

УДК [616.15+616.33]-092.18-092.9:615.916'16

ВЛИЯНИЕ ФТОРА НА ПРОДУКЦИЮ ОКСИДА АЗОТА В КРОВИ И СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА КРЫС

Акимов О. Е., Костенко В. А.

Высшее государственное учебное заведение Украины
«Украинская медицинская стоматологическая академия»,

г. Полтава, Украина

INFLUENCE OF FLUORIDE INTOXICATION ON NITRIC OXIDE PRODUCTION IN BLOOD AND GASTRIC MUCOSA OF RATS

Akimov O. Ye., Kostenko V. A.

Higher State educational institution of Ukraine «Ukrainian medical stomatological academy», Poltava, Ukraine

Реферат. В работе рассмотрено влияние хронической фторидной интоксикации на продукцию оксида азота в крови и слизистой оболочке желудка крыс. Установлено, что хроническая фторидная интоксикация увеличивает продукцию оксида азота NOS-опосредованным путём. Активация тканевых нитрит редуктаз в условиях избыточного поступления ионов фтора является адаптивной реакцией, направленной на уменьшение концентрации нитритов в тканях.

Ключевые слова: NO-синтаза, фторид натрия, кровь, слизистая оболочка желудка.

Abstract. Article deals with the effect of chronic fluoride intoxication on the production of nitric oxide in the blood and mucous membrane of the stomach of rats. It was established that chronic fluoride intoxication increases the production of nitric oxide by NOS-mediated pathway. Activation of tissue nitrite reductases in conditions of excess intake of fluoride ions is an adaptive reaction aimed at reducing the concentration of nitrites in tissues.

Key words: NO-synthase, sodium fluoride, blood, gastric mucosa.

Введение. Фтор – один из наиболее активных элементов периодической системы Д.И. Менделеева.

В некоторых регионах Украины отмечается повышенная концентрация фтора в грунтовых и питьевых водах. Особенно высокие концентрации фтора в воде отмечаются в Полтавской, Кировоградской и Днепропетровской областях. В России повышенное содержание фтора наблюдается в Московской области – в г. Одинцово, г. Егорьевске, г. Красногорске; в Пензенской области – в г. Сердобске; в Тверской области и Республике Удмуртия.

Следует отметить, что проживание в регионе с оптимальным или низким содержанием фтора в поверхностных водоемах может привести к его избыточному поступлению в организм при употреблении артезианской воды.

Однако грунтовые воды не единственный источник поступления фторидов в организм человека и животных. Районы производства алюминия также являются регионами с повышенным загрязнением солями фтора.

Соли фтора легко всасываются в тонком кишечнике. При взаимодействии солей фтора с соляной кислотой в желудке образуется плавиковая кислота, которая способна проникать через стенку желудка в кровь путём облегченной диффузии. Попадая в кровь, соли фтора переходят в ионизированное состояние. Ионы фтора способны изменять активность многих ферментов, присутствующих в крови.

Наиболее изученным эффектом ионов фтора является его выраженное прооксидантное действие, которое выражается в усилении, под воздействием ионов фтора, продукции активных форм кислорода (далее – АФК), с одновременным снижением активности антиоксидантных ферментов.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе увеличенной продукции АФК, на данный момент не установлены, однако имеются сведения о влиянии ионов фтора на функционирование митохондриальных дыхательных цепей, которое сопровождается

повышением продукции супероксидного анион-радикала ($\cdot\text{O}_2^-$) митохондриями [8].

Также в литературе имеются сведения про увеличение продукции оксида азота (NO) под воздействием ионов фтора. Механизмом, ведущим к гиперпродукции NO, является активация индуцибельной формы NO-синтазы (далее – iNOS), которая экспрессируется преимущественно в лейкоцитах. Ионы фтора способны активировать макрофаги и моноциты, приводя к выделению ими провоспалительных цитокинов и увеличивая экспрессию iNOS [6].

Оксид азота является важной биорегуляторной молекулой в организме человека и млекопитающих. В физиологических концентрациях он способен ограничивать продукцию $\cdot\text{O}_2^-$ и других АФК [9], формируя замкнутый, саморегулируемый цикл. В состав цикла оксида азота входят: NO-синтазы, главные продуценты NO в физиологических условиях, аргиназы, конкуренты за субстрат с NO-синтазами, нитрит редуктазы, часть нитрат-нитрит редуктазной системы, более древнего механизма продукции NO из экзогенных нитратов. Ионы фтора, изменяя активность NO-синтаз, могут изменить функциональное состояние цикла оксида азота.

Цель исследования: изучить влияния хронической фторидной интоксикации на продукцию оксида азота от NO-синтаз, в крови и слизистой оболочке желудка, и продукцию оксида азота от нитрит-редуктаз в слизистой оболочке желудка крыс.

Материал и методы исследования. Опыт проведён на 23 крысах линии Вистар. Животные были разделены на две группы: группу интактных животных (n=10) и группу животных с фторидной интоксикацией (n=13).

Хроническую фторидную интоксикацию воспроизводили путём внутрижелудочного введения раствора фторида натрия из расчёта 10 мг/кг на протяжении 30 дней.

Все манипуляции проводили согласно «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и других научных целей».

Вывод животных из эксперимента осуществлялся под тиопенталовым наркозом путём забора крови из правого желудочка сердца, кровь в дальнейшем стабилизировалась цитратом.

Биохимические показатели исследовались в крови и 10%-ном гомогенате тканей.

Активность NO-синтаз определяли по приросту концентрации нитритов после инкубации в среде, содержащей индуктор в виде НАДФН и субстрат реакции. Концентрацию нитритов определяли с использованием реактива Грисса-Илосвая [3]. Активность аргиназ определяли по приросту концентрации L-орнитина, после 20-ти часовой инкубации в растворе, содержащем 0,3 мл 24 mM L-аргинина [1, 3]. Активность нитрит редуктаз определяли по убыли нитритов в среде, содержащей индуктор в виде НАДН [3].

Данные статистически обработаны с использованием t-критерия Стьюдента. Статистическая обработка проводилась в пакете программ Excel с использованием расширения Realstatistics 2007. Разница признавалась статистически значимой при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Установлено, что хроническая фторидная интоксикация увеличивает продукцию оксида азота NOS-зависимым путём на 58,81% (таблица).

Таблица – Влияние фторидной интоксикации на продукцию оксида азота в крови и слизистой оболочке желудка крыс ($M \pm m$)

Кровь				
Животные	Общая активность NOS, мкмоль NO_2^- /мин	Общая активность аргиназ, мкмоль/мин	Общая активность нитрит редуктаз, мкмоль NO_2^- /мин	Концентрация NO_2^- нмоль
Интактные животные, n=10	11,63±2,0	1,64±0,32	Н/И	3,91±0,47
Группа фторидной интоксикации, n=13	18,47±1,07*	0,51±0,09*	Н/И	9,26±1,05*

Слизистая оболочка желудка				
Животные	Общая активность NOS, мкмоль NO ₂ ⁻ /мин на г белка	Общая активность аргиназ, мкмоль/мин·н а г белка	Общая активность нитрит редуктаз, мкмоль NO ₂ ⁻ /мин·на г белка	Концентрация NO ₂ ⁻ нмоль
Интактные животные, n=10	6,51±0,41	2,07±0,08	4,32±0,69	11,56±0,51
Группа фторидной интоксикации, n=13	14.37±0.82*	1.24±0.11*	8.02±1.23*	19.59±0.46*

* - данные статистически значимо отличаются от группы интактных животных.

Н/И – показатель не исследовался.

Данные изменения могут быть объяснены активацией ионами фтора моноцитов крови, что приводит к избыточной экспрессии iNOS [7]. Активность аргиназ в крови снижается на 68,9%. Ингибирующий эффект ионов фтора на аргиназы объясним снижением свободного субстрата для аргиназ в условиях повышенной активности iNOS. Концентрация нитритов возрастает в 2,37 раза, что может привести к развитию нитрозативного стресса.

Подобная картина наблюдается и в слизистой оболочке желудка крыс. Активность NOS увеличивается в 2,21 раза, активность аргиназ снижается в 1,67 раза. Активность нитрит редуктаз увеличивается в 1,87 раза. Концентрация нитритов увеличивается на 69,46%. Увеличение концентрации нитритов можно объяснить повышенной активностью NOS, однако динамика увеличения отличается от таковой в крови. Данный эффект объясним активацией тканевых нитрит редуктаз, которые обеспечивают переход нитритов в оксид азота. Увеличение их активности обусловлено увеличением концентрации нитритов вследствие активации под воздействием ионов фтора iNOS. Таким образом, активацию нитрит редуктаз в условиях хронической фторидной интоксикации можно считать адаптивной реакцией на увеличенную продукцию NO_2^- NOS-зависимым путём.

Снижение активности аргиназ, наблюдаемое в крови и слизистой оболочке желудка, может иметь негативное влияние на регенерацию тканей. Конечным продуктом аргиназо-зависимого расщепления L-аргинина является L-орнитин, который в последующем используется для синтеза полиаминов (спермидина и путресцина), которые стимулируют митотическое деление клеток.

В литературе имеются сведения об активации процессов пероксидного повреждения тканей, которые опосредованы активацией аргиназы 2 [10]. В наших же исследованиях показано, что общая активность аргиназ под действием ионов фтора снижается. Однако в наших предыдущих исследованиях было

показано, что со снижением активности аргиназ, продукция АФК и гидроперекисей липидов увеличиваются [2].

Аргиназа 1 также является провоспалительным ферментом и способствует развитию воспаления в эндотелии сосудов путём разобщения сродности эндотелиальной формы NOS (eNOS) с субстратом [5]. Изменение сродства eNOS к субстрату приводит к повышению формирования АФК [4]. В нашей же работе показано, что увеличение продукции оксида азота, что может, по принципу обратной связи, привести к ингибированию активности eNOS. Снижение активности eNOS приведет к снижению сродства фермента с субстратом и увеличению продукции АФК с последующим развитием оксидативного стресса. Таким образом, развитие оксидативного стресса, описанного в нашей предыдущей работе, является NOS-опосредованным.

Выводы:

1. Хроническая фторидная интоксикация увеличивает продукцию оксида азота NOS-опосредованным путём.
2. Активация тканевых нитрит редуктаз в условиях избыточного поступления ионов фтора является адаптивной реакцией, направленной на уменьшение концентрации нитритов в тканях.

Литература

1. Акимов, О. Е. Влияние энтеросорбентов на метаболизм аргинина и процессы пероксидного окисления липидов в крови крыс в условиях хронической сочетанной интоксикации нитратом и фторидом натрия / О. Е. Акимов, И. А. Ковалёва, В. А. Костенко // Вестн. АИГУВ (Казахстан). – 2016. – № 3. – С. 37–42.
2. Акимов, О. Е. Генерация свободных радикалов и процессы пероксидного окисления липидов в слизистой оболочке желудка крыс в условиях сочетанной нитратной и фторидной интоксикации. / О. Е. Акимов, А. В. Мищенко, В. А. Костенко // Вестн. АИГУВ (Казахстан). – 2016. – № 3. – С. 42–46.
3. Akimov, O. Ye. Functioning of nitric oxide cycle in gastric mucosa of rats under excessive combined intake of sodium nitrate and fluoride / O. Ye. Akimov, V. O. Kostenko // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 88. – № 6. – P. 70–75.
4. Anantha Vijay Santhanam, R. Uncoupling of eNOS causes superoxide anion production and impairs NO signaling in the cerebral microvessels of hph-1 mice / R. Anantha Vijay Santhanam // J. Neurochem. – 2012. – № 122(6). – P. 1211–1218.
5. Arginase I enhances vascular endothelial inflammation and senescence through eNOS-uncoupling / Zhu Cuicui [et al.] // BMC Res. Notes. – 2017. – №10. – Art. 82. – P. 1–8.
6. Fluoride as a factor initiating and potentiating inflammation in THP1 differentiated monocytes/macrophages. / I. Gutowska [et al.] // Toxicol. In .Vitro. – 2015. – № 29(7). – P. 1661–1668.

7. Fluoride-elicited developmental testicular toxicity in rats: roles of endoplasmic reticulum stress and inflammatory response. / S. Zhang [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2013. – № 271(2). – P. 206–215.

8. Fluoride Increases Superoxide Production and Impairs the Respiratory Chain in ROS 17/2.8 Osteoblastic Cells / B. L. Fina [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 6. – Art.e100768.

9. Inorganic nitrite attenuates NADPH oxidase-derived superoxide generation in activated macrophages via a nitric oxidedependent mechanism. / T. Yang, [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2015. – № 83. – P.159–166.

10. Upregulation of arginase activity contributes to intracellular ROS production induced by high glucose in H9c2 cells / Zhou Lu [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2015. – № 8(3). – P. 2728–2736.

References

1. Akimov, O. Ye. Vliyaniye enterosorbentov na metabolizm arginina i protsessy peroksidnogo okisleniya lipidov v krovi krys v usloviyakh khronicheskoy sochetannoy intoksikatsii nitratom i ftoridom natriya / O. Ye. Akimov, I. A. Kovalova, V. A. Kostenko // *Vestn. AIGUV (Kazakhstan).* – 2016. – № 3. – S. 37–42.

2. Akimov, O. Ye. Generatsiya svobodnykh radikalov i protsessy peroksidnogo okisleniya lipidov v slizistoy obolochke zheludka krys v usloviyakh sochetannoy nitratnoy i ftoridnoy

intoksikatsii. / O. Ye. Akimov, A. V. Mishchenko, V. A. Kostenko // Vestn. AIGUV (Kazakhstan). – 2016. – № 3. – S. 42–46.

3. Akimov, O. Ye. Functioning of nitric oxide cycle in gastric mucosa of rats under excessive combined intake of sodium nitrate and fluoride / O. Ye. Akimov, V. O. Kostenko // Ukr. Biochem. J. – 2016. - Vol. 88. – № 6. – P. 70–75.

4. Anantha Vijay Santhanam, R. Uncoupling of eNOS causes superoxide anion production and impairs NO signaling in the cerebral microvessels of hph-1 mice / R. Anantha Vijay Santhanam // J. Neurochem. – 2012. – № 122(6). – P. 1211–1218.

5. Arginase-I enhances vascular endothelial inflammation and senescence through eNOS-uncoupling / Zhu Cuicui [et al.] // BMC Res. Notes. – 2017. – № 10. – Art. 82. – P. 1–8.

6. Fluoride as a factor initiating and potentiating inflammation in THP1 differentiated monocytes/macrophages. / I. Gutowska [et al.] // Toxicol. In. Vitro. – 2015. – № 29(7). – P. 1661–1668.

7. Fluoride-elicited developmental testicular toxicity in rats: roles of endoplasmic reticulum stress and inflammatory response. / S. Zhang [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2013. – № 271(2). – P. 206–215.

8. Fluoride Increases Superoxide Production and Impairs the Respiratory Chain in ROS 17/2.8 Osteoblastic Cells / B. L. Fina [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. № 9. – № 6. – Art.e100768.

9. Inorganic nitrite attenuates NADPH oxidase-derived superoxide generation in activated macrophages via a nitric

oxidation-dependent mechanism. / T. Yang [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2015. – № 83. – P. 159–166.

10. Upregulation of arginase activity contributes to intracellular ROS production induced by high glucose in H9c2 cells / Zhou Lu [et al.] // Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2015. – № 8(3). – P. 2728–2736.

Поступила 23.05.2017.

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА НА
СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ОРГАНИЗМЕ
КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СИНДРОМА
ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В УСЛОВИЯХ
КРУГЛОСУТОЧНОГО ОСВЕЩЕНИЯ**

Беликова Е. И., Френкель Ю. Д., Черно В. С.

Николаевский национальный университет

имени В. А. Сухомлинского, г. Николаев, Украина

**INFLUENCE OF EXOGENOUS MELATONIN ON FREE
RADICAL PROCESSES IN RATS EXPOSED TO LIGHT
AROUND THE CLOCK UNDER MODELING OF INSULIN
RESISTANCE SYNDROME**

Belikova E. I., Frenkel Yu. D., Chernov V. S.

V. A. Sukhomlinsky Nikolayev National University,

Nikolaev, Ukraine

Реферат. Целью работы было оценить влияние экзогенного мелатонина на свободнорадикальные процессы в организме крыс (крови, печени, скелетных мышцах) при воспроизведении углеводно-липидной модели синдрома инсулинорезистентности в условиях круглосуточного освещения.