

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА ТА БІОЛОГІЯ

УДК 616.33-092.9:615.916'16'175 \*

Акімов О.Є., Костенко В.О.

### ВПЛИВ РІЗНИХ КАРБОНОВИХ СОРБЕНТІВ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ ЦИКЛУ ОКСИДУ АЗОТУ В СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ШЛУНКА ЩУРІВ ЗА УМОВ ПОЄДНАНОЇ НІТРАТНО-ФТОРИДНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

*В статті розглянуто вплив суспензій «Карболайну» та лігніну гідролізного на функціонування циклу оксиду азоту в слизовій оболонці шлунка щурів за умов поєднаної нітратно-фторидної інтоксикації. Досліди проведено на 53 статевозрілих щурах лінії «Вістар». Для моделювання нітратно-фторидної інтоксикації тваринам внутрішньошлунково вводили розчини нітрату та фториду натрію в дозі 500 мг/кг та 10 мг/кг відповідно. Для оцінки функціонального стану циклу оксиду азоту визначали загальну активність NO-синтази, аргінази, нітрат-нітритредуктази, вміст нітритів та пероксинітриту. Встановлено, що суспензія сорбенту «Карболайн» більш ефективна для корекції змін в функціонуванні циклу оксиду азоту в слизовій оболонці шлунка щурів, викликаних фторидним компонентом нітратно-фторидної інтоксикації. Суспензія лігніну гідролізного більш ефективна для корекції змін в функціонуванні циклу оксиду азоту в слизовій оболонці шлунка щурів, викликаних нітратним компонентом нітратно-фторидної інтоксикації. Суспензія сорбенту «Карболайн» більш ефективна для попередження накопичення нітрит-іонів в організмі в умовах нітратно-фторидної інтоксикації.*

Ключові слова: нітрат натрію, фторид натрію, NO-синтаза, нітратредуктаза, нітритредуктаза.

Стаття є фрагментом планової НДР ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» «Роль активних форм кисню, системи оксиду азоту та транскрипційних факторів у механізмах патологічного системогенезу» (№ держреєстрації 0114U004941).

#### Вступ

Вплив екзогенних донаторів оксиду азоту (NO) на організм людини та ссавців не є однозначним, оскільки можлива як позитивна дія органічних та неорганічних нітратів, так і негативний вплив на функціональний стан органів та систем. Використання нітратів у якості добрив в сільському господарстві створює умови, за яких можливе надмірне надходження нітратів до організму з їжею та водою. Створення ліків, що є донаторами NO, та їх застосування на фоні надмірної кількості нітратів в їжі та воді створює умови для інтоксикації організму нітратами [6].

В деяких регіонах України, окрім нітратної забрудненості, існує проблема надмірної кількості фтору у ґрунтових водах. До таких регіонів відноситься Полтавська, Кіровоградська та Львівська області. Також фториди можуть бути побічними продуктами деяких хімічних підприємств [1]. Тому не виключене одночасне потрапляння великої кількості нітратів та фторидів до організму разом із продуктами харчування та водою, лікарськими засобами.

Для перетворення нітратів та нітритів в NO необхідна участь нітрат і нітритредуктазних систем організму, яким для повноцінного функціонування необхідна гіпоксія, що може бути забезпечена іонами фтору [5]. В нашій попередній ро-

боті було встановлено, що фториди здатні активувати нітрит редуктази та NO-синтази (NOS), змінюючи таким чином фізіологічне функціонування циклу NO. Було також встановлено, що оптимальні умови для функціонування нітрат-нітрит редуктазних систем в слизовій оболонці шлунка створює саме поєднання високих доз нітратів та фторидів. Зростання за цих умов рівня пероксинітриту може свідчити про посилення процесів пероксидації [2]. Тому необхідними є засоби для лікування та профілактики змін в функціонуванні циклу NO. Ефективним засобом для корекції змін, викликаних надлишковим надходженням нітратів та фторидів може стати ентеросорбція.

Метою даної роботи було порівняння впливу суспензії лігніну гідролізного та «Карболайну» на функціонування циклу оксиду азоту в слизовій оболонці шлунка щурів за умов нітратно-фторидної інтоксикації.

#### Матеріали та методи

Досліди проведено на 53 статевозрілих щурах обох статей лінії «Вістар». Хронічну нітратно-фторидну інтоксикацію відтворювали шляхом внутрішньо-шлункового введення розчинів нітрату та фториду натрію із розрахунку 500 мг/кг нітрату натрію та 10 мг/кг фториду натрію протягом 30 днів. Суспензію лігніну гідролізного та

препарату на основі активованого вугілля («Карболайн») на поліетиленоксиді 400 (ПЕО-400) вводили внутрішньошлунково на фоні моделювання хронічної інтоксикації із розрахунку 100 мг/кг діючої речовини. Тварини були розподілені на 4 групи: перша – інтактні (10 тварин), друга – група тварин, на яких відтворювали хронічну нітратно-фторидну інтоксикацію протягом 30 днів (15 тварин), третя – група, якій вводили суспензію лігніну гідролізного на фоні моделювання хронічної нітратно-фторидної інтоксикації (15 тварин), четверта отримувала суспензію «Карболайну» на фоні хронічної нітратно-фторидної інтоксикації (13 тварин). Виведення тварин із експерименту проводилось шляхом забору крові із правого передсердя під тіопенталовим наркозом. Всі маніпуляції із лабораторними тваринами проводились згідно «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей».

Загальну активність NOS визначали за приростом нітритів після 30 хвилинної інкубації при  $t=37^{\circ}\text{C}$  в середовищі, що містить субстрат реакції – 0,3 мл 320 мМ водного розчину L-аргініну та індуктор у вигляді 0,1 мл 1 мМ водного розчину НАДФН. Вміст нітритів визначали спектрофотометрично по кількості азобарвників, утворених із реактивом Грісса-Глосвая [4]. Активність нітритредуктаз визначали по зменшенню вмісту нітритів після 60 хвилинної інкубації у середовищі, що містить донатор електронів у вигляді 0,1 мл водного розчину НАДН концентрацією 1мг/мл та 1 мл фосфатного буферного розчину (рН=7,0). Активність нітратредуктаз визначали шляхом визначення вмісту нітритів, отриманих шляхом відновлення нітратів 0,55% водним розчином гідрозину сульфату, до та після 60 хвилинної інкубації в 1 мл фосфатного буферного розчину (рН=7,0), що містить 0,1 мл розчину НАДН концентрацією 1мг/мл [4].

Загальну активність аргіназ визначали за приростом концентрації L-орнітину після 20 годинної інкубації в 0,5 мл фосфатного буферного

розчину (рН=7,0), що містить 0,3 мл 24 мМ водного розчину L-аргініну. Концентрацію L-орнітину визначали за кольоровою реакцією з реактивом Chinard [4].

Вміст пероксинітритів лужних та лужноземельних металів визначали шляхом додавання до 0,1 мл гомогенату слизової оболонки шлунка, розчиненого в 3,9 мл фосфатного буферного розчину (рН=7,0), 1мл 5% розчину йодиду калію. Після центрифугування протягом 10 хв (1000 g), спектрофотометрично визначали вміст атомарного йоду на довжині хвилі 355 нм [4]. Всі біохімічні дослідження проводились на спектрофотометрі Ulab 101.

Отримані результати піддавались статистичній обробці з використанням тесту Шапіро-Вілка на нормальність дисперсій. Далі використовувалась параметричний метод дисперсійного аналізу ANOVA, з послідовним порівнянням груп за методом Геймса-Ховела. Для уникнення феномену множинних порівнянь була використана поправка за Данн-Сідаком. Різницю вважали статистично значущою при  $p<0,05$ .

#### Результати та їх обговорення

Після 30-денного введення щурам водних розчинів 500 мг/кг нітрату натрію та 10 мг/кг фториду натрію загальна активність NOS зростає на 19% при порівнянні із інтактними тваринами. Застосування за цих умов суспензії сорбенту «Карболайн» знижує активність NOS на 31% у порівнянні із групою поєднаної інтоксикації. Суспензія лігніну гідролізного підвищує активність NOS на 24%. Протилежність ефектів сорбенту «Карболайн» та лігніну на загальну активність NOS може бути пов'язана із неоднаковою здатністю цих сорбентів поглинати іони фтору та нітрат-іонів. За даними наших попередніх робіт зростання активності NOS підчас поєднаної інтоксикації пов'язане із впливом іонів фтору, оскільки нітрати мають тенденцію знижувати активність NOS [4].

Таблиця 1  
Зміни в функціонуванні циклу оксиду азоту в слизовій оболонці шлунка щурів при нітратно-фторидній інтоксикації та застосуванні суспензій лігніну гідролізного та «Карболайну».

	Інтактні тварини, n=10	Поєднана нітратно-фторидна інтоксикація, n=15	Суспензія «Карболайну», за умов нітратно-фторидної інтоксикації, n=13	Суспензія лігніну гідролізного за умов нітратно-фторидної інтоксикації, n=15
Загальна активність NOS, мкмоль/хв. на г білку	6,51±0,41	7,74±0,27*	5,34±0,25**	9,57±1,4***#
Загальна активність аргіназ, мкмоль/хв. на г білку	2,07±0,08	3,34±0,08*	5,02±0,47**	2,39±0,28***#
Загальна активність нітрат редуктаз, мкмоль/хв. на г білку	5,98±0,74	10,27±0,63*	12,14±0,87	7,18±1,07***#
Загальна активність нітрит редуктаз, мкмоль/хв. на г білку	4,32±0,69	11,3±0,48*	7,86±0,68**	15,13±1,41***#
Вміст нітритів (NO <sub>2</sub> ), нмоль/г	11,56±0,51	18,9±0,8*	3,28±0,28**	6,62±0,65***#
Пероксинітрит, мкмоль/г	0,88±0,06	1,48±0,059*	2,65±0,06**	1,71±0,11#

\* -  $p<0,05$  відносно інтактних тварин.

\*\* -  $p<0,05$  відносно поєднаної інтоксикації.

# -  $p<0,05$  відносно групи «Карболайну».

Хронічна нітратно-фторидна інтоксикація збільшує активність нітратредуктаз на 72% у порівнянні із інтактними тваринами. Суспензія сорбенту «Карболайн» не впливає на активність нітратредуктаз. Суспензія лігніну гідролізного знижує активність нітратредуктаз на 30%. Дані зміни можуть свідчити про кращу сорбційну здатність лігніну по відношенню до нітрат-іонів. Нітритредуктазна активність зростає в умовах хронічної поєднаної інтоксикації в 1,61 рази. Суспензія сорбенту «Карболайн» знижує активність нітритредуктаз на 32%. Оскільки при використанні даного сорбенту активність NOS зменшується, а активність нітратредуктаз статистично значуще не змінюється, то зниження активності нітритредуктаз може бути пов'язане із здатністю «Карболайну» поглинати нітрит-іони. Використання лігніну гідролізного збільшує активність нітритредуктаз на 34% у порівнянні із хронічною нітратно-фторидною інтоксикацією та на 97% при порівнянні із групою, що отримували суспензію сорбенту «Карболайн». Дані зміни можуть бути пов'язані, з одного боку, із меншою здатністю до поглинання нітрит-іонів лігніном, з іншого - зі збільшеною активністю NOS, яка може слугувати джерелом нітрит-іонів. Нітратредуктази не можуть слугувати джерелом нітрит-іонів за умов використання суспензії лігніну, оскільки їх активність є зниженою.

Концентрація нітрит-іонів при моделюванні хронічної поєднаної інтоксикації нітратом та фторидом натрію зростає на 63%. Використання суспензії сорбенту «Карболайн» знижує вміст нітритів в 5,8 разів, а суспензії лігніну – в 2,85 разів. При порівнянні концентрації нітритів за умов використання лігніну та сорбенту «Карболайн» було встановлено, що концентрація нітритів у слизовій оболонці щурів групи сорбенту «Карболайн» у 2,02 рази нижча. Нижча концентрація нітритів пояснюється нижчою активністю NOS та нітритредуктаз у цій групі, також слід зазначити можливість сорбенту «Карболайн» безпосередньо поглинати нітрит-іони.

Активність аргіназ при нітратно-фторидній інтоксикації зростає на 61%. Аргінази каталізують перетворення L-аргініну в L-орнітин і в подальшому в поліаміни (путресцин, спермідин). Зростання їх активності при одночасному збільшенні активності NOS може бути компенсаторною реакцією на ушкодження тканин. Суспензія сорбенту «Карболайн» збільшує активність аргіназ на 50%, що може бути пов'язане із вивільненням субстрату через зниження активності NOS. Лігнін гідролізний знижує активність аргіназ на 28%. Оскільки в умовах використання лігніну збільшується активність NOS, зниження активності аргі-

наз може бути пов'язане із конкуренцією за субстрат.

Пероксинітрит лужних та лужно-земельних металів утворюється в результаті реакції пероксинітритного аніона, утвореного із супероксидного аніон-радикалу та оксиду азоту, з солями металів ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). На відміну від своєї аніонної форми, пероксинітрити металів є більш стабільними метаболітами і мають здатність до спонтанної ізомеризації в нітрити [3]. Хронічна нітратно-фторидна інтоксикація збільшує вміст пероксинітриту на 68% у порівнянні із інтактними тваринами. Використання суспензії сорбенту «Карболайн» збільшує вміст пероксинітриту в 1,79 рази, а суспензії лігніну гідролізного достовірно не впливає на вміст пероксинітриту. Питання, чи призводить накопичення пероксинітритів металів до збільшення процесів ушкодження клітинних полімерів, потребує подальшого визначення джерел формування пероксинітритного пулу та продуктів деградації біологічних полімерів.

### Висновки

1. Суспензія сорбенту «Карболайн» більш ефективна для корекції змін в функціонуванні циклу оксиду азоту в слизовій оболонці шлунка щурів, викликаних фторидним компонентом нітратно-фторидної інтоксикації.

2. Суспензія лігніну гідролізного більш ефективна для корекції змін в функціонуванні циклу оксиду азоту в слизовій оболонці шлунка щурів, викликаних нітратним компонентом нітратно-фторидної інтоксикації.

3. Суспензія сорбенту «Карболайн» більш ефективна для попередження накопичення нітрит-іонів в організмі в умовах нітратно-фторидної інтоксикації.

### Література

1. Назаренко Е.А. Проблеми забруднення фторидами ґрунтів і вод геохімічної провінції (на прикладі Полтавської області) / Е.А. Назаренко, Ю.Б. Нікозяць, О.Д. Іващенко // Екологічна безпека. – 2014. – №1. – С. 59 – 63.
2. Стасюк О.А. Вплив сквенджерів пероксинітриту на окислювальні процеси у тканинах слинних залоз білих щурів за умов спільного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію / О.А. Стасюк, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2012. – Т. 16, - №5-6. - С.30-33.
3. Шрайбман Г.Н. Спектрофотометрические методики определения пероксинитрита и нитрита / Г.Н. Шрайбман, Е.П. Дягилева, А.В. Скибина // Вестник КемГУ. – 2011. - №45. – С.200-206.
4. 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.
5. Fina B.L. Fluoride increases superoxide production and impairs the respiratory chain in ROS 17/2.8 osteoblastic cells / B.L. Fina, M. Lombarte, J.P. Rigalli [et al.] // PLOS ONE. – 2014. – Vol. 9. – № 6. – P 1-6.
6. Lundberg J.O. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. / J.O. Lundberg, E. Weitzberg, M.T. Gladwin // Nat. Rev. Drug Discovery. – 2008. - № 7. – P.156-167.

### Реферат

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ УГЛЕРОДНЫХ СОСОРБЕНТОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ЦИКЛА ОКСИДА АЗОТА В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА КРЫС ПРИ СОЧЕТАННОЙ НИТРАТНО-ФТОРИДНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Акимов О.Е., Костенко В.А.

Ключевые слова: нитрат натрия, фторид натрия, NO-синтаза, нитратредуктаза, нитритредуктаза.

В статье рассмотрено влияние суспензий сорбента «Карболайн» и лигнина гидролизного на функционирование цикла оксида азота в слизистой оболочке желудка крыс при сочетанной нитратно-фторидной интоксикации. Опыты проведены на 53 половозрелых крысах линии «Вистар». Для моделирования нитратно-фторидной интоксикации внутрижелудочно вводили растворы нитрата и фторида натрия в дозе 500 мг / кг и 10 мг / кг соответственно. Для оценки функционального состояния цикла оксида азота определяли общую активность NO-синтаз, аргиназ, нитрат-нитритредуктаз, содержание нитритов и пероксинитрита. Установлено, что суспензия сорбента «Карболайн» более эффективна для коррекции изменений в функционировании цикла оксида азота в слизистой оболочке желудка крыс, вызванных фторидным компонентом нитратно-фторидной интоксикации. Суспензия лигнина гидролизного более эффективна для коррекции изменений в функционировании цикла оксида азота в слизистой оболочке желудка крыс, вызванных нитратным компонентом нитратно-фторидной интоксикации. Суспензия сорбента «Карболайн» более эффективна для предупреждения накопления нитрит-ионов в организме в условиях нитратно-фторидной интоксикации.

### Summary

INFLUENCE OF DIFFERENT CARBON-BASED SORBENTS ON FUNCTIONING OF NITRIC OXIDE CYCLE IN RATS GASTRIC MUCOSA UNDER COMBINED NITRATE-FLUORIDE INTOXICATION

Akimov O.Ye., Kostenko V.O.

Key words: sodium nitrate, sodium fluoride, NO-synthase, nitrate reductase, nitrite reductase.

The article deals with the influence of the suspensions of the sorbent "Carboline" and hydrolytic lignin on the functioning of the cycle of nitric oxide in gastric mucosa of rats under combined nitrate-fluoride intoxication. Experiments were conducted on 53 adult rats of Wistar line. To simulate nitrate-fluoride intoxication solutions of sodium nitrate and sodium fluoride were intragastrically administered in dose 500 mg / kg and 10 mg / kg respectively. To evaluate the functional state of the nitric oxide cycle the overall activity of NO-synthases, arginases, nitrate-nitrite reductases, nitrite content and peroxynitrite were measured. It was found out that suspension of sorbent "Carboline" is more effective for correction of changes in the operation of nitric oxide cycle in rat gastric mucosa caused by fluoride component of nitrate-fluoride intoxication. Hydrolytic lignin suspension is more effective for the correction of changes in the of nitric oxide cycle in rat gastric mucosa caused by nitrate component nitrate-fluoride intoxication. Suspension of sorbent "Carboline" is more effective for preventing the accumulation of nitrite ions in the body under nitrate-fluoride intoxication.

.УДК 576.31:616-008.851-008.9:796.15

**Баскевич О.В., Попель С.Л., Газ Ю.Р., Собєтов Б.Г.**

## **ТИПОВІ ПОРУШЕННЯ ОРГАНІЗАЦІЇ МЕМБРАНИ ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ ФІЗИЧНОМУ НАВАНТАЖЕННІ РІЗНОЇ ІНТЕНСИВНОСТІ В ПРОЦЕСІ РОЗВИТКУ ЗАГАЛЬНОЇ ВИТРИВАЛОСТІ ОРГАНІЗМУ**

Прикарпатський національний університет імені В. Стефаника, м. Івано-Франківськ

*У статті розглядаються загальні закономірності та особливості змін структури і функції мембрани еритроцитів при фізичному навантаженні різної інтенсивності. На підставі даних літератури і власних досліджень робляться висновки про існування типових молекулярних порушень мембрани еритроцитів при фізичних навантаженнях різної інтенсивності, які розвиваються при тренуванні загальної витривалості. Передбачається, що універсальність реагування циркулюючого еритроцитарного пулу на різноманітні фізичні навантаження є еволюційно закріпленою реакцією і виявляється адаптаційною перебудовою мікрорельєфу і мікроелементного складу клітин периферичної крові.*

Ключові слова: еритроцит, мембрана, фізичне навантаження, витривалість.

*Дослідження проведено згідно плану науково-дослідної роботи кафедри теорії і методики фізичної культури і спорту Прикарпатського національного університету імені В. Стефаника за темою «Структурний слід адаптації організму при гіпокнезії і фізичному навантаженні в онтогенезі», № держ. реєстрації 0111U000873.*

Витривалість організму – найважливіша фізична якість, що виявляється в спортивній діяльності та у повсякденному житті людей [12]. Вона відображає загальний рівень працездатності людини. Будучи багатofункціональною влас-

тністю людського організму, витривалість інтегрує в собі велику кількість процесів, що відбуваються на різних рівнях: від клітинного і до цілісного організму [15]. Однак, як показують результати сучасних наукових досліджень, в переваж-