

УДК 616. 316:615. 916'175

Д. С. Аветіков, В. Д. Ахмеров, В. В. Бондаренко,  
С. І. Данильченко, Ву В'ет Куонг

**ЗМІНИ АКТИВНОСТІ  $\alpha$ -АМІЛАЗИ В ТКАНИНАХ СЛИННИХ  
ЗАЛОЗ НА ФОНІ ХРОНІЧНОЇ НІТРАТНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ**

**Вищий державний навчальний заклад України**

**«Українська медична стоматологічна академія» (м. Полтава)**

Дана робота є фрагментом НДР кафедри хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії з пластичною та реконструктивною хірургією голови та шиї «Вроджені та набуті морфофункціональні порушення зубощелепної системи, органів і тканин голови та шиї, їх діагностика, хірургічне та консервативне лікування», № держ. реєстрації 0111U006301.

**Вступ.** Життя біологічних організмів, зокрема, і людини неможливе без нітратів. Оксид азоту є важливим біорегулятором [1,8], про те утворення надлишкової кількості даної сполуки може обумовлювати негативні зміни в організмі людини та теплокровних тварин, які пов'язані з вільно радикальними властивостями його молекули, що має неспарений спин електрону, завдяки чому має високу реакційну властивість. При взаємодії з іншими вільними радикалами оксид азоту утворює ковалентні зв'язки [8].

Нітрати в організм людини надходять як екзогенним так і утворюються ендогенним шляхами [2,9]. При екзогенному надходженні нітратів в організм людини, вони надходять головним чином з двох джерел: з овочами, картоплею [4]. Нітрати дуже широко застосовуються в вигляді харчових добавок, в якості консервуючих речовин для зберігання м'ясних виробів [7], з молоком та молокопродуктами [5], з лікарськими препаратами. Нітрати та нітроти широко застосовуються в якості лікарських речовин в кардіології як вазоділататори, діючі на гладком'язові клітини вен та артерій [5]. Вони розширюють периферичні судини [7], в зв'язку з чим збільшується прилив крові до серцевого м'яза, тим самим покращують транспорт кисню [4].

Оксид азоту по своїй хімічній природі відноситься до двоатомних нейтральних молекул, малі розміри та відсутність заряду дає цій молекулі можливість проникати через мембрани клітин та субклітинних структур. Коефіцієнт дифузії для молекули оксиду азоту приблизно в 1,4 рази вищий ніж в кисню при  $t=37^{\circ}\text{C}$  [8]. Висока реакційна властивість оксиду азоту проникнення їх через мембрани клітин і субклітинних структур призводить до порушення окисно-відновних перетворень, тим самим утворюючи азотовмісні сполуки. При таких взаємодіях він вільно проникає в клітини, тим самим порушуючи функцію органу і його систем, які регулюють обмінні процеси в ньому [4].

Особливо токсично на клітини впливають метаболіти оксиду азоту, солі азотної та азотистої кислот [8], N-нітрозосполуки [2], органічні нітрати [3]. Злив солей азотної кислоти на функцію слинних залоз вивчені недостатньо, що і спонукало авторів на проведення даного дослідження.

**Метою дослідження** було встановити вплив нітратів та нітритів на функцію слинних залоз особливо на активність ферменту  $\alpha$ -амілази на фоні хронічної нітратної інтоксикації.

**Об'єкт і методи дослідження.** Експеримент проводився на 85 білих щурах лінії Вістар вагою 160-250 гр в 10 серіях досліду. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

1 група – інтактні тварини (контроль), 2 група – дослідна (після отруєння протягом 14-ти діб, 30-ти діб 60-ти діб, 90-а діб). Хронічну нітратну інтоксикацію відтворювали шляхом введення в шлунок нітрата натрія спеціальним зондом. Тканинну навіску (слинні залози) гомогенізували з буфером 1:10, потім центрифугували 10 хв. при 3000 об/хв. Готували суміш на 10 проб: 5 ml крохмалю + 3 ml буферу. В дослідні пробірки набирали 0,8 ml

субстратної суміші та 0,1 ml центрифугату слинних залоз. Інкубували в термостаті при  $t=37^{\circ}\text{C}$  протягом 30 хв., потім додавали 2,6 ml HCl до інкубації. Потім з кожної пробірки брали по 0,7 ml гомогенату, переносили в мірну колбу по 50 ml, додавали 0,1 ml розчину йоду, доводили водою до 50 ml. Фотометрували проти води при 690 нм. Розрахунки проводили за допомогою формули:  $(E_{\text{к}} - E_{\text{д}}) \times 20 = \text{мг крохмалю} / 1 \text{ год} / 50 \text{ мг тканин}$ . Екстинція досліду – 20, коефіцієнт якого враховує розведення та перерахунок на 1 год [6]. Оскільки  $\alpha$ -амілаза гідролізує крохмаль, який утворює синьо-фіолетову сполуку з йодом, то по зниженню оптичної густини за стандартним графіком визначали активність ферменту. Крохмаль готували на кожну серію досліду щоденно, 260 мг крохмалю суспендували в 1 ml холодної дистилірованої води, додавали 6 ml кип'ячої води, гріли на водяній бані до розчинення та доводили розчин до 10 ml (2% - розчин крохмалю). Буферний розчин рН = 7,2; 0,1 ml фосфатного натрію, двозмінного та однозамінного калію, 3% розчин хлориду натрію. Нормальний розчин HCl. Розчин йоду 0,1 % (на 1л 30 гр K1 та 12,7 гр йод-2) [6].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Після 14-добового введення тваринам нітрату натрію відмічалась незмінність активності  $\alpha$ -амілази відповідно до інтактних тварин. При більш довготривалому надходженні нітрату натрію в організм тварин відмічалось достовірне зниження активності  $\alpha$ -амілази: після 60,90-добового отруєння на 14,5%, 17,7%. Всі зміни в тканинах слинних залоз відображені в таблиці.

Показники дослідження	Статистичні показники	Інтактні тварини	Інтоксикація нітратом натрію			
			14 діб	30 діб	60 діб	90 діб
$\alpha$ -амілаза од. акт.	$M \pm m$ $P_1$	$1,24 \pm 0,06$	$1,21 \pm 0,06$	$1,17 \pm 0,06$	$1,06 \pm 0,05$	$1,02 \pm 0,05$

**Примітка:**  $P_1$  – імовірна вірогідність помилки при порівнянні одержаних результатів з даними контрольної серії (інтактними тваринами).

Можна припустити, що зниження функціональної активності  $\alpha$ -амілази в тканинах слинних залоз на фоні хронічної нітратної інтоксикації розвивається вторинно. Первинно розвивається гемічна гіпоксія за рахунок накопичення метгемоглобіна в крові після 30, 60, 90-добового отруєння, на фоні якої

вторинно розвивається тканинна гіпоксія, яка впливає на порушення синтезу АТФ та зниження енергетичного потенціалу, біоенергетичних процесів в тканинах слинних залоз. Після проведення дослідження нами зроблено припущення, що утворення  $\alpha$ -амілази в слинних залозах щурів – процес енергозалежний. А так як слинні залози – це орган подвійної функції, вони є не тільки екскреторним органом, а й ендокринним [1]. В тканинах нітрати біотрансформуються в кінцевий продукт – оксид азоту (NO), де вони накопичуються в вигляді динітрозильних комплексів заліза [3]. Такі накопичення порушують ферментативну активність системи циклу Кребса та функцію залізовмісних макромолекул-носіїв електронів в дихальному ланцюгу, порушення функції яких знижує енергетичні процеси в клітинах [5]. На фоні цього відбувається інгібування гліцераальдегід-фосфатдегідрогенази після чого відбувається нітрозолірування толових груп ферменту, що обмежує здібність компенсувати біоенергетичну недостатність в тканинах [7]. Крім субстратної форми дисиміляції гіпоергозу, на фоні хронічної нітратної інтоксикації розвивається і ферментативний його варіант. Особливо порушується функція ферментів які містять в своїх активних центрах іони міді та заліза, це ферменти дихального ланцюга цитохроми, та антиоксидантного захисту [8]. Такі ферменти активують енергетичний метаболізм в тканинах органу, та захищають клітини від вільних радикалів [5]. Всі ці порушення призводять до розвитку тканинної гіпоксії, на фоні якої відбувається зниження функції слинних залоз, про це свідчить зниження утворення  $\alpha$ -амілази, і її активності при різних термінах отруєння тварин (табл.).

**Висновок.** Оксид азоту який при надходженні в організм перетворюється в більш реактивні сполуки – нітрити, які накопичуються в тканинах слинних залоз в вигляді динітрозильних комплексів заліза, призводять до гіпоергозу в тканинах, що блокує в першу чергу донатори та акцептори в тканинах, які містять в активних центрах іони міді та заліза. Всі ці процеси призводять до розвитку тканинної гіпоксії, зростання вільнорадикального окиснення, порушення активності в мітохондріях клітин. На фоні цього

відбувається зниження енергозалежних процесів. А так як процес утворення а-амілази в тканинах слинних залоз – енергозалежний процес, такі накопичення призводять до зниження утворення з-амілази.

**Перспективи подальших досліджень.** В подальшому планується на основі отриманих результатів змін активності а-амілази в тканинах слинних залоз впровадити в практичну медицину методи лікування хронічних нітратних інтоксикацій, в тому числі і в щелепно-лицевому відділенні при лікуванні хронічних захворювань слинних залоз.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Аветіков Д. С. Тензіометричні характеристики нижньо-щелепної кістки щурів при моделюванні її перелому за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / Д. С. Аветіков, К. П. Локес // Актуальні проблеми сучасної медицини, Вісник Української медичної стоматологічної академії. - 2013 -Т. 13, №2. - С. 177-179.

2. Беспалова Н. А. Влияние подслизистого введения перфторана на процессы перекисного окисления липидов и активность антиоксидантной системы жидкости в полости рта у больных хроническим генерализованным пародонтитом / Н. А. Беспалова, К. Н. Конторщикова, А. В. Воробьёва // Стоматология. - 2010 - Т. 89, №2. - С. 22 - 25.

3. Горідько Т. М. Вплив N-стеароїлетаноламіну на активність ензимів антиоксидантного захисту та вміст стабільних метаболітів NO в гонадах та плазмі крові щурів із початковими стадіями стрептозотоциніндукованого цукрового діабету / Т. М. Горідько [та ін.] // Український біохімічний журнал. - 2012 . - Т. 84, №3. - С. 37 – 43.

4. Дзугкоев С. Т. Влияние эндогенных регуляторов эндотелиальной NO-синтазы на гомеостаз оксида азота и липопротеины сыворотки крови при экспериментальном сахарном диабете / С. Т. Дзугкоев, В. А. Метельская, Ф. С. Дзугкоева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2013 - Т. 156, №8. - С. 171 – 174.

5. Лазарева З. О. Механізми порушення мітохондріального дихання і окислювального фосфорилування в головному мозку білих щурів у ранньому і відновлювальному періодах гострої інтоксикації нітратом натрію / З. О. Лазарева // Актуальні питання морфогенезу. - 1996 - С. 166.

6. Леонтьев В. К. Биохимические методы исследования в клинической и экспериментальной стоматологии / В. К. Леонтьев, Ю. А. Петрович. - Омск, 1976. - 94с.

7. Титов В. Ю. Может ли суммарное содержание нитрита и нитрата служить показателем интенсивности синтеза оксида азота (NO) в тканях организма / В. Ю. Титов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2012 - Т. 153, №6. - С. 816 – 819.

8. Костенко В. О. Роль слинних залоз у механізмах ауторегуляції рівня оксиду азоту в організмі ссавців та їх порушень / В. О. Костенко [та ін.] // Актуальні проблеми сучасної медицини. Вісник Української медичної стоматологічної академії. - 2013 - Т. 1.3, №2. - С. 10-14.

9. Нетюхайло Л. Г. Кореляційний взаємозв'язок між клітинними реакціями ушкодженої шкіри і периферійної крові при експериментальній опіковій хворобі / Л. Г. Нетюхайло, С. В. Харченко // Вісник проблем біології і медицини. - 2011. - №1 - С. 127 – 131.

УДК 616.316:615.916'175

## **ЗМІНИ АКТИВНОСТІ $\alpha$ -АМІЛАЗИ В ТКАНИНАХ СЛИННИХ ЗАЛОЗ НА ФОНІ ХРОНІЧНОЇ НІТРАТНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ**

**Аветіков Д. С., Ахмеров В. Д., Бондаренко В. В., Данильченко С. І.,  
Vu В'ет Куонг**

**Резюме.** Метою дослідження було вивчення впливу нітритів на активність  $\alpha$ -амілази в тканинах слинних залоз на фоні хронічної нітратної інтоксикації, що свідчить про зниження енергозалежних процесів в тканинах слинних залоз, цим підтверджує що утворення  $\alpha$ -амілази є енергозалежний процес в слинних залозах. Оксид азоту який при надходженні в організм

перетворюється в більш реактивні сполуки нітриту, які накопичуються в тканих слинних залоз в вигляді динітрозильних комплексів заліза, призводять до гіпоергозу в тканинах, що блокує в першу чергу донатори та акцептори в тканинах, які містять в активних центрах іони міді та заліза. Всі ці процеси призводять до розвитку тканинної гіпоксії, зростання вільнорадикального окиснення, порушення активності в мітохондріях клітин. На фоні цього відбувається зниження енергозалежних процесів.

**Ключові слова:** слинні залози, а-амілаза, нітрати, нітриту, нітратна інтоксикація.

УДК 616.316:615.916'175

## **ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ а-АМИЛАЗЫ В ТКАНЯХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ НИТРАТНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ**

**Аветиков Д. С., Ахмеров В. Д., Бондаренко В. В., Данильченко С. И.,  
Ву Вьет Куонг**

**Резюме.** Целью исследования было изучение влияния нитритов на активность а-амилазы в тканях слюнных желез на фоне хронической нитратной интоксикации. Это свидетельствует о снижении энергозависимых процессов в тканях слюнных желез. Этим подтверждается тот факт, что образование а-амилазы – это энергозависимый процесс. Оксид азота, который при поступлении в организм превращается в более реактивные соединения – нитриты, которые накапливаются в ткани слюнных желез в виде динитрозильных комплексов железа. Эти соединения приводят к гипоергозу в тканях, что блокирует в первую очередь донаторы и акцепторы в тканях, которые содержат в активных центрах ионы меди и железа. Все эти процессы приводят к развитию тканевой гипоксии, росту свободно-радикального окисления, нарушению активности в митохондриях клеток. На фоне этого происходит снижение энергозависимых процессов.

**Ключевые слова:** слюнные железы,  $\alpha$ -амилаза, нитраты, нитриты, нитратная интоксикация.

UDC 616.316:615.916'175

## **CHANGES IN $\alpha$ -AMYLASE ACTIVITY IN THE TISSUES OF SALIVARY GLANDS ON A BACKGROUND OF CHRONIC NITRATE INTOXICATION**

**Avetikov D. S., Akhmerov V. D., Bondarenko V. V., Danylchetsko S. 3.,  
Vu Viet Cuong**

**Abstract.** *The purpose of the research was to define the impact of nitrates and nitrites on the function of salivary glands, especially on the activity of the  $\alpha$ -amylase enzyme on a background of chronic nitrate intoxication.*

*Object and methods of research.* The experiment was conducted on 85 Wistar white rats, weighing 160-250 g, involved in 10 series of experiment.

*The results of research and their discussion.* After 14-day introduction of sodium nitrate to rodents, no activity of  $\alpha$ -amylase, regarding intake rodents, has been observed, With more long-term intake of sodium nitrate in the organism of rodents, a significant decrease in activity of  $\alpha$ -amylase has been detected: after 60, 90-daily poisoning by 14,5%, 17.7%, respectively.

It can be assumed that the reduction in the functional activity of  $\alpha$ -amylase in the tissues of salivary glands on the background of chronic nitrate intoxication develops secondarily. Hemic hypoxia develops primarily due to accumulation of methemoglobin in blood after 30, 60, 90-day intoxication against which the tissue hypoxia develops secondarily, affecting the ATP synthesis and reducing the energy potential, bioenergy processes in tissues of salivary glands. The study found that the formation of  $\alpha$ -amylase in the salivary glands of rats is the volatile process. And since the salivary glands are the organ with double function, they are not only the excretory organ, but also the endocrine one. In the tissues, nitrates undergo biotransformation into final product of nitric oxide (NO), where it accumulates in the form of dinitrozed complexes of iron. Such accumulations affect enzymatic



activity of Krebs' cycle system and function of ferruginous macromolecules, which are carriers of electrons in respiratory chain, dysfunction of which reduce energy processes in cells. This is associated with inhibition of glyceraldehydes 3-phosphatdehydrogenase, resulted in nitrosolation of tolite groups of enzyme, which limits the ability to compensate broenergy insufficiency in tissues. In addition to the substrate form of hypoergasia dissimilation on the background of chronic nitrate intoxication an enzymatic alternative is developing too. Function of enzymes, containing in their active centers ions of copper and iron, is especially disturbed. These are enzymes of cytochrome's respiratory chain, and antioxidant protection. Such enzymes activate the energy metabolism in the tissues of the body and protect cells from free radicals. All of these dysfunctions lead to the development of tissue hypoxia, on the background of which a depression of function of salivary glands is observed; this is evident by reducing of a-amylase formation and its activity under different terms of rodents' poisoning.

*Conclusions.* Nitric oxide, when getting into organism turns into more reactive compounds, i. e., nitrites, which are accumulated in the tissues of the salivary glands in the form of dinitroziled complexes of iron, lead to hypoergasia in the tissues that blocks primarily donors and acceptors in the tissues, containing ions of copper and iron in their active centers. All of these processes lead to the development of tissue hypoxia, the growth of free radical oxidation, abnormal activity in cells' mitochondria, resulted in depressing of volatile processes. Since the process of a-amylase formation in the tissues of the salivary glands is the volatile processes, such accumulations lead to decrease  $j:1$  и amylase formation.

**Key words:** salivary glands, a-amylase, nitrate, nitrite, nitrate intoxication.