

Д. А. Хміль, В. А. Костенко

## Эффективность сочетанного применения L-аргинина и ингибитора ядерного фактора κВ для коррекции последствий окислительно-нитрозирующего стресса в коже крыс при избыточном поступлении в организм нитрата натрия

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

*Ключевые слова:* окислительно-нитрозирующий стресс, L-аргинин, ядерный фактор κВ, интоксикация нитратами, кожа

Загрязнение окружающей среды неорганическими нитросоединениями в настоящее время считается глобальной экологической проблемой [1]. К числу основных источников нитратов относят органические и минеральные удобрения, а также атмосферные осадки техногенного происхождения.

Известно, что универсальный механизм действия нитратов связан с их восстановлением до нитрит-ионов, а тех, в свою очередь, до оксида азота (NO) с риском образования активных форм азота (пероксинитрита, диоксида азота и др.) [2–5].

В последние годы отмечается роль NO в физиологической регуляции функций кожи [6–8]. NO и NO-синтазы (NOS) обнаружены в ряде клеток кожи, в частности, в кератиноцитах, меланоцитах, клетках Лангерганса, фибробластах и эндотелиоцитах. На поверхности кожи NO способен образовываться неферментативно вследствие ацидификации и восстановления большого количества нитратов, содержащихся в поте, или же путем фотодекомпозиции S-нитрозотиолов и нитрит-ионов при действии ультрафиолетового излучения [9].

Выявлено, что в коже NO участвует в поддержании ее барьерно-защитных свойств и обеспечении нормального кровотока в микроциркуляторном

русле, опосредует процесс ацетилхолин-индуцированной вазодилатации, регулирует норадренергическую трансмиссию и электрическую проводимость [6, 7].

Выявление протективных эффектов NO в отношении кожи вылилось в создание различных NO-содержащих мазей, кремов, гелей и других лекарственных форм и косметических средств.

В то же время NO известен как мощный повреждающий агент, проявляющий прооксидантные и апоптотические свойства, угнетающий биоэнергетические и репаративные процессы [2–4].

Избыточное образование NO вследствие восстановления нитрат- и нитрит-ионов и гиперэкспрессии индуцибельной NOS (iNOS) в коже является важным звеном патогенеза токсических и аллергических дерматитов, поврежденной кожи при действии ионизирующего и ультрафиолетового облучения, ожогов, псориаза [8, 10–12].

Недавно выявлено, что в условиях чрезмерного поступления в организм неорганических нитратов нарушается механизм ауторегуляции уровня NO в тканях («цикл оксида азота»), что приводит к избыточной активации индуцибельной NOS (iNOS) и развитию связанного с ней окислительно-нитрозирующего стресса [2, 13]. При этом показана протективная роль конститутивных NOS.

Известно, что развитие свободнорадикальных процессов в тканях млекопитающих в значительной степени связано с действием транскрипционного ядерного фактора κВ (NF-κB) [14].

Недавно установлено, что введение ингибиторов NF-κB сопровождается повышением антиоксидантного и коллагенопротективного действия субстрата NOS и аргиназы – L-аргинина в различных органах (пародонт, слюнные железы) [15, 16].

Однако эффективность сочетанного применения L-аргинина и ингибиторов NF-κB для коррекции свободнорадикальных процессов в условиях избыточного образования оксида азота из экзогенных источников (модель хронической интоксикации нитратом натрия) остается невыясненной.

*Цель исследования* – изучить влияние сочетанного действия L-аргинина и ингибитора NF-κB – аммония пирролидиндитиокарбамата на маркеры окислительно-нитрозирующего стресса в коже белых крыс при избыточном поступлении в организм нитрата натрия.

**Материалы и методы.** Исследования были проведены на 35 белых крысах линии Вистар массой 180–220 г в 5 сериях опытов: в первой – интактные животные (контрольная серия), во второй – хроническая интоксикация нитратом натрия (30 сут), в остальных – начиная с 15 дня интоксикации крысам вводили следующие вещества (все производства Sigma-Aldrich, США): в третьей серии – L-аргинин, в четвертой – ингибитор активации NF-κB – аммония пирролидиндитиокарбамат (PDTC – ammonium pyrrolidinedithiocarbamate), в пятой – L-аргинин и PDTC.

Нитрат натрия вводили внутривенно с помощью зонда в дозе 200 мг/кг массы тела в виде водного раствора. Использование этой методики позволяет воспроизвести избыточное образование и депонирование NO в коже в виде парамагнитных комплексов с гемовым и негемовым железом [3]. PDTC и L-аргинин применяли в дозе 76 мг/кг [17] и 500 мг/кг соответственно [18], внутривенно, 3 раза в неделю.

Животных декапитировали под эфирным наркозом. Стандартные образцы кожи вырезали из области спины. Комиссией по вопросам биомедицинской этики Высшего государственного учебного заведения Украины «Украинская медицинская стоматологическая

академия» (протокол № 148 от 24 ноября 2016 г.) нарушений морально-этических норм при проведении научно-исследовательской работы не выявлено.

Активность NOS определяли по разнице концентрации нитрит-ионов до и после инкубации гомогената кожи в среде, содержащей L-аргинин (субстрат NOS) и никотинамидаденидинуклеотидфосфат восстановленный (НАДФН). Концентрацию нитрит-ионов (NO) определяли путем образования диазосоединений в реакции с сульфаниловой кислотой, а затем проводили реакцию с α-нафтилэтилендиамином, в результате которой образуются производные красного цвета (азокрасители) [13]. Концентрацию пероксинитрита в гомогенате оценивали спектрофотометрически по поглощению при длине волны 355 нм [13].

Определяли активность в тканях кожи ферментов, отражающих состояние аргиназного пути метаболизма L-аргинина: аргиназы [13] и орнитиндекарбоксилазы (ОДК) [19].

Образование супероксидного анионрадикала (САР) оценивали спектрофотометрически при проведении теста с нитросиним тетразолием в гомогенате тканей с индукторами в виде никотинамидаденидинуклеотида восстановленного (НАДН), НАДФН и липополисахарида, выделенного из микробных клеток *Salmonella typhi* (препарат «Пирогенал», фирма «Медгамал», Российская Федерация), для оценки продукции САР соответственно НАДН-зависимой (митохондриальной) и НАДФН-зависимыми (микросомальной и NOS) электронно-транспортными цепями (ЭТЦ), а также НАДФН-оксидазой лейкоцитов [20].

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях кожи оценивали по образованию в реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) окрашенного триметинового комплекса [21]. Активность антиоксидантной (АО) системы оценивали по приросту концентрации ТБК-активных продуктов за время 1,5-ч инкубации в прооксидантном железоаскорбатном буферном растворе, а также по активности АО ферментов – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы [21].

Полученные данные подвергали статистической обработке. Для проверки распределения на нормальность применяли расчет критерия Шапиро-Уилка. Если данные соответствовали нормальному распределению, то для их сравнения использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок. В случае, когда ряды данных не подпадали нормальному распределению, статистическую обработку осуществляли с использованием непараметрического метода – теста Манна-Уитни. Для множественного сравнения применяли поправку Бонферрони, а при распределении, отличающемся от нормального, – критерий Краскела-Уоллиса. Статистические расчеты проводили с использованием программ «Microsoft Excel 2007» и «StatisticSoft 6.0».

**Результаты и их обсуждение.** При введении нитрата натрия в течение 30 сут в тканях кожи увеличивается суммарная активность NOS (табл. 1) – в 2,0 раза ( $p < 0,001$ ), а концентрация пероксинитрита – на 41,8 % ( $p < 0,01$ ). При этом активность аргиназы существенно не изменяется, а ОДК – снижается на 33,1 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с данными интактной группы.

Полученные данные указывают на нарушение ауторегуляции уровня NO в тканях, направленной на предупреждение чрезмерного образования активных форм азота путем ограничения эндоген-

ного синтеза NO при поступлении в организм его экзогенного донатора [3]. Это создает предпосылки к еще большему образованию NO и его активных метаболитов, что и подтверждается увеличением в тканях кожи концентрации пероксинитрита.

Снижение активности ОДК сопровождается нарушением синтеза полиаминов с последующим расстройством клеточной пролиферации и биосинтеза белка [22].

Введение L-аргинина в условиях эксперимента существенно не влияет на суммарную активность NOS и аргиназы, а также концентрацию пероксинитрита в тканях кожи по сравнению с данными второй серии. В то же время повышает активность ОДК – на 62,6 % ( $p < 0,001$ ).

Для оценки NF-κB-зависимых процессов использовали селективный ингибитор активации этого фактора транскрипции – PDTC, действие которого связано с нарушением механизма деградации ингибиторного белка IκB-α и транслокации активированного NF-κB в ядро клетки [17].

Применение PDTC в условиях эксперимента существенно уменьшает в тканях кожи суммарную активность NOS и концентрацию пероксинитрита – соответственно на 29,3 % ( $p < 0,01$ ) и 33,1 % ( $p < 0,01$ ) по сравнению с данными второй серии. В этих условиях

Таблица 1

*Показатели нитроксидазической и аргиназной систем кожи крыс при избыточном поступлении в организм нитрата натрия и сочетанном применении L-аргинина и ингибитора активации NF-κB PDTC ( $M \pm m, n = 35$ )*

Показатель	Серия опытов				
	интактные животные	введение нитрата натрия (30 дней)			
		контроль	+ L-аргинин	+ PDTC	+ L-аргинин + PDTC
Активность NOS, мкмоль NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /г-мин	4,67 ± 0,16	9,38 ± 0,54 *	8,89 ± 0,50*	6,63 ± 0,49*/**	5,48 ± 0,39**/****
Пероксинитрит, мкмоль/г	0,98 ± 0,03	1,39 ± 0,13 *	1,25 ± 0,06*	0,93 ± 0,04**	0,73 ± 0,03*/**/****/****
Активность аргиназы, мкмоль/г-белка	1,94 ± 0,17	1,60 ± 0,13	1,61 ± 0,07	1,61 ± 0,10	2,08 ± 0,05**/****/****
Активность орнитин-декарбоксилазы, нмоль/г-мин	235,3 ± 11,9	157,4 ± 9,1 *	255,9 ± 11,8**	218,2 ± 5,0**	320,3 ± 17,3**/****

*Примечание.* Здесь и в табл. 2: \* $p < 0,05$  по сравнению с данными интактной группы, \*\* $p < 0,05$  по сравнению с данными второй серии, \*\*\* $p < 0,05$  по сравнению с данными третьей серии, \*\*\*\* $p < 0,05$  по сравнению с данными четвертой серии.

активность аргиназы существенно не изменяется, а ОДК повышается на 38,6 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с данными второй серии.

Полученные данные согласуются с тем фактом, что экспрессия гена iNOS контролируется NF- $\kappa$ B [14].

Сочетанное действие L-аргинина и PDTC в условиях эксперимента достоверно уменьшает в тканях кожи суммарную активность NOS на 41,6 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с данными второй серии и на 38,4 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с данными третьей серии. В этих условиях концентрация пероксинитрита уступает результатам второй серии на 47,5 % ( $p < 0,001$ ), третьей – на 41,6 % ( $p < 0,001$ ), четвертой – на 21,5 % ( $p < 0,01$ ).

Активность аргиназы увеличивается, причем на 30,0 % ( $p < 0,01$ ) превышает соответствующий результат второй серии, на 29,2 % ( $p < 0,001$ ) – третьей серии, на 29,2 % ( $p < 0,01$ ) – четвертой серии. Активность ОДК также превышает соответствующий результат второй серии в 2,03 раза ( $p < 0,001$ ), третьей – на 25,2 % ( $p < 0,01$ ), четвертой – на 46,8 % ( $p < 0,001$ ).

Полученные данные свидетельствуют о более активной утилизации L-аргинина в аргиназном пути, в котором образуются такие жизненно важные соединения как орнитин, цитруллин, глутамат, глутатион, полиамины и др. [22, 23].

Выявленное нами увеличение образования высокотоксичного пероксинитрита в тканях кожи при хронической интоксикации нитратом натрия, по видимому, связано, с одной стороны, с увеличением концентрации NO. С другой стороны, в тканях значительно возрастает продукция другого компонента реакции – CAP (табл. 2). Так, хроническая интоксикация нитратом натрия сопровождается увеличением продукции CAP НАДФН-зависимыми (микросомальной и NOS) и НАДН-зависимой (митохондриальной) ЭТЦ – соответственно на 42,5 % ( $p < 0,001$ ) и 57,0 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с данными интактной группы. В то же время образование CAP НАДФН-оксидазой лейкоцитов уменьшается на 31,6 % ( $p < 0,01$ ).

Известно, что NO способен связываться с металлосодержащими центра-

ми ключевых ферментов и FeS кластеров дыхательной цепи митохондрий [24], цитохром P450-зависимых оксидоредуктаз эндоплазматического ретикулула [25], принимающих участие в генерации CAP.

Угнетение продукции CAP лейкоцитами на 30 сут нитратной интоксикации может быть связано с развитием тяжелой биоэнергетической недостаточности и снижением образования АТФ в тканях кожи в этот период [3]. Ведь активация НАДФН-оксидазного комплекса требует ГТФ-связанного белка Gox, причем для регенерации ГТФ необходим АТФ [26]. Подавление выработки АФК лейкоцитами может ослаблять их функциональную активность и создавать условия для возникновения вялотекущих воспалительных процессов.

Следствием гиперпродукции CAP наиболее мощными его источниками (митохондриями и микросомами) является активация ПОЛ в тканях кожи.

Так, при воспроизведении хронической интоксикации нитратом натрия концентрация ТБК-активных соединений до и после 1,5-ч инкубации в прооксидантном буферном растворе увеличивается соответственно в 2,2 раза ( $p < 0,001$ ) и 2,17 раза ( $p < 0,001$ ) по сравнению с данными интактной группы, что свидетельствует об активации ПОЛ в тканях кожи белых крыс. Повышается прирост ТБК-реактантов за время инкубации в 2,12 раза ( $p < 0,001$ ), что указывает на истощение АО потенциала в тканях кожи. Это подтверждается снижением величин активности АО ферментов – СОД и каталазы – на 50 % ( $p < 0,001$ ).

Известно, что практически все функции кожи, которые по отношению к внешней среде могут быть определены как барьерно-защитные, в той или иной мере нарушаются при активации ПОЛ и связанной с ней биоэнергетической недостаточностью [8].

Введение L-аргинина в условиях эксперимента существенно не влияет на генерацию CAP НАДФН-зависимыми электронно-транспортными цепями в тканях кожи, однако уменьшает продукцию CAP НАДН-зависимой ЭТЦ – на 8,7 % ( $p < 0,01$ ) по сравнению с

*Маркеры окислительного стресса в тканях кожи крыс при избыточном поступлении в организм нитрата натрия и сочетанном применении L-аргинина и ингибитора активации NF-κB PDTC (M ± m, n = 35)*

Показатель	Серия опытов				
	интактные животные	введение нитрата натрия (30 дней)			
		конт-роль	+ L-аргинин	+ PDTC	+ L-аргинин + PDTC
Продукция САР, нмоль/г·с					
НАДФН-зависимыми электронно-транспортными цепями	20,18 ± 0,71	28,75 ± 0,75*	29,51 ± 0,75*	24,63 ± 0,57***	21,54 ± 0,55***/***/****
НАДН-зависимой (митохондриальной) электронно-транспортными цепями	21,61 ± 0,34	33,92 ± 0,71*	30,98 ± 0,45**	27,04 ± 0,37***	24,33 ± 0,60***/***/****
НАДФН-оксидазой лейкоцитов	0,98 ± 0,13	0,67 ± 0,05*	1,11 ± 0,04**	1,30 ± 0,06***	1,22 ± 0,05**
Концентрация ТБК-активных веществ, мкмоль/кг					
до инкубации	20,88 ± 2,73	46,05 ± 1,81*	39,66 ± 3,11*	28,67 ± 2,57**	21,67 ± 2,55***/****
после инкубации	35,41 ± 1,99	76,85 ± 0,91*	61,61 ± 2,84**	48,39 ± 1,32***	29,36 ± 1,77***/****
прирост	14,53 ± 2,24	30,8 ± 2,37*	21,94 ± 5,22	19,71 ± 2,73**	7,69 ± 1,04***/***/****
Активность СОД, ед. акт.	0,28 ± 0,03	0,14 ± 0,01*	0,21 ± 0,02**	0,25 ± 0,01**	0,32 ± 0,01***/****
Активность каталазы, мккат/г	0,14 ± 0,01	0,07 ± 0,01*	0,11 ± 0,01**	0,13 ± 0,01**	0,15 ± 0,01***/****

данными второй серии. Выработка САР НАДФН-оксидазой лейкоцитов в этих условиях увеличивается – на 65,7 % ( $p < 0,001$ ). При этом в коже снижается концентрация ТБК-активных соединений после 1,5-ч инкубации гомогената в железоаскорбатном буферном растворе – на 19,8 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с данными второй серии. Прирост концентрации ТБК-реактантов за время инкубации существенно не меняется. Активность СОД и каталазы – увеличивается соответственно на 50,0 % ( $p < 0,01$ ) и 57,1 % ( $p < 0,02$ ) по сравнению с данными второй серии.

Ранее было показано, что антиоксидантные свойства L-аргинина связаны с предотвращением разобщенного функционирования NOS с переходом послед-

ней к генерации САР [27] и уменьшением активности ксантиноксидазы и миелопероксидазы [28].

Введение ингибитора активации NF-κB PDTC в условиях избыточного поступления нитрата натрия в организм крыс существенно уменьшает в тканях кожи продукцию САР НАДФН- и НАДН-зависимыми ЭТЦ – соответственно на 14,3 % ( $p < 0,001$ ) и 20,3 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с данными второй серии. Выработка САР НАДФН-оксидазой лейкоцитов в этих условиях увеличивается на 94,0 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с данными второй серии. Концентрация ТБК-активных соединений до и после 1,5-ч инкубации гомогената кожи в железоаскорбатном буферном растворе уменьшается соответ-

венно на 37,7 % ( $p < 0,001$ ) и 37,0 % ( $p < 0,001$ ) по сравнению с данными второй серии. Прирост концентрации ТВК-реактантов за время инкубации уменьшается на 36,0 % ( $p < 0,01$ ), что свидетельствует о возрастании АО потенциала кожи. Активность СОД и каталазы в тканях кожи увеличивается соответственно на 78,6 % ( $p < 0,001$ ) и 85,7 % ( $p < 0,01$ ) по сравнению с данными второй серии.

Сочетанное действие L-аргинина и PDTC в условиях эксперимента существенно уменьшает выработку САР НАДФН-зависимыми и НАДН-зависимой (митохондриальной) ЭТЦ в тканях кожи, что соответственно на 25,1 % ( $p < 0,001$ ) и 28,3 % ( $p < 0,001$ ) уступает результатам второй серии, на 27,0 % ( $p < 0,001$ ) и 21,5 % ( $p < 0,001$ ) – третьей серии и на 12,5 % ( $p < 0,01$ ) и 10,0 % ( $p < 0,01$ ) – четвертой серии. Генерация САР НАДФН-оксидазой лейкоцитов существенно не отличается от данных третьей и четвертой серий, но, в отличие от последней, достоверно не превышает данные интактной группы.

В этих условиях существенно уменьшается концентрация ТВК-активных соединений до и после 1,5-ч инкубации гомогената в железоаскорбатном буферном растворе, которая соответственно на 52,9 % ( $p < 0,001$ ) и 61,8 % ( $p < 0,001$ ) уступает соответствующим результатам второй серии, на 45,4 % ( $p < 0,001$ ) и 52,3 % ( $p < 0,001$ ) – третьей серии. Прирост концентрации ТВК-реактантов за время инкубации уступает данным второй серии на 75,0 % ( $p < 0,001$ ), третьей серии – на 64,9 % ( $p < 0,05$ ), четвертой серии – на 61,0 % ( $p < 0,01$ ). Активность СОД и каталазы превышает соответствующие результаты второй серии в 2,28 раза ( $p < 0,001$ ) и 2,14 раза ( $p < 0,001$ ), третьей серии – на 52,4 % ( $p < 0,001$ ) и 36,4 % ( $p < 0,02$ ).

Таким образом, введение PDTC снижает NF-κB-зависимую экспрессию гена iNOS, следствием чего является увеличение утилизации L-аргинина конститутивными NOS и аргиназным метаболическим путем [15, 16]. Это обеспечивает down-регуляцию продукции САР митохондриями, эндоплазматическим рети-

кулумом и собственно NOS, ограничивает образование пероксинитрита и улучшает пролиферативные процессы.

Снижение проявлений окислительно-нитрозирующего стресса при сочетанном действии L-аргинина и PDTC позволяет предположить эффективность их применения при механических, термических, лучевых и иммунных повреждениях кожи, псориазе и т. п., сопровождающихся избыточным образованием активных форм кислорода и азота [8, 10–12]. Это нацеливает на разработку комплексных препаратов системного и местного действия, включающих L-аргинин и ингибитор NF-κB, для дерматологической практики.

### Выводы

1. 30-дневное введение в организм белых крыс нитрата натрия сопровождается в тканях кожи неадекватной реакцией NO-синтазной компоненты цикла оксида азота (ростом суммарной активности NOS), проявлениями окислительно-нитрозирующего стресса (увеличение выработки активных форм кислорода и азота – супероксидного анион-радикала НАДН- и НАДФН-зависимыми электронно-транспортными цепями, пероксинитрита, активация перекисного окисления липидов на фоне снижения антиоксидантного потенциала, активности супероксиддисмутазы и каталазы).
2. Сочетанное действие L-аргинина и селективного ингибитора ядерного фактора κB, аммония пирролидинди-тиокарбамата, в условиях хронической интоксикации нитратом натрия более эффективно ограничивает проявления окислительно-нитрозирующего стресса (ограничивает продукцию супероксидного анион-радикала НАДН- и НАДФН-зависимыми электронно-транспортными цепями, образование пероксинитрита, снижает перекисное окисление липидов), повышает активность ферментов аргиназного метаболического пути (аргиназы и орнитиндекарбоксилазы) по сравнению с изолированным применением этих веществ.

1. Бутовский Р. О. Проблемы химического загрязнения почв и грунтовых вод в странах Европейского Союза / Р. О. Бутовский // Агрехимия. – 2004. – № 3. – С. 74–81.
2. Механізми ауторегуляції утворення оксиду азоту в організмі ссавців та їх порушення при розвитку патологічних процесів / В. О. Костенко [та ін.] // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2011. – Т. 11, № 3. – С. 150–154.
3. Механізми порушення окисних процесів у тканинах при надлишковому утворенні оксиду азоту з екзогенних попередників / В. О. Костенко [та ін.] // Клін. та експ. патол. – 2004. – Т. 3, № 2 (Ч. 1). – С. 202–204.
4. Реутов В. П. Механизм антирадикальной защиты клеток и организма в целом заложен в циклической организации тех метаболических процессов, которые сопряжены с образованием свободных радикалов / В. П. Реутов // Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції : тези доповідей VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю (5–7 жовтня 2016 р.). – Харків : Вид-во НФаУ, 2016. – С. 191.
5. Lundberg J. O. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics / J. O. Lundberg, E. Weitzberg, M. T. Gladwin // Nature reviews. – 2008. – V. 7. – P. 156–167.
6. Adler B. L. Nitric oxide therapy for dermatologic disease / B. L. Adler, A. J. Friedman // Future Sci OA. – 2015. – V. 1, № 1. – Publ. FSO37.
7. Del Rosso J. Q. Spotlight on the Use of Nitric Oxide in Dermatology: What Is It? What Does It Do? Can It Become an Important Addition to the Therapeutic Armamentarium for Skin Disease? / J. Q. Del Rosso, L. H. Kircik // J. Drugs Dermatol. – 2017. – V. 16, № 1. – P. S4–S10.
8. Cals-Grierson M. M. Nitric oxide function in the skin / M. M. Cals-Grierson, A. D. Ormerod // Nitric Oxide. – 2004. – V. 10, № 4. – P. 179–193.
9. Suschek C. Nonenzymatic nitric oxide formation during UVA irradiation of human skin: experimental setups and ways to measure / C. V. Suschek, A. Paunel, V. Kolb-Bachofen // Methods Enzymol. – 2005. – V. 396. – P. 568–578.
10. Смирнова И. Ю. Роль оксида азота в развитии заболеваний кожи / И. Ю. Смирнова, Л. М. Огородова, И. А. Деев // Вопросы современной педиатрии. – 2009. – Т. 8, № 4. – С. 91–93.
11. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormones of iNOS origin play important roles in the allergic reactions of atopic dermatitis in mice / K. Orita, K. Hiramoto, H. Kobayashi [et al.] // Exp. Dermatol. – 2011. – V. 20, № 11. – P. 911–914.
12. Expression of iNOS and HIF-1 $\alpha$  with angiogenesis in affected skin biopsies from patients with psoriasis / Y. Li, G. Zhang, R. Xiao [et al.] // Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. – 2010. – V. 35, № 9. – P. 952–957.
13. 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. – V. 88, № 6. – P. 70–75.
14. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation / L. Tornatore, A. K. Thotakura, J. Bennett [et al.] // Trends Cell Biol. – 2012. – V. 22, № 11. – P. 557–566.
15. Ляшенко Л. І. NF- $\kappa$ B-опосередкований вплив NO-синтаз на вільнорадикальні процеси у тканинах пародонта за умов експериментального метаболічного синдрому / Л. І. Ляшенко, В. О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2014. – Т. 14, № 2. – С. 140–143.
16. Нагорняк І. В. Ефективність поєднаного застосування L-аргініну та інгібітора ядерного фактора  $\kappa$ B для корекції вільнорадикальних процесів і функцій слинних залоз щурів за умов дії метилового ефіру метакрилової кислоти / І. В. Нагорняк, В. О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2015. – Т. 15, № 3, ч. 1. – С. 221–225.
17. Effect of ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) on NF- $\kappa$ B activation and CYP2E1 content of rats with immunological liver injury / J. D. Qin, Z. H. Cao, X. F. Li [et al.] // Pharm Biol. – 2014. – V. 52, № 11. – P. 1460–1466.
18. Роль NO-синтаз у механізмах порушень вільнорадикальних процесів у тканинах пародонта і слинних залоз щурів за умов експериментального метаболічного синдрому / Л. І. Ляшенко, А. М. Єлінська, В. В. Талаш, В. О. Костенко // Світ медицини та біології. – 2014. – № 2. – С. 139–142.
19. Храмов В. А. Простой метод определения активности орнитиндекарбоксилазы в смешанной слюне человека / В. А. Храмов. // Клин. лаборат. диагн. – 1997. – № 4. – С. 14–15.
20. 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.
21. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / [Л. В. Беркало, О. В. Бобович, Н. О. Боброва та ін.] ; за ред. І. П. Кайдашева. – Полтава, 2003. – 320 с.
22. Moinard C. Polyamines: metabolism and implications in human diseases / C. Moinard, L. Cynober, J. P. de Bandt // Clin Nutr. – 2005. – V. 24, № 2. – P. 184–197.
23. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease / G. Wu, F. W. Bazer, T. A. Davis [et al.] // Amino Acids. – 2009. – V. 37, № 1. – P. 153–168.

24. Nitric Oxide: Biology and Pathobiology / L. J. Ignarro ed. – [2nd ed.]. – Burlington etc. : Academic Press, Elsevier Inc., 2010. – 845 p.
25. Im S. C. The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b(5) / S. C. Im, L. Waskell // Arch. Biochem. Biophys. – 2011. – V. 507, № 1. – P. 144–153.
26. Hordijk P. L. Regulation of НАДФН oxidases: the role of Rac proteins / P. L. Hordijk // Circ. Res. – 2006. – V. 98, № 4. – P. 453–462.
27. Lorin J. Arginine and nitric oxide synthase: regulatory mechanisms and cardiovascular aspects / J. Lorin, M. Zeller, J. C. Guillard // Mol. Nutr. Food Res. – 2014. – V. 58, № 1. – P. 101–116.
28. Protective effects of L-arginine on pulmonary oxidative stress and antioxidant defenses during exhaustive exercise in rats / W. T. Lin, S. C. Yang, K. T. Chen [et al.] // Acta Pharmacol. Sin. – 2005. – V. 26, № 8. – P. 992–999.

**Д. А. Хмиль, В. А. Костенко**

### **Эффективность сочетанного применения L-аргинина и ингибитора ядерного фактора κВ для коррекции последствий окислительно-нитрозирующего стресса в коже крыс при избыточном поступлении в организм нитрата натрия**

*Цель исследования* – изучить влияние сочетанного действия L-аргинина и ингибитора NF-κB – аммония пирролидиндитиокарбамата (PDTC) на маркеры окислительно-нитрозирующего стресса в коже при избыточном поступлении в организм нитрата натрия.

Исследования были проведены на 35 белых крысах линии Вистар. Оценивали активность NO-синтазы (NOS), аргиназы, орнитиндекарбоксилазы (ОДК), продукцию пероксинитрита, супероксидного анион-радикала (САР), образование вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы и каталазы).

Выявлено, что 30-дневное введение нитрата натрия (200 мг/кг/сут) сопровождается в тканях кожи неадекватной реакцией NO-синтазной компоненты цикла оксида азота (ростом суммарной активности NOS), проявлениями окислительно-нитрозирующего стресса (увеличение выработки САР и пероксинитрита, активация ПОЛ на фоне снижения антиоксидантного потенциала, активности супероксиддисмутазы и каталазы). Сочетанное введение L-аргинина и PDTC в дозе соответственно 500 и 76 мг/кг (3 раза в неделю, начиная с 15 дня нитратной интоксикации) в большей степени, чем каждое из веществ в отдельности ограничивает продукцию САР НАДН- и НАДФН-зависимыми электронно-транспортными цепями, образование пероксинитрита, снижает ПОЛ, повышает активность аргиназы и ОДК.

Таким образом, сочетанное действие L-аргинина и селективного ингибитора NF-κB PDTC в условиях нитратной интоксикации более эффективно по сравнению с применением этих веществ в отдельности ограничивает проявления окислительно-нитрозирующего стресса в коже.

*Ключевые слова:* окислительно-нитрозирующий стресс, L-аргинин, ядерный фактор κB, интоксикация нитратами, кожа

**Д. О. Хміль, В. О. Костенко**

### **Ефективність поєднаного застосування L-аргініну й інгібітора ядерного фактора κВ для корекції наслідків окисно-нітрозуючого стресу в шкірі щурів за надлишкового надходження в організм нітрату натрію**

*Мета дослідження* – вивчити вплив поєднаної дії L-аргініну та інгібітора NF-κB – амонію піролідиндитиокарбамату (PDTC) на маркери окисно-нітрозуючого стресу в шкірі за надмірного надходження в організм нітрату натрію.

Дослідження були проведені на 35 білих щурах лінії Вістар. Оцінювали активність NO-синтази (NOS), аргінази, орнітиндекарбоксилази (ОДК), продукцію пероксинітриту, супероксидного аніон-радикала (САР), утворення вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), активність антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутазу та каталазу).

Виявлено, що 30-денне введення нітрату натрію (200 мг/кг/доба) супроводжується в тканинах шкіри неадекватною реакцією NO-синтазної компоненти циклу оксиду азоту (зростання сумарної активності NOS), проявами окисно-нітрозуючого стресу (збільшення вироблення САР і пероксинітриту, активація ПОЛ на тлі зниження антиоксидантного потенціалу, активності супероксиддисмутазу та каталазу). Поєднане введення L-аргініну і PDTC у дозі 500 і 76 мг/кг відповідно (3 рази на тиждень, починаючи з 15 дня нітратної інтоксикації) у більшій мірі порівняно зі застосуванням речовин окремо обмежує продукцію САР НАДН- і НАДФН-залежними електронно-транспортними ланцюгами, утворення пероксинітриту, знижує ПОЛ, підвищує активність аргінази і ОДК.

Таким чином, поєднана дія L-аргініну та селективного інгібітора NF-κB PDTC за умов нітратної інтоксикації більш ефективно, ніж кожна з речовин окремо обмежує прояви окисно-нітрозуючого стресу в шкірі.

*Ключові слова:* окисно-нітрозуючий стрес, L-аргінін, ядерний фактор κB, інтоксикація нітратами, шкіра

---

---

**D. A. Khmil, V. A. Kostenko**

**Efficiency of combined administration of L-arginin and nuclear factor  $\kappa$ B inhibitor in correction the consequences of oxidative/nitrative stress in skin of rats under excessive sodium nitrate intake**

*The aim of study* was to investigate the effects produced by combined action of L-arginine and ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), NF- $\kappa$ B inhibitor, on the markers of oxidative/nitrative stress in the skin under excess intake of sodium nitrate.

Studies were performed on 35 white Wistar rats. There were assessed the activities of NO synthase (NOS), arginase, ornithine decarboxylase (ODC), production of peroxynitrite, superoxide anion radical (SAR), formation of secondary products of lipid peroxidation (LPO), activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in the skin homogenate.

It has been found out that 30-day administration of sodium nitrate (200 mg/kg/day) is accompanied by the following changes in the skin tissues: inadequate reaction of NOS component of NO cycle (increase in total NOS activity); manifestations of oxidative / nitrative stress (increased production of SAR and peroxynitrite; activation of LPO against the background of decreased antioxidant potential; activities of superoxide dismutase and catalase). It has been shown that the combined administration of L-arginine and PDTC 500 and 76 mg (3 times a week, starting from the 15<sup>th</sup> day of nitrate intoxication) demonstrated much more pronounced effects compared with separate administration in limiting the SAR generation by NADH- and NADPH-dependent electron transport chains, reducing peroxynitrite production as well as in suppressing LPO, in the increase in arginase and ODC activities.

Thus, the combined effect of L-arginine and PDTC as a selective NF- $\kappa$ B inhibitor under nitrate intoxication is more effective than separated use each of these substances. Their combined administration limits the manifestations of oxidative / nitrative stress in the skin.

*Key words:* oxidative/nitrative stress, L-arginine, nuclear factor  $\kappa$ B, nitrate intoxication, skin

---

*Надійшла: 19 квітня 2017 р.*

**Контактна особа:** Хміль Дмитро Олександрович, викладач, кафедра експериментальної та клінічної фармакології з клінічною імунологією та алергологією, ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», буд. 23, вул. Шевченка, м. Полтава, 36011. Тел.: + 38 0 532 56 20 59. Електронна пошта: 65723drums@gmail.com