

РАЗДЕЛ I. ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 615.2'546.28.-31-022.532-148:612.616.3.115:616-099]-092.9

ВЛИЯНИЕ СУСПЕНЗИИ НАНОДИСПЕРСНОГО ОКСИДА КРЕМНИЯ НА СВОБОДНО РАДИКАЛЬНОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ СЕМЕННИКОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ НИТРАТНО-ФТОРИДНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Акимов О. Е., Денисенко С. В., Костенко В. А.

Высшее государственное учебное заведение Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия», г. Полтава, Украина

INFLUENCE OF NANOSIZED SILICA OXIDE SUSPENSION ON FREE RADICAL DAMAGE TO TESTES IN RATS EXPOSED TO CHRONIC NITRATE-FLUORE INTOXICATION

Akimov O. Ye., Denysenko S. V., Kostenko V. O.

Higher State educational institution of Ukraine «Ukrainian Medical Stomatological Academy», Poltava, Ukraine

Реферат. Целью исследования являлось изучение влияния суспензии нанодисперсного оксида кремния на продукцию супероксидного анион-радикала, активность антиоксидантных ферментов, процессы перекисного окисления липидов в условиях

хронической нитратно-фторидной интоксикации в семенниках крыс.

Опыты проведены на 15 половозрелых самцах линии Вистар. Хроническую интоксикацию воспроизводили путём интрагастрального введения нитрата натрия и фторида натрия в дозах 500 мг/кг и 10 мг/кг, соответственно.

Было установлено, что хроническая нитратно-фторидная интоксикация увеличивает продукцию супероксидного анион-радикала, снижает активность антиоксидантных систем и увеличивает содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. В этих условиях снижается толщина сперматогенного эпителия и увеличивается толщина соединительно-тканых элементов. Применение суспензии нанодисперсного оксида кремния снижает продукцию супероксида, повышает активность антиоксидантных ферментов, снижает концентрацию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Морфологически отмечается восстановление сперматогенного эпителия.

Таким образом, суспензия нанодисперсного оксида кремния эффективна для коррекции изменений в семенниках крыс вызванных хронической нитратно-фторидной интоксикацией.

Ключевые слова: нитрат натрия, фторид натрия, семенники, суспензия нанодисперсного оксида кремния.

Abstract. The aim of the present work is to study the influence of a suspension of nanosized silica oxide on the production of superoxide anion radical, the activity of antioxidant enzymes, and the processes of lipid peroxidation in testes of rats exposed to chronic nitrate-fluoride intoxication.

Experiments were carried out on 15 mature male rats of the Wistar line. Chronic intoxication was modelled by intragastric administration of sodium nitrate and sodium fluoride in doses of 500 mg/kg and 10 mg/kg respectively.

It was found out that chronic nitrate-fluoride intoxication increases the production of superoxide anion radical, reduces the activity of antioxidant enzymes and increases the content of TBA-reactants. Under these conditions, the thickness of the spermatogenic epithelium becomes thinned, while the thickness of the connective tissue elements increases. The use of a suspension of nanosized silica oxide reduces the production of superoxide, increases the activity of antioxidant enzymes, lowers the concentration of TBA reactants. Morphologically, recovery of the spermatogenic epithelium is observed.

The suspension of nanosized silica oxide is effective in correcting changes in testes of rats caused by chronic nitrate-fluoride intoxication.

Key words: sodium nitrate, sodium fluoride, testes, suspension of nanosized silica oxide.

Введение. В некоторых регионах Украины отмечается повышенное содержание фтора в грунтовых и питьевых водах. Примером таких регионов могут служить Полтавская, Кировоградская и Днепропетровская области. Однако даже в регионах, где фтор распространен в грунте не настолько сильно, проблема фторидного загрязнения питьевых и грунтовых вод является актуальной. Примером может послужить г. Сосновка Львовской области [6].

Еще одним загрязнителем питьевых и грунтовых вод являются нитраты щелочных и щелочно-земельных металлов. Нитраты широко используются в качестве удобрений в сельском хозяйстве, они улучшают рост и повышают стойкость растений к факторам окружающей среды. Преимущественно нитраты из удобрений накапливаются в зеленой части растения (листья и стебли), однако в случае корнеплодов (морковь, свекла) они преимущественно накапливаются в самом плоде. Нитраты, которые не усвоились растениями, попадают в поверхностный водоносный горизонт. Проблема нитратного загрязнения колодцев отмечается в Кировоградской, Николаевской и Полтавской областях.

В настоящее время для Украины является актуальной проблема мужского бесплодия. Среди заболеваний, которые наиболее часто вызывают мужское бесплодие, выделяют варикоцеле, крипторхизм, урогенитальные инфекции, аутоиммунные и эндокринные нарушения. Кроме того,

значительную роль в снижении мужской фертильности играют вредные факторы внешней среды, ожирение [5].

В литературе встречаются данные о негативном влиянии ионов фтора на репродуктивную функцию, что обуславливается повреждением ионами фтора тканей семенников [12]. Схожие изменения наблюдаются при избыточном поступлении нитратов в организм [11]. Однако не исключено одновременное избыточное поступление нитратов и фторидов в организм человека и животных с водой и продуктами питания. Кроме того, в литературе недостаточно информации о влиянии сочетанного избыточного поступления нитратов и фторидов в организм на ткани семенников. В наших предыдущих работах была показана эффективность суспензии нанодисперсного оксида кремния и других сорбентов для коррекции изменений, вызываемых хронической нитратно-фторидной интоксикацией [1].

Цель исследования: изучить влияние суспензии нанодисперсного оксида кремния на морфологические и метаболические изменения в семенниках крыс при сочетанной нитратно-фторидной интоксикации.

Материал и методы исследования. Опыт проведён на 15 половозрелых крысах-самцах линии Вистар. Животные были разделены на 3 группы по 5 животных: первая – интактные животные, вторая – животные с хронической нитратно-фторидной интоксикации, третья – группа животных, которым на фоне

хронической нитратно-фторидной интоксикации вводили суспензию нанодисперсного оксида кремния.

Хроническую нитратно-фторидную интоксикацию моделировали путём интрагастрального введения растворов нитрата натрия (500 мг/кг) и фторида натрия (10 мг/кг) на протяжении 30 дней. Третьей группе животных на фоне моделирования нитратно-фторидной интоксикации интрагастрально вводили суспензию нанодисперсного оксида кремния в дозе 100 мг/кг.

Животные содержались в стандартных условиях вивария.

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.

Биохимические показатели исследовались в 10%-ном гомогенате тканей.

Для гистологического исследования ткани фиксировались в 10%-ном растворе забуференного нейтрального формалина.

Продукцию супероксидного анион-радикала ($\cdot\text{O}_2^-$) оценивали по концентрации диформаза, который образуется в реакции $\cdot\text{O}_2^-$ с нитросиним тетразолием (далее – НСТ). Для оценки вклада в

продукцию $\cdot\text{O}_2^-$ НАДФН-зависимых микросомальных электроно-транспортных цепей (далее – ЭТЦ) использовали индуктор в виде 0,05 мл 3%-го водного раствора НАДФН. Для оценки вклада в продукцию $\cdot\text{O}_2^-$ НАДН-зависимых митохондриальных ЭТЦ использовали индуктор в виде 0,05 мл 3%-го водного раствора НАДН [3].

Активность супероксиддисмутазы (далее – СОД) определяли по уменьшению скорости аутоокисления адреналина в щелочной среде [4]. Активность каталазы определяли по концентрации окрашенного комплекса с молибдатом аммония [4].

Концентрацию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (далее – ТБК-реактантов) определяли по концентрации образующихся триметиновых комплексов в реакции малонового диальдегида (далее – МДА) и других промежуточных продуктов окисления липидов с тиобарбитуровой кислотой [4].

Ткани, фиксированные в 10%-ном формалине, заводили в парафин после обезвоживания в спиртах различной концентрации (гистобатарее). Полученные парафиновые срезы депарафинизировали и окрашивали по методу Ван-Гизона. Ткани изучали под световым микроскопом об. $10^x - 90^x$, окуляр 10^x .

Результаты поддавались статистической обработке по методу Манна-Уитни. Расчёты проводились 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 нитратно-фторидная интоксикация увеличивает базовую продукцию $\cdot\text{O}_2^-$ относительно группы интактных животных на 66,1%, микросомальными ЭТЦ – на 44,44%, митохондриальными ЭТЦ – на 26,75% (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние суспензии нанодисперсного оксида кремния на продукцию свободных радикалов и процессы пероксидации липидов в семенниках крыс в условиях хронической нитратно-фторидной интоксикации ($M \pm m$)

Показатели	Интактные животные, n=5	Хроническая нитратно-фторидная интоксикация, n=5	Суспензия нанодисперсного оксида кремния, n=5
Продукция $\cdot\text{O}_2^-$, нмоль/с на г			
Базовая	0,218±0,006	0,362±0,26*	0,249±0,008**
НАДФН-зависимые ЭТЦ	9,0±0,16	13,0±0,47*	7,7±0,12**
НАДН-зависимые ЭТЦ	6,84±0,086	8,67±0,082*	7,04±0,091**
Активность СОД, у.е	1,67±0,27	0,65±0,06*	1,83±0,52**

Активность каталазы, мккатал/г	0,153±0,005	0,122±0,008*	0,15±0,008**
Концентрация ТБК-реактантов, мкмоль	10,96±0,47	18,46±0,83*	13,41±0,34**

* - данные статистически значимо отличаются от интактной группы

** - данные статистически значимо отличаются от группы хронической нитратно-фторидной интоксикации

Активность СОД в условиях хронической нитратно-фторидной интоксикации снижается на 61,1%, активность каталазы снижается на 20,26%. Содержание ТБК-реактантов увеличивается 68,4%. При морфологическом исследовании отмечается истончение сперматогенного эпителия и увеличение содержание элементов соединительной ткани, то есть фиброз (рисунки 1, 2).

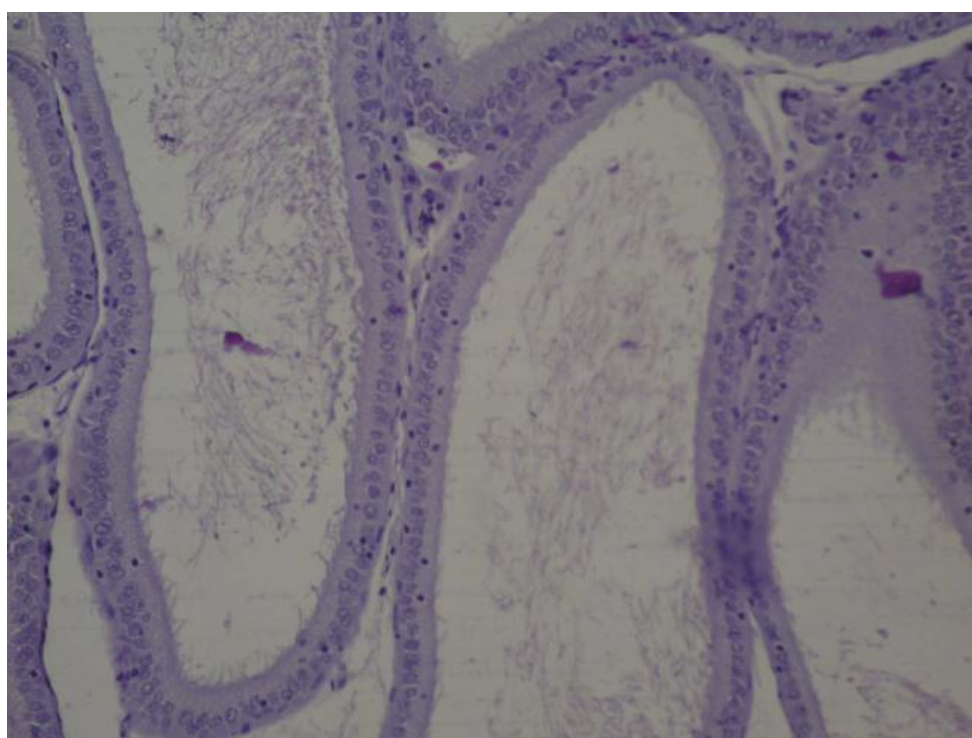


Рисунок 1. – Семенники интактных животных

Окраска гематаксилином-эозином. Увеличение 200 раз

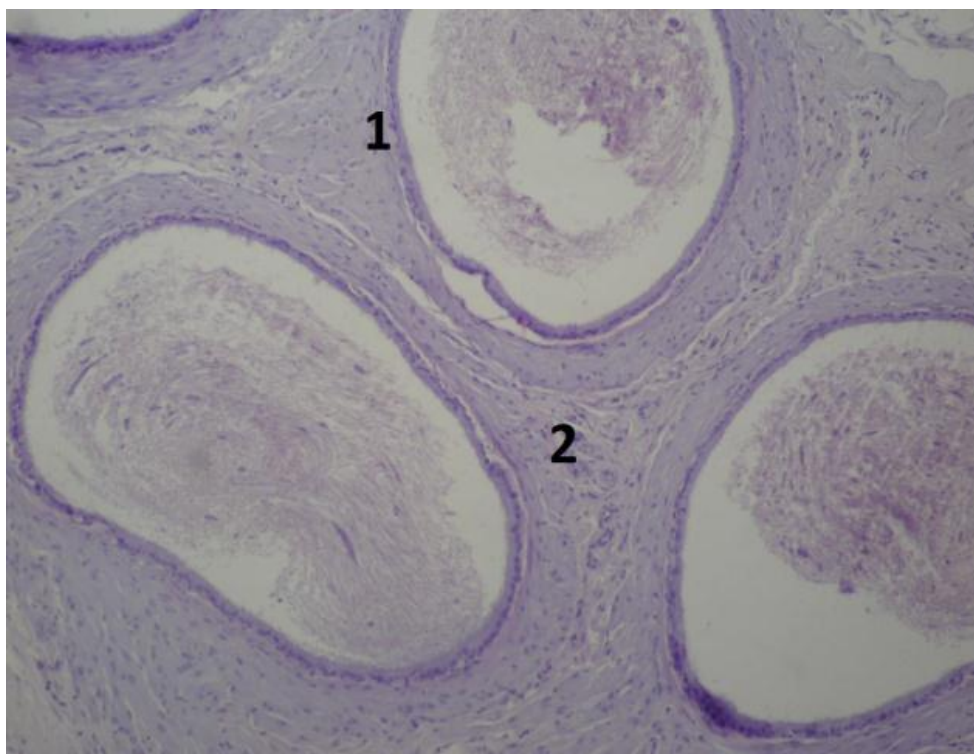


Рисунок 2. – Семенники группы нитратно-фторидной интоксикации

Окраска гематаксилином-эозином. Увеличение 200 раз.

1 – истончение сперматогенного эпителия. 2 – разрастание соединительно-тканых элементов (фиброз)

Использование суспензии нанодисперсного оксида кремния в условиях хронической нитратно-фторидной интоксикации уменьшает базовую продукцию $\cdot\text{O}_2^-$ относительно группы хронической нитратно-фторидной интоксикации на 31,2%, микросомальными ЭТЦ – на 40,8%, митохондриальными ЭТЦ – на 18,8%. Активность СОД повышается на 181,5%, активность каталазы увеличивается на 22,95%. Содержание ТБК-реактантов уменьшается на 27,4%. Морфологически отмечается уменьшение

явлений фиброза и увеличение толщины сперматогенного эпителия (рисунок 3).

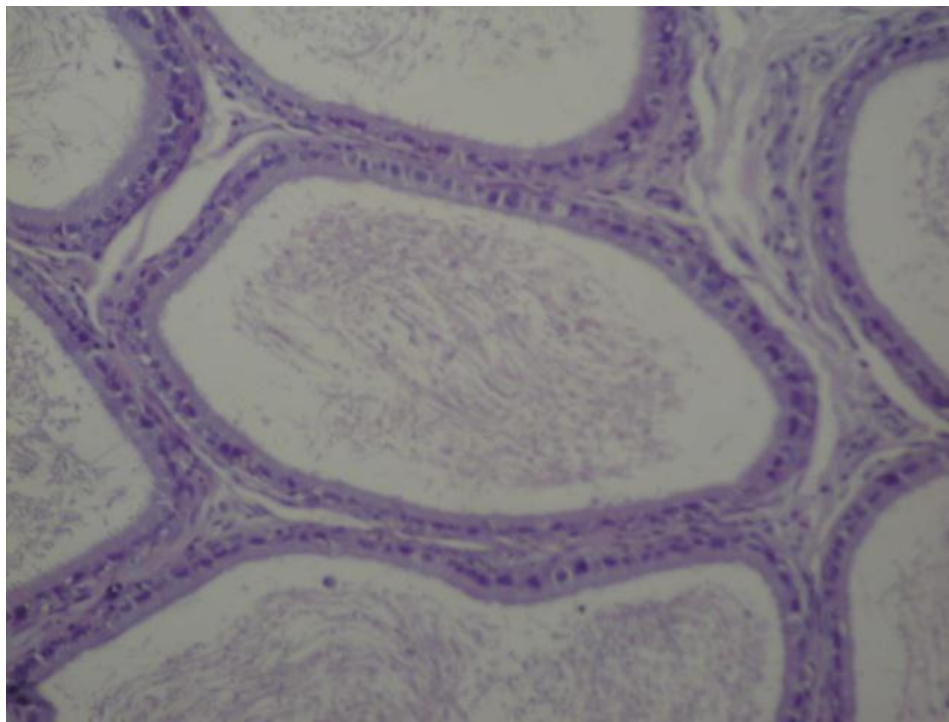


Рисунок 3. – Семенники группы суспензии нанодисперсного оксида кремния

Окраска гематаксилином-эозином. Увеличение 200 раз

В литературе имеется упоминание об увеличении под воздействием ионов фтора продукции активных форм кислорода (далее – АФК) в семенниках крыс [13]. В своей работе Wang J. и соавт. (2014) установили, что уровень малонового диальдегида (далее – МДА) и концентрация перекиси водорода возрастают в зависимости от дозы введённого фторида натрия [14]. Причем в этой работе были рассмотрены дозы от 1 мг/кг до 3 мг/кг.

В работе С.В. Денисенко и В.А. Костенко (2003) показано, что поступление нитратов в дозе 200 мг/кг изменяет продукцию АФК в семенниках крыс в первый месяц введения избыточного количества нитрата натрия преимущественно за счёт увеличения продукции $\cdot\text{O}_2^-$ митохондриальными ЭТЦ [2]. Причем при более длительном токсическом воздействии нитрата натрия увеличивается вклад и микросомальных ЭТЦ. Активность СОД при введении 200 мг/кг нитрата натрия в семенниках увеличивается с 2 недели до 3 месяцев, с 6 месяца интоксикации активность СОД не изменяется при сравнении с контрольной группой, что может свидетельствовать про истощение антиоксидантной защиты, что подтверждается увеличением концентрации ТБК-реактантов с 3-месяца.

Подобные результаты были получены Aly H.A. и соавт. (2010), установившими, что увеличение концентрации ТБК-реактантов и перекиси водорода в семенниках крыс в условиях избыточного поступления нитрата натрия в дозах 50, 100 и 200 мг/кг [11]. В этих же условиях снижаются активности таких антиоксидантных ферментов как СОД, глутатион редуктаза и каталаза. Причем, следует отметить, что, согласно данным этих авторов, нитрат натрия в дозе 50 мг/кг статистически значимо не изменяет активность каталазы и глутатион редуктазы через 2 месяца эксперимента.

В нашей работе была взята более высокая доза нитрата натрия (500 мг/кг) в сочетании с более высокой дозой фторида натрия (10

мг/кг). Результаты наших исследований показывают синергический эффект нитратов и фторидов на продукцию $\cdot\text{O}_2^-$, поскольку прирост продукции и микросомальными и митохондриальными ЭТЦ отмечается уже через месяц моделирования хронической интоксикации.

Увеличение продукции $\cdot\text{O}_2^-$ микросомальными ЭТЦ в семенниках можно объяснить фторидным компонентом сочетанной интоксикации. Механизм увеличения продукции $\cdot\text{O}_2^-$ микросомальными ЭТЦ связан со снижением под воздействием фторидов экспрессии цитохрома P 450. По данным Zhang J. и соавт. (2017), фтор при поступлении в организм с питьевой водой в дозе 100 мг/л способен угнетать экспрессию цитохрома P 450. В отсутствии достаточного количества цитохрома P 450 микросомальная ЭТЦ будет сбрасывать электроны непосредственно на кислород, что и приводит к увеличению продукции O_2^- [9].

Снижение активности каталазы и СОД в первый месяц сочетанной интоксикации можно объяснить более высокой дозой нитратов с одной стороны и наличием ионов фтора, поскольку ионы фтора способны изменять валентность железа в каталазе, снижая её активность [7]. Увеличение же ТБК-реактантов объяснимо увеличением продукции $\cdot\text{O}_2^-$ с одновременным снижением активности супероксиддисмутазно-каталазной системы при хронической сочетанной интоксикации.

Гистологические изменения, наблюдаемые нами через месяц в семенниках крыс после сочетанной нитратно-фторидной интоксикации объяснимы влиянием нитратов на сперматогенный эпителий [11]. В тоже время в литературе имеются упоминания об индукции апоптоза в клетках Сертоли под воздействием избыточной концентрации фторид-ионов АФК-зависимым путём [12]. При уменьшении же количества клеток Сертоли закономерно уменьшаются и пролиферативные процессы в сперматогенном эпителии.

Механизм развития фиброза в тканях семенников может быть связан с активацией ионами фтора индуцибельной формы NO-синтазы (далее – iNOS). Гиперпродукция оксида азота от iNOS приводит к разрастанию соединительной ткани [8]. Примечательно, что у iNOS-нокаутированных мышей было установлено снижение активности фибробластов и ухудшение процессов регенерации в коже [10]. Нитраты же способны при участии нитрат-нитрит редуктазных ферментов восстанавливаться до оксида азота и вносить свой вклад в увеличение продукции NO в тканях семенников. Однако можно сделать заключение, что развитие фиброза в семенниках опосредовано оксидом азота. Вклад же нитрат-нитрит редуктазного звена в продукцию NO при сочетанной интоксикации нуждается в дальнейшем изучении.

Улучшение ситуации при применении суспензии нанодисперсного оксида кремния в качестве сорбента объяснимо снижением количества ионов фтора и нитрат-ионов, которые

поступают в кровь. Так, в нашей предыдущей работе было показано, что суспензия нанодисперсного кремнезема снижает количество нитратов и фторидов, которые способны всасываться в желудочно-кишечном тракте [1]. Снижение концентрации в крови и тканях организма веществ, способствующих образованию прооксидантов, создаёт условия, в которых прооксидантно-антиоксидантный баланс сдвигается в сторону антиоксидантов, о чём свидетельствует увеличение активности антиоксидантных ферментов. Результатом же повышенной активности антиоксидантов на фоне снижения продукции прооксидантов является снижение концентрации в гомогенате семенников продуктов перекисного окисления липидов.

В свою очередь, о снижении оксидационного стресса свидетельствует нормализация морфологической картины в условиях введения суспензии нанодисперсного оксида кремния в качестве сорбента при сочетанной нитратно-фторидной интоксикации.

Выводы:

1. Сочетанная нитратно-фторидная вызывает развитие оксидационного стресса в семенниках крыс.
2. Разрастание соединительной ткани в семенниках крыс при сочетанной нитратно-фторидной интоксикации обусловлено усилением оксидационного стресса.
3. Суспензия нанодисперсного оксида кремния эффективна для коррекции оксидантного стресса и обусловленного им

разрастания соединительной ткани, при избыточном поступлением в организм фторидов и нитратов.

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. Денисенко, С. В. Изменения митохондриального окисления и фосфорилирования в семенниках белых крыс в условиях избыточного поступления в их организм нитрата натрия / С. В. Денисенко, В. А. Костенко // Укр. биохим. журн. – 2003. – № 1. – С. 95–97.

3. Костенко, В. О. Продукція супероксидного аніон-радикала та оксиду азоту у тканині нирок після хірургічного втручання / В. О. Костенко, О. І. Цебржинський // Фізіол. журн. – 2000. – Т. 46, № 5. – С. 56–62.

4. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Л. В. Беркало [та ін.]; під ред. І. П. Кайдашев. – Полтава: Полімет, 2003. – 320 с.

5. Поворознюк, М. В. Поширеність та основні причини безпліддя у чоловіків / М. В. Поворознюк // Медичні аспекти здоров'я чоловіка. – 2012. – № 3(5). – С. 62–73.

6. Стан ендогенної інтоксикації у дітей, що проживають на території, забрудненій солями важких металів та фтору / Н. С. Лук'яненко [та ін.] // Вісник Сумського держ. університету. Серія «Медицина». – 2002. – № 11. – С. 92–94.
7. Barbier, O. Molecular mechanisms of fluoride toxicity / O. Barbier, L. Arreola-Mendoza, L. M. Del Razo // Chem. Biol. Interact. – 2010. – Vol. 188. – P. 319–333.
8. Chronic fluoride exposure-induced testicular toxicity is associated with inflammatory response in mice / R. Wei [et al.] // Chemosphere. – 2016. - № 153. – P. 419–425.
9. Effects of Fluoride on Expression of P450, CREM and ACT Proteins in Rat Testes / J. Zhang [et al.] // Biol. Trace Elem. Res. – 2017. – № 175(1). – P. 156–160.
10. Impaired healing of a cutaneous wound in an inducible Nitric oxide synthase-knockout mouse / T. Kitano [et al.] // Dermatology Research and Practice. – 2017. – № 2017. – P. 2184040–2184051.
11. Potential testicular toxicity of sodium nitrate in adult rats. / H. A. Aly [et al.] // Food. Chem. Toxicol. – 2010. – № 48(2). – P. 572–578.
12. Sodium fluoride induces apoptosis through reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress pathway in Sertoli cells / Y. Yang [et al.] // J. Environ. Sci. (China). – 2015. – № 30. – P. 81–89.
13. The antagonism of aluminum against fluoride-induced oxidative stress and c-Fos overexpression in rat testes / J. Wang [et al.] // Toxicol. Mech. Methods. – 2014. – № 24(2). – P. 136–141.

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. Denisenko, S. V. Izmeneniya mitokhondrial'nogo okisleniya i fosforilirovaniya v semennikakh belykh krys v usloviyakh izbytochnogo postupleniya v ikh organizm nitrata natriya / S. V. Denisenko, V. A. Kostenko // Ukr. biokhim. zhurn. – 2003. – № 1. – S. 95–97.
3. Kostenko, V. O. Produktsiya superoksidnogo anion-radikala ta oksidu azotu u tkaniní nirok píslya khírurgíchnogo vtruchannya / V. O. Kostenko, O. Í. Tsebrzhins'kiy // Fíziol. zhurn. – 2000. – T. 46, № 5. – S. 56–62.
4. Metodi klíníchnikh ta yeksperimental'nikh doslídzhen' v meditsiní / L.V. Berkalo [ta yed.]; píd yed. Í. P. Kaydashev. – Poltava: Polímet, 2003. – 320 s.
5. Povoroznyuk, M.V. Poshireníst' ta osnovní prichini bezplíddya u cholovíkív / M.V. Povoroznyuk // Medichní aspekti zdorov'ya cholovíka. – 2012. – № 3(5). – S. 62–73.
6. Stan yendogennoï íntoksikatsíï u dítey, shcho prozhivayut' na teritoríï, zabrudneníy solyami vazhkikh metalív ta ftoru / N. S. Luk'yanenko [et al.] // Vísnik Sums'kogo Derzh. uníversitetu. Seríya «Meditsina». – 2002. – № 11. – S. 92–94.

7. Barbier, O. Molecular mechanisms of fluoride toxicity / O. Barbier, L. Arreola-Mendoza, L. M. Del Razo // Chem. Biol. Interact. – 2010. – Vol. 188. – P. 319–333.
8. Chronic fluoride exposure-induced testicular toxicity is associated with inflammatory response in mice / R. Wei [et al.] // Chemosphere. – 2016. – № 153. – P. 419–425.
9. Effects of Fluoride on Expression of P450, CREM and ACT Proteins in Rat Testes / J. Zhang [et al.] // Biol. Trace. Elem. Res. – 2017. – № 175(1). – P. 156–160.
10. Impaired healing of a cutaneous wound in an inducible Nitric oxide synthase-knockout mouse / T. Kitano [et al.] // Dermatology Research and Practice. – 2017. – № 2017. – P. 2184040–2184051.
11. Potential testicular toxicity of sodium nitrate in adult rats. / H. A. Aly [et al.] // Food. Chem. Toxicol. – 2010. – № 48(2). – P. 572–578.
12. Sodium fluoride induces apoptosis through reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress pathway in Sertoli cells / Y. Yang [et al.] // J. Environ. Sci. (China). – 2015. – № 30. – P. 81–89.
13. The antagonism of aluminum against fluoride-induced oxidative stress and c-Fos overexpression in rat testes / J. Wang [et al.] // Toxicol Mech Methods. – 2014. – № 24(2). – P. 136–141.

Поступила 18.05.2017.