

УДК 616.15: 615.916.175/16

*О.Е.Акимов*¹, И.А.Ковалёва¹, В.А.Костенко¹*¹Украинская медицинская стоматологическая академия

г. Полтава, Украина

ВЛИЯНИЕ ЭНТЕРОСОРБЕНТОВ НА МЕТАБОЛИЗМ АРГИНИНА И ПРОЦЕССЫ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ СОЧЕТАННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НИТРАТОМ И ФТОРИДОМ НАТРИЯ

АННОТАЦИЯ

В статье рассмотрено влияние сорбентов разных классов на метаболизм L-аргинина, процессы пероксидного окисления липидов (ПОЛ), состояние антиоксидантных систем (АО) в крови крыс в условиях сочетанной хронической интоксикации нитратом и фторидом натрия. В качестве энтеросорбентов использованы: суспензия нанодисперсного кремнезёма, суспензия лигнина гидролизного, активированный уголь (карболайн). Опыт проведён на 62 белых крысах линии Wistar в течение 30 дней. Хроническая сочетанная интоксикация воспроизводилась путём введения в желудок раствора, содержащего нитрат натрия и фторид натрия из расчёта 500 и 10 мг/кг соответственно. Метаболизм L-аргинина оценивали путём определения общей активности NO-синтаз и общей активности аргиназ. Процессы ПОЛ оценивались по спектрофотометрическому определению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой и их приростом после 1,5-часовой инкубации в железо-аскорбатном, прооксидантном буферном растворе. Состояние ферментативных АО систем оценивали путём определения активности супероксиддисмутазы и каталазного числа. Установлено, что суспензия нанодисперсного кремнезёма наиболее эффективно восстанавливает работу АО систем и снижает показатели ПОЛ. Влияние изученных сорбентов на метаболизм L-аргинина позволяет предположить различную способность к сорбции фторид-ионов и нитрат-ионов.

Ключевые слова: NO-синтаза, аргиназа, нитрат натрия, фторид натрия, нанодисперсный кремнезём, лигнин гидролизный.

Проблема накопления нитратов органического и неорганического происхождения в грунтах, подземных и поверхностных водах Евразии становится всё более актуальной в связи с развитием аграрной химии, поскольку нитраты применяются как питательный материал, увеличивающий скорость роста растений. Употребляя в пищу растения с повышенным содержанием нитратов, человек подвергается хронической нитратной интоксикации. Проблема избыточного содержания фтора в грунтах и питьевой воде, хотя и носит, как правило, эндемический характер, всё же является распространённым явлением на территории Евразии [1, 2]. Наличие эндемического очага с повышенным содержанием фтора в питьевой воде, развитый аграрный комплекс, использующий интенсивные технологии, создают условия, при которых возможно влияние на организм человека двух негативных факторов: нитратной и фторидной интоксикации.

Система крови является интегральным показателем состояния организма. Несмотря на то, что изменения в отдельных органах и системах могут быть более или менее выражены, оценка состояния системы крови позволяет сделать прогноз для организма в целом. Ионы фтора могут угнетать анаэробный гликолиз в эритроцитах. Это способствует снижению их осмотической резистентности, что приводит к их гемолизу. Также нами была установлена тенденция к угнетению активности сывороточной аргиназы и усилению общей активности NO-синтаз (NOS, EC 1.14.13.39) [3]. В литературе много упоминаний об угнетающем действии ионов фтора на антиоксидантные (АО) системы организма и усиление под воздействием фторидов генерации свободных радикалов [4]. Нитрат-ионы способствуют образованию нитрозильных комплексов с гемовым железом, превращая нормальный гемоглобин в метгемоглобин. По данным литературы, нитраты усиливают генерацию

свободных радикалов и снижают активность АО системы [5]. Установлено, что нитрат натрия в дозе 500 мг/кг угнетает активность сывороточной аргиназы, однако сочетанное введение нитратов и фторидов не оказывает статистически значимого влияния на активность аргиназы крови [3]. Поскольку в некоторых регионах Евразии возможно одновременное влияние двух патогенных факторов, возникает необходимость в коррекции изменений, вызываемых одновременным поступлением в организм нитратов и фторидов в избыточных количествах. Эффективным методом коррекции изменений метаболизма при сочетанной интоксикации может стать энтеросорбция.

Цель исследования – проведение сравнительного анализа эффективности коррекции изменений, вызванных сочетанной нитратной и фторидной интоксикацией, в метаболизме L-аргинина, в функциональном состоянии АО систем, показателях перексидного окисления липидов (ПОЛ) сорбентами разной химической структуры.

Материалы и методы. Эксперимент проведён на 62 белых крысах линии Wistar. Животные были разделены на 5 групп:

– I группа (10 крыс) – интактные животные, содержащиеся в стандартных условиях вивария;

– II группа (15 крыс) – животные с сочетанной интоксикацией;

– III группа (12 крыс) – введение сорбента на основе активированного угля («Карболайн»);

– IV группа (15 крыс) – введение сорбента, полученного из древесины лиственницы (лигнин гидролизный);

– V группа (10 крыс) – введение суспензии нанодисперсного кремнезёма.

Хроническую сочетанную нитратно-фторидную интоксикацию воспроизводили путём введения через желудочный зонд 1 мл раствора, содержащего нитрат натрия, из расчёта 500 мг/кг, фторид натрия – 10 мг/кг. Материал на основе активированного угля – в виде суспензии полиэтиленоксида-400 (ПЭО-400) из расчёта 500 мг/кг. Лигнин гидролизный вводился – в виде суспензии на ПЭО-400 в дозе 500 мг/кг. Суспензию нанодисперсного кремнезёма на ПЭО-400 вводили из расчёта 100 мг/кг. Все манипуляции проводили согласно «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и других научных целей». Вывод животных из эксперимента осуществлялся путём забора крови из правого предсердия под тиопенталовым наркозом. Кровь в даль-

Таблица 1

Влияние энтеросорбентов на метаболизм L-аргинина, АО защиту и показатели ПОЛ.

Биохимический анализ	Интактная группа, n=10	Сочетанная интоксикация, n=15	Сорбент на основе активированного угля, n=12	Лигнин гидролизный, n=15	Суспензия нанодисперсного кремнезёма, n=10
Активность NO-синтазы, мккат	193,75 ± 33,3	104,19 ± 14,12*	94,72 ± 3,67	225,61 ± 3,3**/****	279 ± 8,21**/****/#
Активность аргиназы, мккат	27,35 ± 5,40	21,94 ± 3,49	36,01 ± 0,87**	7,53 ± 0,41**/****	14,44 ± 0,69**/****/#
Содержание нитритов, нмоль	3,91 ± 0,47	36,69 ± 0,96*	30,20 ± 0,79**	19,81 ± 1,0**/****	20,53 ± 2,59**/****
Активность SOD, у.е.	1,35 ± 0,08	1,49 ± 0,07	1,33 ± 0,13	1,86 ± 0,15**/****	1,73 ± 0,09**/****
Каталазное число	4,79 ± 0,04	4,30 ± 0,05*	4,53 ± 0,07**	4,15 ± 0,11	4,72 ± 0,19**/#
Содержание ТБК-реактантов, мкмоль					
• до инкубации	62,26 ± 0,73	86,55 ± 0,81*	72,12 ± 1,13**	73,69 ± 1,13**	60,56 ± 1,07**/****/#
• после инкубации	70,2 ± 0,59	100,24 ± 0,94*	83,22 ± 1,11**	84,76 ± 1,15**	70,32 ± 1,08**/****/#
• прирост	7,93 ± 0,39	13,7 ± 0,13*	11,1 ± 0,16**	11,06 ± 0,12**	9,76 ± 0,14**/****/#

* – p<0,05 относительно интактной группы

** – p<0,05 относительно сочетанной интоксикации

*** – p<0,05 относительно сорбента на основе активированного угля

– p<0,05 относительно лигнина гидролизного

нейшем использовалась для биохимических исследований.

Общую активность NOS оценивали по приросту нитритов (NO_2^-) после инкубации в 2,5 мл трис-буферного раствора (рН=7,4) молярностью 0,1 М, который содержал 0,1 мл 1 мМ водного раствора НАДФН и субстрат NOS 0,3 мл 320 мМ водного раствора L-аргинина. Инкубация длилась 30 мин. [3]. Содержание нитритов определяли спектрофотометрическим методом по образованию азокрасителей в реакции NO_2^- с реактивом Грисса [3].

Активность сывороточной аргиназы определяли по приросту содержания L-орнитина после 20-часовой инкубации в 0,5 мл фосфатного буферного раствора (рН=7,0) молярностью 0,1 М, который содержит субстрат аргиназы – 0,2 24 мМ водный раствор L-аргинина. Концентрацию L-орнитина определяли по нингидриновой реакции в кислой среде (рН=1,0) [3].

Показатели ПОЛ оценивали исходя из количества веществ, прореагировавших с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактантов) [6] и их приростом после инкубации в железо-аскорбатном буферном растворе, для оценки состояния неферментативных АО. Определение активности супероксиддисмутазы (SOD, Е.С.1.15.1.1.) проводили по определению ингибирования аутоокиснения адреналина в щелочной среде [7], каталазы (CAT, Е.С.1.11.1.6.) – по убыванию содержания перекиси водорода в присутствии пробы [8]. Спектрофотометрические исследования выполнялись на фотоэлектрокалориметре «PM-2111 Solar» (Беларусь).

Полученные результаты подвергались статистической обработке при помощи программы Microsoft Excel из набора программ Microsoft Office, а именно расширения Microsoft Excel – Real Statistics 2007. Данные, распределение которых было нормальным (гауссовым), подвергались параметрическому дисперсионному анализу (ANOVA) с последующими парными сравнениями с помощью t-критерия Стьюдента. При распределении, отличном от нормального, использовался непараметрический метод анализа по методу Крускала – Уолиса, с последующим сравнением по Манну – Уитни. В обоих случаях во избежание ложно-положительных результатов при множественном сравнении использовалась поправка по методу Бонферонни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение: Сочетанная интоксикация уменьшает активность NOS на 46,22 % и статистически значимо не изменяет активность аргиназы. Сорбент на основе активированного угля не влияет на активность NOS, однако повышает активность аргиназы на 64,13 %. Применение лигнина гидролизного в качестве энтеросорбента при сочетанной интоксикации снижает активность аргиназы на 65,68 %. При этом активность NOS увеличивается на 116,5 %. Суспензия нанодисперсного кремнезёма повышает активность NOS на 167,8 % относительно сочетанной интоксикации, активность аргиназы снижается на 34,18 %. При сравнении энтеросорбентов установлено, что суспензия нанодисперсного кремнезёма увеличивает активность NOS относительно сорбента на основе активированного угля на 194,6 %, а относительно лигнина гидролизного на 23,66 %. Активность аргиназы снижается при сравнении с сорбентом на основе активированного угля на 59,9 %, но повышается при сравнении с лигнином гидролизным на 91,76 %. Данные различия могут быть связаны с различной способностью энтеросорбентов поглощать фториды и нитраты.

Способность поглощать экзогенные нитраты можно оценить по уровню нитритов в сыворотке крови. Нитриты образуются из экзогенных нитратов путём редукции в нитрат-редуктазной системе организма. Важно учесть, что нитриты являются опасными для организма веществами, так как способны участвовать в реакциях нитрозилирования белковых молекул. Сочетанная интоксикация увеличивает содержание нитритов в 9 раз относительно интактных животных. Сорбент на основе активированного угля снижает количество нитритов на 17,68 %, лигнин гидролизный – на 46 %, суспензия нанодисперсного кремнезёма – на 44 %. Суспензия нанодисперсного кремнезёма снижает количество нитритов относительно сорбента на основе активированного угля на 32 % и не показывает статистически значимых различий относительно лигнина гидролизного. Лигнин гидролизный снижает содержание нитритов относительно сорбента на основе активированного угля на 34,4 %. Таким образом, суспензия нанодисперсного кремнезёма эффективнее поглощает нитраты по сравнению с сорбентом на основе активированного угля и не уступает в этом отношении лигнину гидролизному.

Оценить способность к сорбции фторидов косвенным путём можно, проанализировав изменения в активности аргиназы. Фтор, по данным литературы, считается классическим ингибитором аргиназного пути метаболизма L-аргинина. Наши предыдущие исследования подтверждают этот факт, однако в условиях сочетанной интоксикации ингибирующий эффект фторидов компенсируется торможением активности NOS [3]. В группе животных, которым вводили сорбент на основе активированного угля, отмечена наивысшая активность аргиназ вместе с наибольшим содержанием нитритов. Поскольку активность аргиназ растёт, а активность NOS статистически значимо не изменяется, можно сделать вывод, что увеличение активности аргиназ связано с уменьшением ингибирующего влияния фторид-ионов. В группе лигнина гидролизного активность аргиназ наименьшая на фоне увеличенной активности NOS. Снижение активности аргиназ может быть связано с ингибирующим эффектом фторидов и конкурентным субстратным ингибированием NOS. Однако в группе нанодисперсного кремнезёма активность NOS и аргиназы увеличена, относительно группы лигнина гидролизного, что позволяет сделать вывод, что в уменьшении активности аргиназы более значимую роль играют ионы фтора, чем субстратная ингибиция.

Сочетанная нитратно-фторидная интоксикация не влияет на активность SOD и снижает каталазное число на 10,23 % относительно интактных животных. Сорбент на основе активированного угля не влияет на активность SOD, но увеличивает каталазное число на 5 % при сравнении с сочетанной интоксикацией. Лигнин гидролизный увеличивает активность SOD на 24,8 %, не влияя на каталазное число. Суспензия нанодисперсного кремнезёма повышает активность SOD на 16,1 %, каталазное число – на 9,7 %. Однако по сравнению с сорбентом на основе активированного угля статистически значимого различия в каталазном числе не обнаружено, активность SOD относительно группы лигнина гидролизного также статистически значимо не изменяется.

В группе животных, которым вводили нитрат натрия и фторид натрия в течение 30 дней, наблюдалось повышение содержания ТБК-реактантов до инкубации на 39 %, относительно интактной группы. Прирост ТБК-реактантов увеличился на 21,79 %. Сорбент на основе активированного угля снижал содержание ТБК-реактантов до инкубации на 16,67 %, прирост – на 19 % при сравнении с сочетанной интоксикацией. Лигнин гидролизный показал схожую динамику. Содержание ТБК-реактантов до инкубации снизилось на 14,85 %, прирост – на 19,27 %. При сравнении этих сорбентов статистически значимых различий обнаружено не было. Суспензия нанодисперсного кремнезёма снизила содержание ТБК-реактантов до инкубации на 30 %, прирост – на 28,75 %. При сравнении суспензии нанодисперсного кремнезёма с двумя другими сорбентами различия являются статистически значимыми. Таким образом, суспензия нанодисперсного кремнезёма наиболее эффективно снижает показатели ПОЛ по сравнению с сорбентом на основе лигнина и активированного угля. Это объясняется тем, что влияние нанодисперсного кремнезёма влияет на оба звена супероксиддисмутазно-каталазной АО системы, чем уменьшает оксидативную нагрузку на организм.

Выводы. Суспензия нанодисперсного кремнезёма наиболее эффективно снижает показатели ПОЛ при сравнении с сорбентом на основе активированного угля (карболайн) и лигнином гидролизным. Суспензия нанодисперсного кремнезёма позитивно влияет на оба звена супероксиддисмутазно-каталазной системы. Суспензия нанодисперсного кремнезёма более эффективно адсорбирует нитраты, при сравнении с сорбентом на основе активированного угля (карболайн). Адсорбция фторидов суспензией нанодисперсного кремнезёма более выражена, чем у лигнина гидролизного. Таким образом, суспензия нанодисперсного кремнезёма эффективна в коррекции изменений в АО системах организма и снижении показателей ПОЛ, однако нуждается в модификации для более эффективного адсорбирования фторидов.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Жовинский Э.Я., Крюченко Н.О. Прикладное значение геохимии фтора // Пошукова та екологічна геохімія. – 2007. № 1. – С. 3-13.
- 2 Серикбаева А.К., Сатаева Л.М., Азимов А.М. Качество природных вод республики Казахстан // Междунар. науч. ин-т «Educatio». – 2015. – № 2 (9). – С. 21-23.

3 *Акімов О.Є., Ковальова І.О., Костенко В.О.* Функціонування аргіназного та NO-синтазного шляху метаболізму L-аргініну в крові щурів за умов надлишкового надходження нітрату та фториду натрію та застосування суспензії нанодисперсного кремнезему // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2016. – Т. 16, – № 1. – С. 169-173.

4 *Shushua X.* A Role of Fluoride on Free Radical Generation and Oxidative Stress in BV-2 Microglia Cells / X.Shushua, L.Ziyu, Y.Ling [et al] // *Mediators Inflamm.* – 2012. – Vol. 13. – Art. 102954. – P. 1-8.

5 *Bouaziz-Ketata H.* Nitrate-induced Biochemical and Histopathological Changes in the Liver of Rats: Ameliorative Effect of *Hyparrhenia hirta* / H.Bouaziz-Ketata, G.B.Salah, H.B.Salah [et al.] // *Biomed Environ Sci.* – 2014. – Vol. 27(9). – P. 695-706.

6 *Стальная И.Д.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // *Современные методы в биохимии.* – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.

7 *Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / [Л.В.Беркало, О.В.Бобович, Н.О.Боброва та єд.] // під єд. І.П.Кайдашев.* – Полтава: Полімет, 2003. – 96-99 с.

8 *Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / [Л.В.Беркало, О.В.Бобович, Н.О.Боброва та єд.] // під єд. І.П.Кайдашев.* – Полтава: Полімет, 2003. – 89-90 с.

ТҮЙІН

Мақалада нитрат және натрий фторидімен үйлескен созылмалы улану жағдайларында егеуқұйрықтың қанындағы әртүрлі топтағы сорбенттердің L-аргинин зат алмасуына әсер етуі, липидтердің пероксидті тотығу (ЛПТ) процестері, антиоксидант (АО) жүйелерінің жағдайы қарастырылған. Энтеросорбенттер ретінде: кремнезёманың нанодисперсті суспензиясы, гидролиздік лигнин суспензиясы, белсендірілген көмір («Карболайн») қолданылған. Wistar тұқымының 62 ақ егеуқұйрықтарына 30 күн бойы тәжірибе жүргізілген. Үйлескен созылмалы улану 500 мг/кг және оған сәйкес 10 мг/кг есебінен натрий нитраты мен фторидтен тұратын ерітіндіні асқазанға жіберу арқылы жүзеге асырылған. ЛПТ процестері тиобарбитурин қышқылымен әрекеттесетін және олардың темір-аскорбантты, прооксидантты буферлік ерітіндісінде 1,5 сағаттық инкубациядан кейін көбейетін өнімдерді спектрофотометриялық анықтау бойынша бағаланды. Ферментативті АО жүйелерінің жағдайы супероксиддисмутаза және каталазды сандардың белсенділігі бойынша белгіленді. Зерттеу нәтижелерін талдай отырып, кремнезёмнің нанодисперсті суспензиясы АО жүйесінің жұмысын барынша тиімді қалпына келтіретіні және ЛПТ көрсеткіштерін төмендететіні анықталды. Зерттелген сорбенттердің L-аргинин зат алмасуына әсер етуі, фторид-иондар мен нитрат-иондардың сіңірілуі қасиеттерін болжауға мүмкіндік береді.

Түйінді сөздер: NO-синтаз, аргиназ, натрий нитраты, натрийфториді, нанодисперсті кремнезём, гидролиздік лигнин.

SUMMARY

The article considers the influence of different classes of sorbents on the metabolism of L-arginine, the processes of lipid peroxidation (LPO), the state of antioxidant systems (AO) in the blood of rats under chronic combined intoxication by sodium nitrate and sodium fluoride. Suspension of nanosized silica, suspension of hydrolysed lignin and activated carbon («Karbolayn») were used as enterosorbents. The experiment was conducted on 62 white Wistar rats for 30 days. Chronic intoxication reproduced by administration solution into the stomach, containing sodium nitrate and sodium fluoride at the dosage of 500 mg/kg and 10 mg/kg, respectively. Metabolism of L-arginine was evaluated by determining the total activity of NO-synthases and total arginases activity. LPO processes were assessed by spectrophotometric determination of the products that react with thiobarbituric acid, and their increase after the 1.5 hour incubation in the iron-ascorbate, prooxidant buffer. Status of enzymatic AO systems was evaluated by determining the activity of superoxide dismutase and catalase. Analyzing the results of the study, it was found out that the suspension of nanosized silica more effectively restores function of AO systems and reduces lipid peroxidation indicators. Effect of studied sorbents on L-arginine metabolism under chronic combined intoxication by sodium nitrate and sodium fluoride suggests different sorption capacity of mentioned sorbents for fluoride ions, and nitrate ions.

Key words: NO-synthase, arginase, sodium nitrate, sodium fluoride, nanosized silica, hydrolysed lignin.