. Ужгородськ. ун-ту, Сер. «Медицина». – 2012. – Вип. 1. – С. 155-161.
6. Цебржинский О.И. Дифференцированное спектрофотометрическое определение продукции супероксида в тканях НСТ-тестом / О.И. Цебржинский // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2002. – Т. 2, №1. – С.96-97.
7. Чайковська І.В. Роль порушень метаболізму оксид азоту в патогенезі хронічного генералізованого пародонтиту / І.В. Чайковська // Арх. клін. та експерим. мед. – 2008. – Т. 17, № 2. – С. 226-228.
8. Шугалей І.В. Влияние интоксикации нитритом натрия на активность ферментов антиоксидантной защиты и процессы пероксидации в эритроцитах мыши / И.В. Шугалей, И.В. Львов, И.В. Целинский, В.И. Баев // Укр. биохим. журн. – 1992. – Т.64, №2. – С. 111-114.
9. Atkinson D.E. The energy charge of the adenylate pools as a regulatory parameter: Interaction with feedback modifiers / D.E. Atkinson // Biochemistry. – 1968. – V.7, №11. – P. 4030-4034.
10. Jaworeck D. Adenosin-5'-diphosphat und Adenosin-5'-monophosphat / D. Jaworeck, W. Gruber, H.U. Bergmeyer

- // Methoden der enzymatischen Analyse. – Bd. II. – Weinheim : Verlag – Chemie, 1974. – S. 2179-2181.
11. Kim Y.S. Superoxide reactivates nitric oxide-inhibited catalase / Y.S. Kim, S. Han // Biol Chem. – 2000. – V.381, №12. – P. 1269-1271.
 12. Lamprecht W. ATP; Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat - Dehydrogenase / W. Lamprecht, I. Trautschold // Methoden der enzymatischen Analyse. – Bd. II. – Weinheim : Verlag – Chemie, 1974. – S. 2151-2159.
 13. Monzani E. Binding of nitrite and its reductive activation to nitric oxide at biomimetic copper centers / E. Monzani, G.J. Anthony, A. Koolhaas [et al.] // J Biol Inorg Chem. – 2000. – V.5, №2. – P. 251-261.
 14. Ponrdenz E. Alteration of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide / E. Ponrdenz, R. Kahl // Free Radical Biol Med. – 1998. – V.24, №1. – P. 27-38.
 15. Sá Siqueira M.A. Nitric oxide and oral diseases: can we talk about it? / M.A. de Sá Siqueira, R.G. Fischer, C.M. da Silva Figueredo [et al.] // Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. – 2010. – V.8, №2. – P. 104-112.
 16. Shiva S. Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase / S. Shiva, P.S. Brookes, R.P. Patel [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci USA. – 2001. – V. 98, №13. –P. 7212-7217.
 17. Szabó S. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics / C. Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi // Nature Reviews. – 2007. – V. 6. – P. 662-680.

Summary

THE CONDITION OF OXIDATION PROCESSES IN GINGIVAL TISSUES OF WHITE RATS IN THE DYNAMICS OF CHRONIC SODIUM NITRATE INTOXICATION

A.M. Fartushna, V.O. Kostenko

Key words: chronic sodium nitrate intoxication, free radical oxidation, antioxidant system, energy metabolism, gum.

40 white rats were used to study the condition of free radical oxidation, antioxidant and energy metabolism in gingival tissues in the dynamics under chronic sodium nitrate intoxication (on the 14th, 30th and 90th days). It has been revealed that under the experimental conditions in gingival tissues the progressive increases in production of superoxide anion radical by mitochondrial (starting on the 14th day of intoxication) and microsomal (on the 90th day of intoxication) electron transport chains have been detected. On the 14th day of chronic sodium nitrate intoxication the increasing activity of the antioxidant enzyme catalase without activation of lipid peroxidation has been revealed in gingival tissues. Later on (the 30th and 90th days of intoxication) this process (increasing of the concentration of TBA-active compounds) was observed to become more active due to the significant reduction in antioxidant capacity (increase in the increment of TBA-active compounds concentration for the 1.5-hour incubation in the pro-oxidant buffer solution, and decrease in the catalase activity). Prolonged administration of excessive sodium nitrate inhibits the energy metabolism in the gingival tissues of rats (lowering of ATP and ADP concentration in the tissues, and decrease of AMP content). The dynamics of changes in energy metabolism in the gums under chronic nitrate intoxication enables to reveal certain staging: the period of activation of bioenergy processes, manifested by the growth of the energy potential, changes on the 30th day of the experimental period of their progressive depression.

Higher State Educational Establishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava

Матеріал надійшов до редакції 15.11.2012 р.