

УДК 616.316-002-001-092: 615.916'172.6

Коваленко О.В., Костенко В.О.

### НО-ЗАЛЕЖНІ ЗМІНИ ПРОДУКЦІЇ СУПЕРОКСИДНОГО АНІОН-РАДИКАЛА В НИЖНЬОЩЕЛЕПНИХ СЛИННИХ ЗАЛОЗАХ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТРАВМАТИЧНОГО СІАЛАДЕНІТУ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

*У експерименті на 30 білих щурах досліджено продукцію супероксидного аніон-радикала ( $O_2^-$ ) у клітинах нижньощелепних слинних залоз (СЗ) за умов експериментального травматичного сіаладеніту та змін функціонального стану NO-синтаз. Виявлено, що зміни продукції  $O_2^-$  мікросомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами у тканинах інтактної нижньощелепної слинної залози залежать від функціональної активності конституційних NO-синтаз. Гіперпродукція  $O_2^-$  мітохондріальним і мікросомальним електронно-транспортними ланцюгами у клітинах нижньощелепної слинної залози за умов травматичного сіаладеніту пов'язана з функціонуванням індукцибельної ізоформи NO-синтази. Застосування L-аргініну та скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну обмежує гіперпродукцію  $O_2^-$  мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом у клітинах ушкодженої нижньощелепної слинної залози.*

**Ключові слова:** травматичний сіаладеніт, слинні залози, супероксидний аніон-радикал, оксид азоту, NO-синтази, пероксинітрит.

*Стаття є фрагментом планової НДР ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» «Кисень- та NO-залежні механізми ушкодження внутрішніх органів та їх корекція фізіологічно активними речовинами» (№ держреєстрації 0108U010079).*

У клінічній практиці хірургічної стоматології запальні захворювання щелепно-лицевої ділянки та травматичні ушкодження м'яких тканин обличчя залишаються актуальними питаннями. Хронічні запальні захворювання слинних залоз (СЗ) складають до 7% серед патології щелепно-лицевої ділянки, проте клініцисти відмічають значні труднощі у їхньому розпізнаванні з великим відсотком діагностичних помилок – 70-80% [3]. Доведено, що при запальних процесах чи травмі тканин щелепно-лицевої ділянки виникають реактивні зміни морфологічного та функціонального характеру у прилеглих СЗ [5].

Відновлення жувальної функції пластинковими протезами також негативно впливає на функцію СЗ. Значна кількість осіб, які використовують знімні протези, страждають на травматичний сіаладеніт (ТС) [7].

Відомо, що оксид азоту (NO) є важливим біорегулятором, виконує роль як внутрішньоклітинної, так і позаклітинної сигнальної молекули. Продукція NO in situ ацинарними клітинами СЗ є наслідком стимуляції певних рецепторів та залежить від регуляторного впливу іонів кальцію. Завдяки здатності вільно перетинати мембрани (шляхом простої дифузії) ендогенний NO грає важливу роль у забезпеченні процесу секреції слини, регуляції кровопостачання СЗ, нейротрансмісії, утворенні гістогематичного бар'єру, впливає на проліферацію та диференціювання тканин, що оточують СЗ [8, 16].

За умов запалення у тканинах слинних залоз істотно зростає продукція активних форм кисню, у т.ч. супероксидного аніон-радикалу [1]. Це створює передумови для утворення пероксинітриту [14].

У тканинах СЗ знайдено усі три ізоформи NO-синтаз (eNOS, nNOS, iNOS) [13]. Повідомляється про власні нітрат- та нітритредуктазні властивості слини.

Проте роль ізоформ NO-синтаз та

пероксинітриту у патогенезі розвитку ТС не визначена. З'ясування цього питання дозволить розширити існуючі засоби попередження та лікування цього захворювання.

Метою роботи було вивчення продукції активних форм кисню (супероксидного аніон-радикала) у клітинах СЗ за умов експериментального ТС та змін функціонального стану NO-синтаз.

#### Матеріали та методи

Дослідження були проведені на 30 білих щурах лінії Вістар масою 180-200 г. Травматичний сіаладеніт моделювали шляхом дозованого механічного пошкодження протоки нижньощелепної залози під ефірним наркозом (протягом 4 хвилин вивідну протоку підщелепної СЗ стискають та розтискають попеременно 1 раз на добу щоденно протягом 1 місяця) [4]. Тваринам протягом часу відтворення ТС внутрішньоочеревинно вводили відповідно ізотонічний розчин натрію хлориду ("плацебо"), неселективний інгібітор NO-синтаз – метиловий ефір нітро-L-аргініну (L-NAME), селективний інгібітор нейрональної NO-синтази – 7-нітроіндазол (7-NI), селективний інгібітор індукцибельної NO-синтази – аміногуанідин, субстрат NO-синтазної реакції – L-аргінін, скевенджер пероксинітриту – L-селенометіонін. Контролем слугували результати, одержані при дослідженні за тих же умов інтактної контрлатеральної нижньощелепної СЗ.

Зазначені вище сполуки вводили 2 рази на тиждень протягом часу відтворення хронічного ТС: L-NAME – у дозі 5 мг/кг [10], 7-NI – 30 мг/кг [10], аміногуанідин – 20 мг/кг [15], L-Arg – 500 мг/кг [2] та L-Sem – 3 мг/кг [10]. Евтаназію тварин виконували методом дислокації шийних хребців під ефірним наркозом.

Утворення  $O_2^-$  у гомогенаті СЗ оцінювали при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм з

індукторами у вигляді нікотинамідаденіндинуклеотиду відновленого (НАДН) та нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату відновленого (НАДФН) [6].

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 про-

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

**Результати дослідження та їх обговорення**

Відтворення ТС істотно не впливає на продукцію клітинами ушкодженої СЗ  $\text{O}_2^-$  у мікросомальному ЕТЛ (див. табл.), але призводить до збільшення його вироблення у мітохондріальному ЕТЛ – до  $15.45 \pm 0.49$  нмоль/г·с (на 14.9%,  $p < 0,001$ ).

Таблиця 1

*Зміни продукції супероксидного аніон-радикала у стандартній ділянці тонкої кишки білих щурів за умов моделювання її гострої непрохідності протягом 6 годин та введення інгібіторів NOS (M±m, n=30)*

Показники	Продукція $\text{O}_2^-$			
	мікросомальним ЕТЛ		мітохондріальним ЕТЛ	
	Інтактні СЗ	За умов ТС	Інтактні СЗ	За умов ТС
Введення ізотонічного розчину натрію хлориду (плацебо)	16.38±0.28	15.45±0.49	13.98±0.18	16.07±0.28 *
Введення L-NAME	15.08±0.23 *	14.12±0.28 */**	14.84±0.28 *	16.42±0.43 *
Введення 7-NI	15.5±0.22 *	17.29±0.25 */**	14.73±0.26 *	16.98±0.27 */**
Введення аміногуанідину	16.56±0.37	13.7±0.36 */**	13.31±0.32	14.55±0.32 **
Введення L-аргініну	17.03±0.32	15.56±0.43	13.67±0.34	15.02±0.26 */**
Введення L-селенометіоніну	15.87±0.4	15.77±0.52	13.53±0.28	14.47±0.35 **

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з даними інтактних СЗ щурів, яким вводили плацебо; \*\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з даними СЗ з моделюванням ТС у щурів, яким вводили плацебо.

Нами виявлено, що на продукцію  $\text{O}_2^-$  у тканинах СЗ у значній мірі впливає функціональна активність NOS.

Так, введення L-NAME знижує вироблення  $\text{O}_2^-$  мікросомальним ЕТЛ у тканинах інтактних СЗ – до  $15.08 \pm 0.23$  нмоль/г·с (на 7.9%,  $p < 0,01$ ), проте збільшує його продукцію мітохондріальним ЕТЛ – до  $14.84 \pm 0.28$  нмоль/г·с (на 6.2%,  $p < 0,05$ ).

Введення селективного інгібітору nNOS 7-NI також знижує вироблення  $\text{O}_2^-$  мікросомальним ЕТЛ у інтактних СЗ – до  $15.5 \pm 0.22$  нмоль/г·с (на 5.4%,  $p < 0,05$ ), але, як і при застосуванні L-NAME призводить до збільшення продукції  $\text{O}_2^-$  мітохондріальним ЕТЛ – до  $14.73 \pm 0.26$  нмоль/г·с (на 5.3%,  $p < 0,05$ ).

Введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину, L-аргініну та L-селенометіоніну істотно не позначається на рівні генерації  $\text{O}_2^-$  неушкодженими СЗ.

Відомо, що мікросомальний ЕТЛ, з яким пов'язана НАДФН-індукована продукція  $\text{O}_2^-$ , має спільні компоненти з НАДФН-диафороазою – маркером NO-синтази [9]. Тому пригнічення NO-синтаз може позначитися на продукції  $\text{O}_2^-$  [12,17]. При цьому звертає на себе увагу той факт, що пригнічення iNOS практично не позначається на рівні вироблення  $\text{O}_2^-$  інтактними СЗ, що, вочевидь, пов'язано з незначною функціональною активністю цього ферменту поза

умовами запального процесу.

Збільшення утворення  $\text{O}_2^-$  за умов введення неселективного інгібітору NOS L-NAME та селективного інгібітору nNOS 7-NI, очевидно, відбиває здатність конституційних NOS регулювати продукцію супероксиду, тобто виконувати протективну роль щодо накопичення та пошкоджуючої дії цього радикала.

Примітно, що продукція  $\text{O}_2^-$  у СЗ з експериментальним ТС децю по-іншому реагує на зміни функціональної активності NOS.

Так, якщо при введенні L-NAME знижується вироблення  $\text{O}_2^-$  мікросомальним ЕТЛ у тканинах СЗ з відтвореним ТС – до  $14.12 \pm 0.28$  нмоль/г·с (на 8.6%,  $p < 0,05$ ), та при застосуванні селективного інгібітору nNOS 7-NI величина вказаного показника збільшується – до  $17.29 \pm 0.25$  (на 11.9%,  $p < 0,01$ ).

Введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину призводить до зменшення продукції  $\text{O}_2^-$  мікросомальним ЕТЛ у тканинах СЗ з відтвореним ТС – до  $13.7 \pm 0.36$  нмоль/г·с (на 11.3%,  $p < 0,02$ ).

Таким чином, у тканинах СЗ за умов ТС nNOS справляє протективну дію щодо продукції  $\text{O}_2^-$  мікросомальним ЕТЛ, у той час як активність iNOS сприяє їй.

Введенні L-NAME істотно не позначається на виробленні  $\text{O}_2^-$  мітохондріальним ЕТЛ у тканинах СЗ з відтвореним ТС.

У той же час, застосування селективного інгібітору nNOS 7-NI збільшує величину цього показника – до  $16.98 \pm 0.27$  (на 5.7%,  $p < 0,05$ ).

Введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину, навпаки, призводить до зменшення продукції  $O_2^-$  мітохондріальним ЕТЛ у тканинах СЗ з відтвореним ТС – до  $14.55 \pm 0.32$  нмоль/г·с (на 9.5%,  $p < 0,01$ ).

Тобто, підтверджуються відмінності в ефектах nNOS та iNOS: функціонування першої супроводжується обмеженням продукції  $O_2^-$  мітохондріальним ЕТЛ у СЗ з відтвореним ТС, а другої – сприяє цьому процесу.

Примітно, що введення білим щурам субстрату NOS L-аргініну не тільки не сприяє збільшенню продукції  $O_2^-$  мітохондріальним ЕТЛ у СЗ з відтвореним ТС, але й обмежує цей процес. Так, вироблення  $O_2^-$  мітохондріальним ЕТЛ за цих умов зменшується – до  $15.02 \pm 0.26$  нмоль/г·с (на 6.5%,  $p < 0,02$ ).

Відомо, що L-аргінін поряд з тетрагідробіоптерином попереджають роз'єднання переносу електронів в оксигеназних ферментах, унаслідок чого кисень стає єдиним акцептором електронів, запобігаючи тим самим утворення  $O_2^-$  [12,17].

Введення білим щурам субстрату NOS L-аргініну не тільки не сприяє збільшенню продукції  $O_2^-$  мітохондріальним ЕТЛ у СЗ з відтвореним ТС, але й обмежує цей процес.

Застосування скевенджеру пероксинітриду (L-селенометіоніну) обмежує у СЗ з відтвореним ТС гіперпродукцію  $O_2^-$  мітохондріями – до  $14.47 \pm 0.35$  нмоль/г·с (на 10.0%,  $p < 0,01$ ).

Обмеження вироблення  $O_2^-$  мітохондріальним ЕТЛ при дії L-селенометіоніну, очевидно, відбиває здатність пероксинітриду пригнічувати біоенергетичні процеси у клітинах (інактивувати НАДН- та сукцинат-залежні мітохондріальні ферментні комплекси (МФК), руйнувати FeS-кластерів, нітрувати аконітазу, окиснювати тіолові групи аденіннуклеотидтрансферази та креатинкінази) [14]. Порушення функціонування мітохондріального ЕТЛ (особливо МФК-I) вважаються ключовими чинниками гіперпродукції  $O_2^-$  внутрішньою мембраною мітохондрій [11,14].

### Висновки

1. Зміни продукції супероксидного аніон-радикала мікросомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами у клітинах інтактної нижньощелепної слинної залози залежать від функціональної активності конституційних NO-синтаз. Введення неселективного інгібітору NOS L-NAME та селективного інгібітору nNOS 7-NI знижує вироблення  $O_2^-$  мікросомальним ЕТЛ у тканинах інтактних СЗ та збільшує його продукцію мітохондріальним ЕТЛ. Введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину, L-аргініну та скевенджеру пероксинітриду L-селенометіоніну істотно не впливає на цей процес.

2. Відтворення травматичного сіалоаденіту призводить до збільшення вироблення клітинами ушкодженої нижньощелепної слинної залози  $O_2^-$  у мітохондріальному електронно-транспортному ланцюзі, але істотно не впливає на його продукцію у мікросомальному.

3. Гіперпродукція  $O_2^-$  мітохондріальним і мікросомальним електронно-транспортними ланцюгами у клітинах нижньощелепної слинної залози за умов травматичного сіалоаденіту пов'язана з функціонуванням індукцибельної ізоформи NO-синтази. Застосування селективного інгібітору iNOS (аміногуанідину) попереджує збільшення вироблення  $O_2^-$ , введення 7-NI підвищує вироблення супероксиду, що вказує на роль nNOS у попередженні за цих умов гіперпродукції супероксидного аніон-радикала мітохондріями та мікросомами.

4. Застосування L-аргініну та скевенджеру пероксинітриду L-селенометіоніну обмежує гіперпродукцію  $O_2^-$  мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом у клітинах нижньощелепної слинної залози за умов травматичного сіалоаденіту.

### Література

1. Бабина О.А. Источники активных форм кислорода в тканях ротовой полости в норме и при патологии / О.А. Бабина, В.В. Бондаренко, М.А. Гранько [и др.] // *Стоматология*. – 1999. – Т. 78, № 5. – С. 9-11.
2. Дробінська О. Вплив L-аргініну на ураження в слизовій оболонці шлунка, спричинені серотоніном / О. Дробінська, Л. Остапченко, О. Цирюк [та ін.] // *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.* – 2004. – Вип. 38. – С. 201-204.
3. Лесовая И.Г. Частота неопухольевых заболеваний слюнных желез в пределах центрального и восточного регионов Украины / И.Г. Лесовая, А.А. Тимофеев // *Совр. стоматология*. – 2000. – № 2. – С. 67-70.
4. Пат. 28311 Україна, МПК А61В 5/03. Спосіб виготовлення моделі травматичного сіалоаденіту підщелепної залози / Чулак Л.Д., Залевська В.А., Шутурмінський В.Г., Чулак О.Л., Чулак Ю.Л.; заявник і патентовласник Залевська В.А. – Заявка № u200705666; Заявл. 22.05.2007; Опубл. 10.12.2007, Бюл. № 20.
5. Рыбалов О.В. Функционально-морфологическая перестройка околоушных и поднижнечелюстных слюнных желез на этапах развития сиалоаденита / О.В. Рыбалов, Л.М. Саяпина // *Вестн. стоматол.* – 1996. – № 2. – С. 290-292.
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. Клініка та лікування сіалоаденітів / [Чулак Л.Д., Левицький А.П., Залевська В.А., Шутурмінський В.Г.]. – Чернівці: Прут, 2006 – 114 с.
8. Cal C. Decrease in salivary secretion by radiation mediated by nitric oxide and prostaglandins / C. de la Cal, A. Lomniczi, C.E. Mohn [et al.] // *Neuroimmunomodulation*. – 2006. – V.13, №1. – P. 19-27.
9. Kathy K. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease / K. Kathy // *Circ. Res.* – 2000. – V.86. – P.494-502.
10. Laude K. NO produced by endothelial NO synthase is a mediator of delayed preconditioning-induced endothelial protection / K. Laude, J. Favre, C. Thuillez [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2003. – V.284, №6. – P. H2053-H2060.
11. Murphy M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species / M.P. Murphy // *Biochem. J.* – 2009. – V. 417. – P. 1–13.
12. Pou S. Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric oxide synthase / S. Pou, L. Keaton, W. Surichamorn, G.M. Rosen // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274, №14. – P. 9573-9580.

13. Soinila J. Nitric oxide synthase in human salivary glands / J. Soinila, K. Nuorva, S. Soinila // Histochem. Cell Biol. – 2006. – V. 125, №6. – P. 717-723.
14. Szabó S. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics / C. Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi // Nature Rev. – 2007. – V. 6. – P. 662-680.
15. Takeuchi K. Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats / K. Takeuchi, R. Hatazawa, M. Tanigami [et al.] // Life Sci. – 2007. – V. 80, №4. – P. 329-336.
16. Uğar-Cankal D. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases / D. Uğar-Cankal, N. Ozmeric // Clin. Chim. Acta. – 2006. – V.366, №1-2. – P. 90-100.
17. Xia Y. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase: A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process / Y. Xia, A.-L. Tsai, V. Berka, J.L. Zweier // J. Biol. Chem. – 1998. – V.273, №40. – P.25804-25808.

### Реферат

#### NO-ЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОДУКЦИИ СУПЕРОКСИДНОГО АНИОН-РАДИКАЛА В НИЖНЕЧЕЛЮСТНЫХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗАХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТРАВМАТИЧЕСКОМ СИАЛАДЕНИТЕ

Коваленко А.В., Костенко В.А.

Ключевые слова: травматический сиалоаденит, слюнные железы, супероксидный анион-радикал, оксид азота, NO-синтазы, пероксинитрит.

В эксперименте на 30 белых крысах исследована продукция супероксидного анион-радикала ( $O_2^-$ ) в клетках нижнечелюстных слюнных желез (СЗ) в условиях экспериментального травматического сиалоаденита и изменений функционального состояния NO-синтаз. Выявлено, что изменения продукции  $O_2^-$  митохондриальной и митохондриальной электронно-транспортными цепями в интактной нижнечелюстной слюнной железе зависят от функциональной активности конституционных NO-синтаз. Гиперпродукция  $O_2^-$  митохондриальной и митохондриальной электронно-транспортными цепями в клетках нижнечелюстной слюнной железы в условиях травматического сиалоаденита связана с функционированием индуцибельной изоформы NO-синтазы. Применение L-аргинина и сквенджера пероксинитрита L-селенометионина ограничивает гиперпродукцию  $O_2^-$  митохондриальной электронно-транспортной цепью в клетках поврежденной нижнечелюстной слюнной железы.

### Summary

#### NO-DEPENDENT CHANGES IN SUPEROXIDE ANION-RADICAL PRODUCTION IN SUBMANDIBULAR SALIVARY GLANDS UNDER EXPERIMENTAL TRAUMATIC SIALADENITIS

Kovalenko A.V., Kostenko V.A.

Key words: traumatic sialadenitis, salivary gland, superoxide anion radical, nitric oxide, NO-synthases, peroxynitrite.

Superoxide anion radical production ( $O_2^-$ ) in the cells of submandibular glands under experimental traumatic sialadenitis and changed functional status of NO-synthases has been studied in experiment on 30 white rats. We have found  $O_2^-$  production by microsomal and mitochondrial electron transport chain in intact submandibular salivary gland depends on functional activity of the constitutional NO-synthases.  $O_2^-$  hyperproduction by mitochondrial and microsomal electron-transport chain in the cells of the submandibular salivary gland under traumatic sialadenitis is connected with the functioning of inducible isoform of NO-synthase. L-arginine and peroxynitrite scavenger L-selenomethionine administration limits  $O_2^-$  hyperproduction by mitochondrial electron transport chain in damaged mandibular salivary gland.

УДК 616.33/342-002.44-005.1-08-092

Кононенко Н.М., Землянський К.В.

### ДЕСИНХРОНОЗ ТА ЕРОЗИВНО-ВИРАЗКОВІ УРАЖЕННЯ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА: ЕФЕКТ ЕНДОГЕННОГО МЕЛАТОНІНА

Національний фармацевтичний університет МОЗ України, м. Харків

*Десинхроноз викликав формування виразок шлунка у активних щурів, які отримували ін'єкції фізіологічного розчину. У пасивних у тесті «відкрите поле» щурів при зміщенні світлового режиму виразкоутворення не виявлено. У активних щурів, які отримували ін'єкції мелатоніна в дозах 1 і 2 мг/кг в світлий і темний час доби, зсув світлового режиму не викликав формування ерозивно-виразкових уражень слизової оболонки шлунка.*

Ключові слова: виразкоутворення, десинхроноз, мелатонін.

В даний час все більшої актуальності набуває проблема зсуву біологічних ритмів організму людини - джетлаг (англ. jet lag - синдром зміни часового поясу) або десинхроноз [4]. Чинники, що викликають порушення нормального біологічного ритму різні: позмінний або вахтовий режим роботи, перельоти на далекі від-

стані через один або кілька часових поясів, перехід на літній час і інші причини сприяють розвитку десинхронозу. Зрушення біологічних ритмів призводить до пригнічення активності людини, уповільнення розумової діяльності, порушень нормального ритму сну та неспання (що, в свою чергу, є важливим чинником розви-