

МОРФОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

© Фартушна А.М., Костенко В.О.
УДК 616.311.2-008.9-092.9: 615.916'175

НО-ЗАЛЕЖНІ ЗМІНИ ОКИСНЮВАЛЬНОГО МЕТАБОЛІЗМУ У ТКАНИНАХ ЯСЕН БІЛИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ НІТРАТОМ НАТРІЮ

Фартушна А.М., Костенко В.О.

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

В експерименте на 60 белых крысах исследовано состояние окислительного метаболизма в тканях десны крыс при хронической интоксикации нитратом натрия и изменениях функционального состояния NO-синтазы. Выявлено, что функциональная активность индуцибельной NO-синтазы в этих условиях способствует дополнительному образованию супероксида митохондриальной электронно-транспортной цепью, активации пероксидного окисления липидов (ПОЛ), снижает энергетический потенциал. С функционированием нейрональной NO-синтазы связана протективное действие NO на ткани десен. Введение L-аргинина ограничивает в клетках десен крыс выработку супероксида митохондриями и интенсивность ПОЛ, увеличивает антиоксидантный потенциал, но не влияет на активность каталазы и энергетический потенциал.

Ключевые слова: NO-синтаза, нитрат натрия, окислительный метаболизм.

Найбільш поширеними хімічними забруднювачами навколишнього середовища, поряд із важкими металами і пестицидами, вважаються нітрати. Переважна більшість території України є екологічно несприятливими регіонами в забрудненні нітратами та нітридами ґрунту і ґрунтових вод [7]. Найбільш суттєві перевищення ГДК нітратів у питній воді (45 мг/л) реєструвались у Полтавській, Миколаївській, Харківській і Дніпропетровській областях. Продукція рослинництва на цих територіях у порівнянні із забрудненням ґрунту характеризується більш високим вмістом нітратів.

Епідеміологічні дослідження останніх років 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 і поширеності після карієсу, тому є суттєвою проблемою стоматології.

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) [3]. Останній характеризується важкопрогнозованим характером дії на активність вільнорадикального окиснення, енергетичний обмін, проліферативні процеси, бере участь у патогенезі захворювань пародонта [6,11]. Механізми дії надлишкової кількості NO на тканини ясен за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію, у т.ч. залежні від функціональної активності NO-синтазних систем, практично не з'ясовані.

Метою роботи було вивчення продукції супероксидного аніон-радикала, стану пероксидного окиснення ліпідів, антиоксидантного захисту та вміста та співвідношення аденіннуклеотидів у тканинах ясен щурів за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію та змін функціонального стану NO-синтаз.

Матеріал та методи дослідження

Дослідження були проведені на 60 білих щурах лінії Вістар масою 180-200 г. У першій серії необхідні показники вивчали у інтактних тварин (контрольна серія); у другій серії – після відтворення хронічної інтоксикації нітратом натрію; у третій, четвертій, п'ятій і шостій серіях на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію тваринам вводилися відповідно неселективний інгібітор NO-синтаз – метиловий ефір нітро-L-аргініну (L-NAME), селективний інгібітор нейрональної NO-синтази – 7-нітроіндазол (NI), селективний інгібітор индуцибельної NO-синтази – аміногуанідин та субстрат NO-синтазної реакції – L-аргінін. Зазначені вище сполуки вводили 2 рази на тиждень протягом експерименту: L-NAME - у дозі 5 мг/кг [9], 7-NI – 30 мг/кг [9], аміногуанідин – 20 мг/кг [13], L-Arg – 500 мг/кг [2].

Нітрат натрію вводили тваринам у дозі 200 мг/кг маси тіла у вигляді водного розчину. Введення здійснювали внутрішньошлунково за допомогою спеціального зонду щоденно протягом 90 діб. Використання цієї методики дозволяє відтворити надлишкове утворення NO та депонування його у вигляді парамагнітних комплексів з гемовим та негемовим залізом [3].

Утворення супероксидного аніон-радикала (O_2^-) у гомогенаті ясен оцінювали при проведенні тесту з ніт-

росинім тетразолієм з індукторами у вигляді нікотинамідаденіндинуклеотиду відновленого (НАДН) та нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату відновленого (НАДФН) [5]. Рівень ПОЛ у тканинах оцінювали по утворенню в реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними продуктами забарвленого триметинового комплексу до і після 1,5-годинної інкубації [4]. Активність антиоксидантної системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час півторагодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю каталази [4]. Концентрації аденозинтри-, ди- та монофосфату (АТФ, АДФ і АМФ) визначали з використанням набору реактивів фірми «Берінгер Маннхайм ГмбХ» (Хеміше Фабрік, Мангейм, ФРН). Енергетичний потенціал обчислювали за формулою D.E. Atkinson. Отримані дані оброблювали варіаційно-статистичним методом з використанням критерію Ст'юдента.

Результати та їх обговорення

За умов 90-добової інтоксикації нітратом натрію достовірно збільшується продукція $\cdot\text{O}_2^-$ (табл. 1) не тільки мітохондріальним ЕТЦ - 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%, $p < 0,001$). 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%, $p < 0,01$). 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 [8].

Таблиця 1

Вплив інгібіторів і субстрату NO-синтаз на показники вільнорадикального окиснення та антиоксидантного захисту в тканинах ясен за умов надлишкового надходження до організму нітрату натрію (M+т, n=60)

Показники	Інтактна група	Нітрат (90 діб)	Нітрат + L-NAME	Нітрат + 7-NI	Нітрат + аміногуанідин	Нітрат + L-аргінін
Продукція $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним ЕТЛ, нмоль/г·с	18.42 ±0.64	22.34 ±0.58 *	20.57 ±0.54 */**	22.08 ±0.78 *	19.13 ±0.51 **	23.02 ±1.03 *
Продукція $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ, нмоль/г·с	21.34 ±0.82	30.26 ±0.97 *	28.52 ±1.14 *	33.42 ±0.74*/**	26.21 ±0.87 */**	27.28 ±0.79*/**
ТБК-реактанти до інкубації, мкмоль/г	27.1 ±2.8	37.3 ±2.1 *	34.3 ±3.7	44.3 ±2.3 */**	29.8 ±2.5 **	30.2 ±2.4 **
ТБК-реактанти після інкубації, мкмоль/г	44.0 ±3.3	60.0 ±2.6 *	56.2 ±4.6	70.2 ±1.7 */**	48.3 ±3.1 **	49.3 ±3.2 **
Приріст концентрації, мкмоль/г	16.9 ±1.3	22.7 ±1.0 *	21.9 ±1.8*	25.9 ±0.6 */**	18.5 ±1.2 **	19.1 ±1.2 **
Каталаза, мкат/г	2.84 ±0.28	1.56 ±0.10 *	2.07 ±0.21*/**	1.47 ±0.05*	2.48 ±0.20 **	1.81 ±0.32*

Примітка. В табл. 1-2: * - $p < 0,05$ у порівнянні з відповідною групою тварин інтактної серії; ** - $p < 0,05$ у порівнянні з у порівнянні з серією з 90-добовим введення нітрату.

Введення у динаміці хронічної інтоксикації нітратом натрію L-NAME знижує вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним ЕТЛ у тканинах ясен - до 20.57 ± 0.54 нмоль/г·с (на 7.9%, $p < 0,05$) та істотно не позначається на його продукції мітохондріальним ЕТЛ. Введення 7-NI достовірно не позначається на продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним ЕТЛ, проте підвищує вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ - до 33.42 ± 0.74 нмоль/г·с (на 10.4%, $p < 0,05$). Введення на аміногуанідину також достовірно не позначається на продукції $\cdot\text{O}_2^-$ у тканинах ясен мікросомальним ЕТЛ, але, на відміну від дії селективного інгібітору nNOS, знижує вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ - до 26.21 ± 0.87 нмоль/г·с (на 13.4%, $p < 0,01$).

Введення L-аргініну достовірно не позначається на продукції у тканинах ясен $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним ЕТЛ, проте знижує вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ - до 27.28 ± 0.79 нмоль/г·с (на 9.8%, $p < 0,05$).

Введення у динаміці хронічної інтоксикації нітратом натрію L-NAME достовірно не впливає на зміни концентрації ТБК-реактантів та їхнього приросту. Введення 7-NI достовірно збільшує концентрацію ТБК-

реактантів до інкубації - до 44.3 ± 2.3 мкмоль/г (на 18.8%, $p < 0,05$) - та після 1,5-годинної інкубації гомогенату ясен в залізоаскорбатному буферному розчині - до 70.2 ± 1.7 мкмоль/г (на 17.0%, $p < 0,01$). Виявляється суттєве підвищення приросту концентрації ТБК-реактантів за час інкубації - до 25.9 ± 0.6 мкмоль/г (на 14.1%, $p < 0,02$), що вказує на функціональну роль nNOS щодо підтримки антиоксидантного потенціалу та обмеження процесів ПОЛ.

У той же час, введення аміногуанідину, навпаки, достовірно зменшує концентрацію ТБК-реактантів до інкубації - до 29.8 ± 2.5 мкмоль/г (на 20.1%, $p < 0,05$) - та після 1,5-годинної інкубації тканин ясен в залізоаскорбатному буферному розчині - до 48.3 ± 3.1 мкмоль/г (на 19.5%, $p < 0,02$), приріст концентрації ТБК-реактантів за час інкубації - до 18.5 ± 1.2 мкмоль/г (на 18.5%, $p < 0,02$). Це підтверджує, що експресія iNOS сприяє активації ПОЛ та обмеженню антиоксидантного потенціалу.

Введення L-аргініну достовірно зменшує концентрацію ТБК-реактантів до інкубації гомогенату ясен - до 30.2 ± 2.4 мкмоль/г (на 15.9%, $p < 0,05$) - та після 1,5-

годинної інкубації тканин ясен в залізоаскорбатному буферному розчині – до 49.3 ± 3.2 мкмоль/г (на 17.8%, $p < 0,05$). Виявляється суттєве зменшення приросту концентрації ТБК-реактивів за час інкубації - до 19.1 ± 1.2 мкмоль/г (на 15.9%, $p < 0,05$), що вказує на підвищення антиоксидантного потенціалу у тканинах ясен щурів.

Введення у динаміці хронічної інтоксикації нітратом натрію L-NAME та аміногуанідину достовірно збільшують активність каталази – відповідно до 2.07 ± 0.21 мкат/г (на 32.7%, $p < 0,05$) та 2.48 ± 0.20 мкат/г (на 59.0%, $p < 0,01$). Введення за цих умов 7-NI достовірно не позначається на величині цього показника. Вочевидь, додаткове утворення оксиду азоту iNOS сприяє утворенню менш активної ферикаталази-NO [8].

Введення у динаміці хронічної інтоксикації нітратом натрію L-аргініну достовірно не позначається на величині активності каталази.

Загальновідомою є неоднозначна дія NO на процеси енергетичного обміну. З одного боку, є повідомлення щодо здатності NO активувати внутрішньоклітинні процеси, які забезпечують синтез АТФ і проліферацію клітин шляхом переведення ферментів у більш активну мембранозв'язану форму. З іншого боку, оксид азоту, особливо у великих концентраціях, порушує як аеробні, так і анаеробні процеси енергоутворення. Так, NO виявляє здатність пригнічувати

аконітат-гідратазу у циклі трикарбонових кислот, нітрозилувати FeS кластери в активному центрі 1-го і 2-го мітохондріального ферментного комплексів (МФК), взаємодіяти з компонентами 3-го МФК та цитохром с оксидазою [12], пригнічувати залізо- і мідьвмісні ферменти. NO може також пригнічувати ключовий фермент анаеробного гліколізу - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу [10].

Через 90 діб від початку введення білим щурам нітрату натрію відмічається суттєве зниження концентрації АТФ і АДФ (табл. 2) - 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 істотне порушення ресинтезу АТФ у тканинах ясен.

Так, введення на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію 7-NI достовірно зменшує концентрацію АТФ у тканинах ясен – на 9.89% ($p < 0,02$) - до 1.09 ± 0.03 мкмоль/г. Енергетичний потенціал за цих умов знижується – на) 9.90% ($p < 0,02$) - до 0.355 ± 0.007 . Такі зміни ілюструють здатність NO, що продукується у порівняно незначній кількості конститутивними NOS, активувати ресинтез АТФ у тканинах ясен за умов надлишкового утворення великих кількостей NO шляхом відновлення нітрат- та нітрит-іонів.

Таблиця 2
Вплив інгібіторів і субстрату NO-синтаз на вміст та співвідношення аденіннуклеотидів у тканинах ясен за умов надлишкового надходження до організму нітрату натрію (M±m, n=30)

Показники	Інтактна група	нітрат (90 діб)	нітрат + L-NAME	нітрат + 7-NI	нітрат + аміногуанідин	нітрат + L-аргінін
АТФ, мкмоль/г	1.87 ±0.03	1.21 ±0.03 *	1.19 ±0.05 *	1.09 ±0.03*/**	1.37 ±0.04 */**	1.12 ±0.06*
АДФ, мкмоль/г	1.26 ±0.03	0.98 ±0.03 *	0.89 ±0.06 *	0.87 ±0.05 *	1.07 ±0.03 *	0.86 ±0.07 *
АМФ, мкмоль/г	0.89 ±0.02	2.12 ±0.06 *	2.13 ±0.14 *	2.33 ±0.13 *	1.8 ±0.05*/**	2.15 ±0.17 *
Сума аденіннуклеотидів, мкмоль/г	4.02 ±0.09	4.31 ±0.13	4.21 ±0.28	4.29 ±0.25	4.23 ±0.11	4.13 ±0.34
Енергетичний потенціал	0.621 ±0.007	0.394 ±0.011 *	0.388 ±0.012 *	0.355 ±0.007 */**	0.449 ±0.010 */**	0.375 ±0.015 *

Введення за цих умов аміногуанідину достовірно збільшує концентрацію АТФ – на 13.2% ($p < 0,01$) – до 1.37 ± 0.04 мкмоль/г. Енергетичний потенціал за цих умов збільшується – на 14.0% ($p < 0,01$) – до 0.449 ± 0.010 . Концентрація АМФ - зменшується - на 15.1% ($p < 0,01$) – до 1.8 ± 0.05 мкмоль/г, що також свідчить про посилення ресинтезу макроергів за умов пригнічення iNOS. Тобто, саме з функціонуванням iNOS пов'язано пригнічення утворення макроергів та зниження енергетичного потенціалу, що вказує на синергічну дію NO, який утворюється у нітрат- та нітритредуктазних реакціях та завдяки активності iNOS.

Введення L-NAME достовірно не позначається на концентрації аденіннуклеотидів та величині енергетичного потенціалу у тканинах ясен, що, вочевидь, пов'язано з урівноважуванням спрямованих протилежно ефектів конститутивних та індукційної NOS.

Введення L-аргініну істотно не позначається на концентрації аденіннуклеотидів та енергетичному по-

тенціалі у тканинах ясен за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію.

Примітно, що за умов продукції великої кількості NO порушення вироблення навіть порівняно незначних концентрацій оксиду азоту конститутивними NOS може мати принципове патогенетичне значення. Передбачається існування механізму, при реалізації якого клітини "розпізнають" не тільки молекулярну будову, але й походження NO – будь то продукт нітритредуктазних реакцій або певних NO-синтаз (індуцибельної або конститутивних).

Висновки

1. Хронічна інтоксикація нітратом натрію супроводжується істотними змінами окиснювальних процесів у тканинах ясен білих щурів, що виявляється у збільшення продукції супероксидного аніон-радикала мітохондріальним і мікросомальним електронно-транспортними ланцюгами, декомпенсованій активації пероксидного окиснення ліпідів на тлі зниження

антиоксидантного потенціалу та активності каталази, зниженні енергетичного потенціалу.

2. Функціональний стан різних ізоформ NOS істотно впливає на стан вільно радикального окиснення у тканинах ясен білих щурів за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію. Функціональна активність iNOS за цих умов сприяє додатковому утворенню супероксидного аніон-радикала мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом, активації пероксидного окиснення ліпідів, обмеженню антиоксидантного потенціалу, порушує процес утворення АТФ, знижує енергетичний потенціал. З функціонуванням pNOS пов'язана протективна дія NO на тканини ясен за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію, що виявляється у обмеженні продукції супероксиду та інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів, підвищенні енергетичного потенціалу.

3. Введення L-аргініну на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію обмежує у клітинах ясен щурів вироблення супероксидного аніон-радикала мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом та інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів, збільшує антиоксидантний потенціал, але не впливає на активність каталази та енергетичний потенціал.

Література

1. Годованець О.І. Особливості клінічного перебігу хронічного катарального гінгівіту в дітей, що проживають на території з підвищеним рівнем нітратів у питній воді / Годованець О.І., Рожко М.М., Попович З.Б. // Галицький лікарський вісник. - 2007. - №3. - С.15-17.
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. Костенко В.О. Механізми порушення окисних процесів у тканинах при надлишковому утворенні оксиду азоту з екогенних 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.
4. 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.
5. 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.
6. Чайковська І.В. Роль порушень метаболізму оксид азоту в патогенезі хронічного генералізованого пародонтиту / І.В. Чайковська // Арх. клініч. та експерим. мед. - 2008. - Т. 17, № 2. - С. 226-228.
7. Черниченко І.О. Експериментальне вивчення кількісних параметрів синтезу канцерогенних N-нітрозамінів із їх хімічних попередників / І.О. Черниченко, Л.С. Соверткова, Н.В. Баленко, О.Є. Кондратенко // Гігієна населених місць : зб. наук. праць. Вип. 45. - К., 2005.-С.169-174.
8. Kim Y.S. Superoxide reactivates nitric oxide-inhibited catalase / Y.S. Kim, S. Han // Biol. Chem. - 2000. - V.381, №12. - P.1269-1271.
9. Laude K. NO produced by endothelial NO synthase is a mediator of delayed preconditioning-induced endothelial protection / K. Laude, J. Favre, C. Thuillel [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. - 2003. - V.284, №6. - P. H2053-H2060.
10. Molina-y-Vedia L. Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation / L. Molina-y-Vedia, B. McDonald, B. Reep [et al.] // J. Biol. Chem. - 1992. - V.267, №35. - P.24929-24932.
11. 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.
12. 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.
13. 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.

Summary

NO-DEPENDENT CHANGES IN OXIDATIVE METABOLISM OF WHITE RATS' GUMS UNDER CHRONIC SODIUM NITRATE INTOXICATION

A.N. Fartushnaya, V.A. Kostenko

Key words: chronic sodium nitrate intoxication, NO-synthases, L-arginine, oxidative metabolism, gums.

60 white rats were used to study the state of oxidative metabolism in gingival tissues under the chronic sodium nitrate intoxication, as well as under the changes of functional status of NO-synthases (NOS). It has been discovered that the functional activity of inducible NOS promotes the formation of additional superoxide by mitochondrial electron transport chain, the activation of lipid peroxidation (LP), and reduces energy potential. Functional activity of neuronal NOS has protective effects on gingival tissues. The introduction of NOS L-arginine substrate under the chronic sodium nitrate intoxication limits superoxide production by mitochondria and LP intensity, antioxidant potential increase, however, it does not affect the activity of catalase and energy potential.

Higher State Educational Establishment of Ukraine „Ukrainian Medical Stomatological Academy“

Матеріал надійшов до редакції 07.06.2012 р.