

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

БОНДАРЕНКО ВАЛЕРІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 612.015.39+546.174

**ЗМІНИ ЕНЕРГЕТИЧНОГО МЕТАБОЛІЗМУ, ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕННЯ
ЛІПІДІВ В СЛИННИХ ЗАЛОЗАХ ПРИ УТВОРЕННІ
НАДЛИШКОВОЇ КІЛЬКОСТІ ОКСИДУ АЗОТУ
З ЕКЗОГЕННИХ ТА ЕНДОГЕННИХ ПОПЕРЕДНИКІВ**

14.03.04- патологічна фізіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Київ – 2001

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі патологічної фізіології Української медичної стоматологічної академії (м. Полтава), Міністерство охорони здоров'я України.

Науковий керівник:

кандидат медичних наук, доцент

Костенко Алла Геннадіївна,

завідуюча курсом патологічної фізіології

Української медичної стоматологічної академії

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор

СЕРЕДЕНКО Михайло Михайлович,

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

завідувач відділу по вивченню гіпоксичних станів

доктор медичних наук, професор

КУЛЬЧИЦЬКИЙ Олег Костянтинович

Інститут геронтології АМН України

завідувач лабораторії регуляції метаболізму.

Провідна установа: Одеський державний медичний університет ім. М.І. Пірогова, кафедра патологічної фізіології

Захист відбудеться “5” лютого 2002 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01. при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01204, м. Київ, вул. Богомольця 4.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України за адресою: 01204, м. Київ, вул. Богомольця 4.

Автореферат розісланий “26” грудня 2001р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

доктор біологічних наук

Сорокіна-Маріна З.О.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Тканини слинних залоз (СЗ) реагують на більшість змін в організмі людини, як при фізіологічних, так і при патологічних станах. Усі відхилення в морфологічній структурі та функціонуванні СЗ в цілому досліджуються як атрофії або гіпертрофії (Мітченко, 1996). Встановлено, що оксид азоту є важливим біорегулятором. При надлишковому надходженні, NO порушує функціональну активність залізо-мідьвмісних біополімерів, утворює в реакції з активними формами кисню потужний прооксидант пероксинітрит. Накопичення NO впливає на активацію перекисного окислення, пригнічує енергетичний обмін, обумовлює розвиток гемічної гіпоксії (Середенко, 1996; Реутов, 2000; Каштанов и др. 2000). Оксид азоту є одним із продуктів метаболізму нітратів та нітритів (Ажипа, 1990; Ванін, 1995).

Патологічні зміни в СЗ при надлишковому утворенні NO на фоні хронічної інтоксикації нітратом натрію вивчено недостатньо. Недослідженими залишаються механізми пошкодження слинних залоз в умовах надмірного утворення “депо” оксиду азоту – динітрозильних комплексів заліза (ДНКЗ) при надлишковому надходженні нітратів з питною водою (Костенко, Глебова, 1996; Ванін, 2000). При запаленні утворюється додаткове джерело утворення NO в результаті підвищення активності індукцйбельної NO-синтази (Викторов, 2000; Малышев и соавт., 2000). Недостатньо вивчений сукупний ефект NO, який утворюється з екзогенних попередників та *de novo* при різних патологічних станах організму ссавців.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідної роботи Української медичної стоматологічної академії (м.Полтава): “Патогенез порушень метаболізму при надлишковому утворенні оксиду азоту з ендогенних та екзогенних попередників” (№ держреєстрації 0101U007611).

Мета і задачі дослідження. Метою дослідження є розкриття механізмів дії оксиду азоту, що утворюється з екзогенних (хронічна інтоксикація нітратом натрію) та ендогенних (при запаленні) попередників на енергетичний метаболізм, перекисне окислення ліпідів, антиоксидантну систему, активність ферменту α -амілази в слинних залоз білих щурів.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі задачі дослідження:

1. Визначити рівень накопичення оксиду азоту в вигляді динітрозильних комплексів заліза (ДНКЗ) в тканинах слинних залоз білих щурів за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію, при відтворенні експериментального сіалоаденіту.

2. З'ясувати в динаміці вплив хронічної нітратної інтоксикації на зміни вмісту та співвідношення аденіннуклеотидів, стану мітохондріального окислення і фосфорилювання, рівня продукції супероксидного аніон-радикалу, процесів вільнорадикального окислення ліпідів та антиоксидантного захисту, секреторної функції в тканинах слинних залоз білих щурів.

3. З'ясувати накопичення динітрозильних комплексів заліза в тканинах слинних залоз та утворення метгемоглобіну (MetHb) в крові при відтворенні карагенінового запалення на фоні хронічної нітратної інтоксикації.

4. Визначити вплив гіпербаричної оксигенації (ГБО) на попередження порушень енергетичного метаболізму, активність ферментів АО захисту, α -амілази, процесів перекисного окислення ліпідів, накопичення та вмісту динітрозильних комплексів заліза в тканинах слинних залоз, утворення метгемоглобіну в крові при відтворенні карагенінового запалення на фоні хронічної інтоксикації нітратом натрію.

5. Визначити вплив церулоплазміну на динаміку порушення енергетичного метаболізму, активність ферментів антиоксидантного захисту, процеси перекисного окислення ліпідів, активність ферменту α -амілази, накопичення динітрозильних комплексів заліза в тканинах СЗ, утворення метгемоглобіну в крові при відтворенні карагенінового запалення на фоні хронічної нітратної інтоксикації.

6. Визначити комплексний вплив гіпербаричної оксигенації та церулоплазміну на динаміку змін енергетичного метаболізму, активність ферментів антиоксидантного захисту, процеси перекисного окислення ліпідів, активність ферменту α -амілази, накопичення та вміст динітрозильних комплексів заліза в тканинах слинних залоз, утворення метгемоглобіну в крові при відтворенні карагенінового запалення на фоні хронічної інтоксикації нітратом натрію.

Об'єкт дослідження. Механізм патогенної дії оксиду азоту (NO) на організм ссавців.

Предмет дослідження. Механізми патогенного впливу надлишкової кількості оксиду азоту, що утворюється з ендогенних, екзогенних попередників, на енергетичний метаболізм, процеси антиоксидантного захисту, перекисне окислення ліпідів, функціональну активність в тканинах слинних залоз.

Методи дослідження. Вміст NO визначали за рівнем утворення ДНКЗ методом ЕПР-радіоспектрометрії, стан енергетичного метаболізму оцінювали за вмістом аденіннуклеотидів хемілюмінісцентним та ензиматичними методами.

Функціональний стан мітохондрій визначали полярографічним методом за Chance та Williams.

Результати експериментальних даних оброблено варіаційно статистичним методом з використанням критерію Ст'юдента-Фішера, розрахунки проведені за спеціально розробленою програмою на комп'ютері IBM PC AT-486.

Наукова новизна роботи. Вперше було проведено комплексне вивчення в динаміці змін показників енергетичного метаболізму, процесів перекисного окислення ліпідів та активність ферментів антиоксидантного захисту, накопичення вмісту динітрозильних комплексів заліза в тканинах слинних залоз та утворення метгемоглобіну в крові, активність ферменту α -амілази при відтворенні карагенінового запалення на фоні хронічної нітратної інтоксикації.

Вперше було виявлено, що при утворенні надмірної кількості NO із екзогенних попередників (при моделюванні хронічної нітратної інтоксикації) відзначаються істотні зміни енергетичного метаболізму (зниження енергетичного потенціалу, порушення мітохондріального дихання, роз'єднання окислення та фосфорилування АДФ), вільнорадикального окислення (підвищення утворення $\cdot\text{O}_2$ - в мітохондріальному електронно-транспортному ланцюгу, підвищення активності ПОЛ, зниження антиоксидантного захисту) та секреторної функції слинних залоз.

Вперше було виявлено, що утворення NO de novo при експериментальному сіалоаденіті супроводжувалось порушенням енергетичного метаболізму, активності ферментів антиоксидантного захисту, α -амілази, підвищення процесів вільнорадикального окислення, в тканинах слинних залоз білих щурів та зростання вмісту динітрозильних комплексів заліза.

Вперше виявлено зростання тяжкості порушення енергетичного обміну та вільнорадикального окислення в тканинах слинних залоз при одночасному утворенні NO з ендогенних, та екзогенних попередників (адитивний ефект оксиду азоту різного походження).

Вперше було виявлено комплексний вплив церулоплазміну та гіпербаричної оксигенації на попередження глибоких порушень енергетичного обміну, активності ферментів антиоксидантного захисту і процесів перекисного окислення ліпідів в тканинах слинних залоз білих щурів та зростання вмісту динітрозильних комплексів заліза, корекцію активності фермента α -амілази.

Встановлено вплив церулоплазміну та гіпербаричної оксигенації на попередження глибоких порушень енергетичного обміну, активності ферментів антиоксидантного захисту і процесів перекисного окислення ліпідів в тканинах слинних залоз білих щурів та зростання вмісту динітрозильних комплексів заліза, корекцію активності ферменту α -амілази при карагеніновому запаленні на фоні хронічної нітратної інтоксикації.

Практичне значення роботи. З'ясована ефективність застосування ГБО в комплексі з церулоплазміном і їх вплив на енергетичний метаболізм, активність ферментів АО-захисту, α -амілази, та процеси ПОЛ. Результати дисертаційної роботи впроваджено в навчальний процес на кафедрах патологічної фізіології, біохімії, фармакології, хірургічної, ортопедичної, терапевтичної стоматології Української медичної стоматологічної академії (м.Полтава)

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота виконана самостійно. Здобувач самостійно виконав лабораторні дослідження тканин СЗ білих щурів на фоні хронічної нітратної інтоксикації та застосування ГБО в комплексі з церулоплазміном. Провів підбір літературних джерел, статистичну обробку матеріалу одержаних даних і сформулював висновки. Оформлення дисертації та автореферату автором виконано самостійно.

Апробація результатів дисертації. На апробацію подаються матеріали дисертації, які обговорювалися на XV з'їзді Українського фізіологічного товариства (м.Донецьк, 1998 р.); на пленумі товариства патофізіологів України (м. Чернівці, 1998); на Міжнародній конференції "Гіпоксія: де-

структивна та конструктивна дія” (м. Київ, 1998 р.); на III національному з’їзді патофізіологів України (Одеса – 2000 р.); на I з’їзді токсикологів України (Київ, 2001 року).

Публікації. Результати дисертації опубліковані в 7 статтях (5 без співавторів, 2 в закордонних фахових наукових виданнях, 4 роботи опубліковано у вигляді тез наукових конгресів і конференцій).

Обсяг і структура дисертації. Робота викладена на 151 сторінці друкованого тексту, містить 8 розділів, 61 таблиці, 1 малюнок, складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку літератури, який містить 316 джерел з них 187 кирилицею та 129 латиницею.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Досліди були проведені на 320 лабораторних білих щурах лінії Вістар, самцях, масою 175-225 г. Тваринам вводили нітрат натрію в дозі 200 мг/кг маси тіла на добу за допомогою спеціального зонду інтрагастрально у вигляді водного розчину. Дослідження були проведені в 9-ти серіях дослідів, в кожній із яких проводили комплексне дослідження необхідних показників. Перша серія-інтактні тварини. Друга серія: інтоксикацію проводили протягом 14, 30, 60 та 90 діб. Третя серія-моделювання сіалоаденіту проводили шляхом введення карагеніну в тканини слинних залоз на фоні хронічної нітратної інтоксикації після 90-добової інтоксикації. Четверта серія-застосування ГБО після 14, 30, 60 та 90-добової інтоксикації. П’ята серія-введення церулоплазміну після 14, 30, 60 та 90-добової інтоксикації нітратом натрію. Шоста серія-застосування ГБО при карагеніновому сіалоаденіті після 90-то добової інтоксикації нітратом натрію. Сьома серія – введення церулоплазміну при карагеніновому запаленні після 90-добового отруєння нітратом натрію. Восьма серія-застосування ГБО та церулоплазміну після 14, 30, 60, 90-добової інтоксикації нітратом натрію. Дев’ята серія – застосування ГБО та церулоплазміну при карагеніновому запаленні після 90-добової інтоксикації нітратом натрію. Сеанс ГБО проводили в барокамері об’ємом 3 л, де створювали надмірний тиск кисню 1519 гПа=1,5атм (ГОСТ 5583 50), для поглинання вуглекислого газу в барокамері розміщували натронне вапно (НИ-868, ГОСТ4455-48) та активоване вугілля (04 марка “Б”, ГОСТ 4453) з розрахунку 4 г на 1 кг маси тварини. Вентиляцію камери проводили протягом 4-5 хв. Компресію проводили за розробленою схемою 2 рази на тиждень(Костенко, 1982). В четвертій серії-після 14, 30, 60-добової інтоксикації по 45 хв.; після 90-добової інтоксикації-по 60 хв. В шостій серії протягом 60 хв. після 90-добової інтоксикації. Восьма серія-застосовували ГБО з внутрішньочеревним введенням церулоплазміну – після 14, 30, 60, по 45 хв., та 90-добової інтоксикації по 60 хв. Церулоплазмін вводили за 10 хв. до сеансу ГБО.

Методика введення розчину церулоплазміну. Церулоплазмін розводили в 1 мл фізіологічного розчину і вводили в черевну порожнину в дозі 20 мг /кг маси тіла тварин (Почерняєва, 1997) за 10 хв. до сеансу ГБО, в п’ятій серії дослідів – після 14, 30, 60, 90-добової інтоксикації. В сьомій серії

досліді при карагеніновому запаленні після 90-добової інтоксикації. Восьма серія – застосування ГБО та церулоплазміну після 14, 30, 60, 90-добової інтоксикації. Дев'ята серія – застосування ГБО та церулоплазміну при карагеніновому сіалоаденіті після 90-то добової інтоксикації на фоні хронічної нітратної інтоксикації. Експериментальний сіалоаденіт відтворювали шляхом введення 1 мл 0,2 % водяної суспензії карагеніну вводили в тканини біля слинних залоз (Саяпіна, Рибалов, Цебржинський, 1996).

Біохімічні методи дослідження. *Визначення показників тканинного дихання і окисного фосфорилування.* Тканинне дихання і окисне фосфорилування досліджували за методикою Chance і Williams, (1955) на полярографі LP-7E при допомозі закритого платинового електрода Кларка розраховували швидкість мітохондріального дихання в метаболічних станах 3 та 4 за Чансом. Розрахунок дихального контролю (ДК)-за відношенням швидкості фосфорилуючого дихання до швидкості контролюючого дихання ($DK=V3/V4$), коефіцієнту ефективності фосфорилування АДФ/0-за відношенням кількості АДФ до кількості кисню, що поглинається за період фосфорилування АДФ.

Дослідження аденіннуклеотидів. Концентрацію аденозинтрифосфornoї кислоти (АТФ) визначали за допомогою хемолюмінометра БХЛ-06 з використанням біоломінесцентного АТФ-реагента “Іммолюм” на основі іммобілізованої люциферази світляків за методичними рекомендаціями Толстих та співавт (1991). Вміст аденозиндифосфату (АДФ) та аденозинмонофосфату (АМФ) визначали за методом Jaworek, Gruber and Bermeyer (1974). Оптичну щільність проби вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 (довжина хвилі 340 нм). Енергетичний потенціал розраховували за формулою D.E. Atkinson (1968):

$$\frac{ATP + \frac{1}{2} ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

Визначення неорганічного фосфату. Вміст неорганічного фосфату (Фн) визначали за методом, що наведений у Кочетова (1980).

Визначення вмісту динітрозильних комплексів заліза в тканинах слинних залоз методом ЕПР-спектрометрії Спектр ЕПР динітрозильних комплексів заліза реєстрували за допомогою радіоспектрометра АЕ-4700 ($g=2,03$) в зразках тканин, охолоджених до температури 77 К (Варич и соавт., 1977).

Визначення метгемоглобіну в крові: проводили за методом Drabkin у модифікації Кушаковського (1968), основу якого складає вимірювання концентрації речовин, що забарвлюють кров, шляхом перетворення метгемоглобіну та його важливих дериватів за участю ацетонциангідрину в ціанметгемоглобін. Фотометрування проводили на СФ-46 (при довжині хвилі 540-545 нм).

Визначення активності α -амілази в тканинах слинних залоз проводили за методикою Леонтєва, Петрович (1976).

Визначення активності цитохромоксидази. Активність термінального ферменту дихального ланцюга – цитохромоксидази (ЦХО) в тканинах слинних залоз визначали за методом Straus (1954).

Рівень накопичення ПОЛ. В тканинах слинних залоз визначали за кількістю накопичення малонового диальдегіду забарвленого триметиновим комплексом в реакції тіобарбітурової кислоти за методикою Владімірова та Арчакова (1972).

Показники АО-захисту. Визначали за приростом концентрації малонового диальдегіду в за-лізо аскорбатному буферному розчині та активності антиоксидантних ферментів супероксиддис-мутази (СОД) за методикою Брусова і співавт.(1976), каталази – Архипової (1980).

Результати досліджень та їх обговорення

При моделюванні хронічної нітратної інтоксикації рівень ДНКЗ достовірно збільшувався після 30, 60, 90-добового отруєння на 39,2%, 51,6%, 68,2%, що свідчить про утворення надлишкової кі-лькості оксиду азоту. Підвищення рівня NO, супроводжує порушення і біоенергетичних процесів в тканинах слинних залоз (табл.1).

Після 14-добового отруєння ми відмічали зміни енергетичного метаболізму в тканинах слинних залоз: концентрація АТФ достовірно підвищувалася на 31,8%, АМФ достовірно знижувався на 38,3%, Фн – на 35,4%, відповідно до інтактних тварин. При більш довготривалому отруєнні нітра-том натрію відмічалось достовірне зниження процесів енергоутворення відповідно до інтактних тварин: АТФ після 30, 60-днів відповідно на 17,1%, та 36,4%. При введенні нітрату натрію протягом 60-днів відбувалось достовірне зниження суми аденіннуклеотидів – на 18,9%, енергетичного потен-ціалу – на 14,5%. Це, очевидно, пов'язано з інтенсивним розпадом макроергічних сполук тому, що при цьому збільшується концентрація АМФ на 4,6%, Фн – 39,3%. При запаленні в тканинах СЗ порушується енергетичний метаболізм, достовірно знижується відносно до тварин, в яких не від-творювали запалення концентрація АТФ на 21,2%, ЕП – 16,9,2%. Також достовірно підвищується АМФ на 48,9%, Фн – 22,5%. При введенні щурам нітрату натрію протягом 90-днів ми відмічаємо зниження АТФ на 44,2%, АДФ – 14,4%, ЕП – 18,5%, концентрація АМФ збільшилась на 51,5%, Фн – 49,8% відносно до інтактної групи.

Таблиця 1

Зміни вмісту аденіннуклеатидів та неорганічного фосфору в тканинах слинних залоз при хронічній нітратній інтоксикації

Показники дослідження	Статис-тичні показ-ники	Інтактні тварини	Після введення нітрату натрію протягом			
			14 дів	30 дів	60 дів	90 дів

АТФ, мкмоль/г	M± m p1	2,17±0,13	2,86±0,18 <0,001	1,80±0,11 <0,005	1,38±0,08 <0,001	1,21±0,07 <0,001
АДФ, мкмоль/г	M±m p1	1,32±0,07	1,45±0,08	1,25±0,07	1,16±0,06	1,13±0,06 <0,05
АМФ, мкмоль/г	M±m p1	0,47±0,06	0,29±0,04 <0,02	0,56±0,07	0,67±0,08 <0,05	0,71±0,09 <0,05
Фн, мкмоль/г	M±m p1	6,28±0,39	4,06±0,26 <0,001	7,39±0,47	8,75±0,55 <0,001	9,41±0,58 <0,001
Сума адени- нуклеотидів, мкмоль/г	M±m p1	3,96±0,24	4,60±0,29	3,61±0,22	3,21±0,19 <0,02	3,05±0,17 <0,01
ЕП	M±m p1	0,715±0,044	0,779±0,05	0,672±0,04	0,611±0,03 <0,05	0,582±0,034 <0,05

Примітка: Тут і далі в таблицях приведено імовірність помилки P1 тільки для достовірних даних порівняно з інтактними тваринами.

Наведені результати підтверджуються даними дослідження процесів тканинного дихання та окисного фосфорилування полярографічним методом (табл.2). Так при введенні нітрату натрію щурам протягом 14-днів відзначається збільшення фосфорилуючого дихання (V3) на 27,6%. Після більш довготривалого отруєння відмічаємо достовірне зниження відносно до інтактних тварин: V3 після 30, 60, 90-добового отруєння відповідно на 21,1%, 43,9%, 53,3%. З боку показників V4, що характеризують тканинне дихання в умовах присутності кисню та субстратів, але з відсутністю АДФ, ми відмічаємо достовірне зниження: після 90-добової інтоксикації на 16,0%. При цьому, дихальний контроль після 60, 90-добового отруєння зменшується відносно інтактних тварин на 36,6%, 44,4%; АДФ/О після – 14, 30, 60, 90-добового отруєння на 15,2%, 25,0%, 31,1%, 37,8%. Активність цитохромоксидази (ЦХО) зменшується після 30, 60, 90-добового отруєння відповідно на 11,9%, 17,9%, 22,4%. Запалення достовірно знижує такі показники: швидкість фосфорилуючого дихання V3-62,3%, V4-18,0%, дихального контролю на 54,0%, ЦХО – 26,4%, АДФ/0 – 41,5%. Це пов'язано з порушенням аеробних та фізико-хімічних процесів у місцях запалення (Маянський, 1991).

Таблиця 2

Зміни показників дихання та окисного фосфорилування мітохондрій слинних залоз білих щурів при хронічній нітратній інтоксикації

Показники дослідження	Статистичні показники	Інтактні тварини	введення нітрату натрію протягом			
			14 діб	30 діб	60діб	90 діб
V3, натом О/хв. х мг	M±m P1	22,4±1,30	27,6±2,96 <0,01	17,67±1,04 <0,01	12,56±0,72 <0,001	10,47±0,60 <0,001
V4, натом О/хв. х мг	M±m P1	18,06±1,07	18,56±1,08	17,16±1,02	15,90±0,89	15,17±0,86 <0,05
Дихальний контроль	M± P1	1,24±0,13	1,54±0,16	1,03±0,11	0,79±0,08 <0,01	0,69±0,07 <0,001
АДФ/О, АДФ мкмоль/г О натом	M±m P1	1,64±0,07	1,39±0,06 <0,01	1,23±0,05 <0,001	1,13±0,05 <0,001	1,02±0,04 <0,001
ЦХО од.акт.	M±m P1	16,64±0,65	15,35±0,60	14,66±0,58 <0,05	13,66±0,53 <0,01	12,91±0,50 <0,01

Після 14-добового введення тваринам нітрату натрію відмічається незмінність активності α -амілази. При більш довготривалому надходженні нітрату натрію в організм відмічається достовірне зниження активності α -амілази: після 60, 90-добового отруєння відповідно – 14,5%, 17,7%. При розвитку запалення достовірно знижується активність α -амілази (на 28,2%) на фоні хронічної нітратної інтоксикації. Таким чином, дані наших досліджень свідчать про те, що в патогенезі дії нітрату натрію та карагенінового запалення на слинні залози важливу роль відіграє пошкодження внутрішньої мембрани мітохондрій, пригнічення активності ферменту цитохромоксидази, що призводить до втрати необхідного значення трансмембранного градієнту електрхімічних потенціалів (μH^+), в результаті чого окисне фосфорилування не супроводжується синтезом достатньої кількості АТФ (Скулачєв, 1989; Дмитриєв, Иванова, Иванов, 1990). Ми відмічаємо, також, залежність активності біоенергетичних процесів та функціональних показників, яким і є активність α -амілази. На основі нашого дослідження, ми відмічаємо, що при довготривалому надходженні нітрату натрію в організмі знижується активність α -амілази в тканинах слинних залоз. Нітрати порушують енергетичні процеси в тканинах СЗ, відомо, що утворення α -амілази в це – енергоза-

лежний процес, тому пригнічення енергетичного обміну в тканинах супроводжується зниженням біосинтезу α -амілази. Порушення біоенергетичних процесів при надлишковому утворенні NO, очевидно, пов'язано з пригніченням активності ферментів, що мають в активному центрі іони міді та заліза: цитохромів, НАДФ-убіхінонредуктази, аконітази (Fibs et al., 1987; Vatina, Saint-Blanquat, 1990; Реутов, Сорокина, 1996). Встановлено, що порушення процесів антиоксидантного захисту та процесів перекисного окислення ліпідів при хронічній інтоксикації нітратом натрію призводить до підвищення концентрація МДА, яка після 30-добової інтоксикації збільшується на 308,6% до інкубації, 295,2% після інкубації. Після 60-добової інтоксикації збільшення на 643,2% до інкубації, 623,2% після інкубації. Після 90-добової інтоксикації збільшується на 767,9% до інкубації, 744,1% після інкубації. При цьому, приріст МДА достовірно збільшується: після 30-добового отруєння – 263,3%, 60 – 575,7%, 90 – 687,6%. З боку антиоксидантного захисту (АО) відмічаються достовірні підвищення активності відносно до інтактних тварин каталази: після 14 добової інтоксикації-18,7%, супероксиддисмутази-26,0%. Після більш довготривалого отруєння різко знижується АО система відносно до інтактних тварин: каталаза після 30, 60, 90-добового отруєння відповідно на 10,0%, 20,5%, 24,7%; активність СОД після 30, 60, 90 добового отруєння на 13,5%, 29,8%, 35,6%. Таким чином, одержані показники дослідження вказують, що невеликі дози нітрату натрію при малому періоді інтоксикації не призводять до порушення АО захисту та підвищення показників ПОЛ. При більш довготривалому надходженні їх в організм спостерігається зниження АО захисту та зростання показників ПОЛ, яке вказує на те, що малі дози нітратів при довготривалому отруєнні призводять до виснаження АО потенціалу та зростанню ПОЛ, що корелює з підвищенням рівня ДНКЗ. При малих строках хронічної нітратної інтоксикації відмічаються процеси компенсації, а при більш довготривалому отруєнні – стійке порушення процесів енергетичного обміну та функціональних показників. При запаленні відбувається утворення ендogenous NO, посилює пригнічення енергетичного метаболізму і це призводить до розладу окисного фосфорилування та накопичення АМФ, та Фн (Мальшев и соавт., 2000).

При застосуванні ГБО накопичення ДНКЗ достовірно збільшується відносно інтактних тварин: після 30, 60, 90-добового отруєння відповідно на 24,4%, 42,6%, 56,3%. Хоча ГБО і попереджує розвиток більш глибоких порушень, але зниження до норми комплексу ДНКЗ не відбувається. При застосуванні гіпербаричного кисню з внутрішньочеревним введенням церулоплазміну відмічається достовірне підвищення показників енергетичного метаболізму відносно тварин, яким не застосовували ГБО та церулоплазмін: енергетичного потенціалу – 19,9%, АТФ – 63,8%, швидкості фосфорилуючого дихання в метаболічному стані 3 за Чансом – на 55,1%, АДФ/О – 20,2%, цитохромоксидази – 23,7%. Корекція біоенергетичних процесів позначилася на достовірному підвищенні активності α -амілази (на 23,6%) відносно тварин, які не зазнавали впливу даних методів, що свідчить про оптимізацію функціонального стану в тканинах слинних залоз. Дія гіпербаричного кисню

на процеси, що пов'язані з патогенною дією надлишкової кількості NO, очевидно, пов'язане з обмеженням утворення NO, на що вказує зниження концентрації ДНКЗ. Церулоплазмін, очевидно, має здатність акцептувати надлишкову кількість NO через наявність у структурі даного білка іонів міді. Це дозволяє знижувати кількість NO в реакційному середовищі і обмежувати, внаслідок цього, токсичну дію оксиду азоту на організм. В цілому результати нашого дослідження дозволяють зробити висновок про доцільність застосування в комплексі ГБО і церулоплазміну під час хронічної нітратної інтоксикації, що обмежує агресивний вплив надлишкової кількості NO на функціональний стан мітохондрій, і залежних від них процесів.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведене нове вирішення наукової задачі, щодо дослідження патогенезу порушень енергетичних і функціональних процесів у слинних залозах при надлишковому утворенні оксиду азоту (NO) з екзогенних (при хронічній інтоксикації нітратом натрію) та ендогенних (при розвитку експериментального сіалоаденіту) попередників і теоретичне обґрунтування ефективності коригуючої дії гіпербаричного кисню та церулоплазміну.

1. Екзогенне надходження нітрату натрію в дозі 200 мг на кг маси тіла призводить до накопичення оксиду азоту в слинних залозах в вигляді динітрозильних комплексів заліза та розвитку хронічної нітратної інтоксикації.

2. Хронічна нітратна інтоксикація порушує енергетичний обмін в слинних залозах білих щурів, пригнічує окислювальне фосфорилування та знижує енергетичний потенціал.

3. Хронічна нітратна інтоксикація викликає порушення антиоксидантного захисту в тканинах слинних залоз білих щурів та підвищує показники перекисного окислення ліпідів.

4. Відтворення гострого запального процесу в тканинах слинних залоз за допомогою карагеніну призводить до ендогенного утворення оксиду азоту в слинних залозах та їх накопичення, що безпосередньо впливає на енергетичний обмін, порушення процесів мітохондріального окислення, фосфорилування в тканинах слинних залоз.

5. Застосування ГБО за схемою (після 14, 30, 60, 90-добового отруєння) попереджує глибокі порушення енергетичного обміну та антиоксидантного захисту в тканинах слинних залоз.

6. Після внутрішньочеревинного введення церулоплазміну на фоні хронічної нітратної інтоксикації в дозі 20 мг/кг маси тварин зменшується рівень накопичення динітрозильних комплексів заліза, що свідчить про зниження утворення оксиду азоту.

7. Після застосування в комплексі ГБО за схемою з церулоплазміном на фоні хронічної нітратної інтоксикації призводить до активації антиоксидантного захисту, зниження показників перекисного окислення ліпідів та динітрозильних комплексів заліза.

8. Комплексне застосування ГБО з церулоплазміном при карагеніновому запаленні на тлі хронічної нітратної інтоксикації обмежує накопичення NO в вигляді ДНКЗ та активує процеси енергетичного метаболізму, які підвищують енергетичний потенціал.

ПУБЛІКАЦІЇ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Бондаренко В.В. Состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы в околоушных железах в условиях хронической интоксикации организма нитратами //Вісник проблем біології і медицини. – 1998. – № 16. – С. 37-39.

2. Бабина О.А., Бондаренко В.В., Гранько М.А., Саяпина Л.М., Шевченко О.В., Цебржинский О.И. Источники активных форм кислорода в тканях ротовой полости в норме и при патологии //Стоматология. – 1999. – Т. 78, № 5. – С. 9-11.

3. Бондаренко В.В. Коррекция церулоплазмином и ГБО процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы в слюнных железах при хронической нитратной интоксикации крыс нитратом натрия //Проблеми екології та медицини. – 2000. – Т. 4, № 2-3. – С.2-4.

4. Кайдашев И.П., Ножинова О.А., Боброва Н.А., Рябенко В.В., Бондаренко В.В., Костенко В.А., Гаркович А.Л. Апоптоз в клетках паренхиматозных органов при подострой интоксикации нитратом натрия //Цитология и генетика. – 2000. – Т. 34, № 3. – С. 62-68.

5. Бондаренко В.В. Зміни активності α -амілази у тканинах слинних залоз білих щурів при карагеніновому запаленні на фоні хронічної інтоксикації нітратом натрію //Одеський медичний журнал. – 2001. № 3. С. 15-16.

6. Бондаренко В.В. Порушення енергетичного метаболізму в тканинах слинних залоз при хронічній інтоксикації нітратом натрію // Одеський медичний журнал. – 2001. № 5. С. 12-13

7. Бондаренко В.В. Влияние гипербарической оксигенации и церулоплазмينا на окислительно-восстановительные процессы и сопряжённое с ним фосфорилирование в слюнных железах при хронической нитратной интоксикации // Стоматология – 2001. – Т. 80, № 6. – С.12-13.

8. Костенко А.Г., Костенко В.О., Цебржинський О.І., Глебова Л.Ю., Бондаренко В.В., Лазарева З.О. Особливості стресу за умов інтоксикації та запалення. Мат. Пленуму Товариства патофізіологів України. (Чернівці, 20-22 травня) //Фізіологічний журнал – 1998. – Т. 44, № 4. – С. 86.

9. Костенко В.О., Лазарева З.А., Глебова Л.Ю., Бондаренко В.В. Гіпербарична оксигенація попереджує накопичення та цитотоксичну дію оксиду азоту. /Мат. Міжнародної конференції “Гіпоксія: деструктивна та конструктивна дія”. – Київ, 1998. – С. 107-108.

10. Костенко В.О., Цебржинський О.І., Глебова Л.Ю., Бондаренко В.В., Міщенко А.В., Денисенко С.В., Романцев О.Ю. /Мат. III Національного Конгресу патофізіологів України з міжнародною участю (Одеса, 27-29 травень). – //Фізіологічний журнал. – 2000. – Т.46, №2. – С. 82-83.

11. Денисенко С.В., Бондаренко В.В., Глебова Л.Ю., Костенко В.А., Цебржинський О.І. Влияние токсических доз нитратов на окислительные и энергетические процессы //Тези доповідей I з'їзду токсикологів України (11-13 жовтня) – Київ, 2001. – С.94-95.

Дисертація на здобуття наукового ступеня за спеціальністю 14.03.04.- патологічна фізіологія. Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2001. Дисертація присвячена дослідженню накопичення нітрату натрію в вигляді динітрозильних комплексів заліза і в організмі з екзогенних (хронічна нітратна інтоксикація) та ендогенних (карагенінове запалення) попередників.

Досліджували його вплив на енергетичний обмін, активність ферментів антиоксидантного захисту та ферменту α -амілази, перекисне окислення ліпідів у тканинах слинних залоз білих щурів. Виявлено, що в динаміці хронічної інтоксикації нітратом натрію розвиваються суттєві порушення функціонального стану мітохондрій слинних залоз порушуються шляхи постачання субстратів окислення до мітохондріальних мембран, відмічається зниження ефективності окислювального фосфорилування і розлад процесів окислення і фосфорилування АДФ, порушується утворення ферменту α -амілази та знижується активність антиоксидантних ферментів, пригнічується енергетичний потенціал, активізуються в тканинах слинних залоз процеси перекисного окислення ліпідів і знижується активність антиоксидантних ферментів. Призначення гіпербаричної оксигенації обмежує глибокі порушення мітохондріального дихання, фосфорилування, обмежує накопичення оксиду азоту, запобігає суттєвій активації ПОЛ, однак не має впливу на процеси нормалізації біоенергетичних процесів, та функціональні показники при хронічній інтоксикації нітратом натрію. Використання ГБО за експериментально розробленою схемою в комплексі з церулоплазміном дає позитивні результати які відображені в роботі. Активує процеси антиоксидантного захисту попереджує порушення енергетичного метаболізму, активує утворення ферменту α -амілази.

Ключові слова: хронічна нітратна інтоксикація, слинні залози, α -амілаза, перекисне окислення ліпідів, запалення, церулоплазмін, гіпербарична оксигенація.

Бондаренко В.В. Изменения энергетического метаболизма свободно-радикального окисления липидов в слюнных железах при образовании чрезмерного количества оксида азота с экзогенных и эндогенных предшественников. – Рукопись.

Диссертация на получение ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.04. – патологическая физиология. Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 1998.

Диссертация посвящена исследованию накопления нитрата натрия в виде динитрозильных комплексов железа в организме с экзогенных (хроническая нитратная интоксикация) и эндогенных (карагениновое воспаление) предшественников. Исследовали его влияние на энергетический обмен, активность ферментов антиоксидантной защиты каталазы и супероксиддисмутазы, фермента α -амилазы, перекисное окисление липидов в тканях слюнных желез белых крыс. Выявлено, что при хронической интоксикации нитратом натрия развиваются существенные нарушения функционального состояния митохондрий в тканях слюнных желез снабжения субстратов окисление, отмечается снижение эффективности окислительного фосфорилирования АДФ, нарушаются процессы образования фермента α -амилазы и снижается активность антиоксидантных ферментов угнетаются процессы энергетического потенциала. Назначение гипербарической оксигенации

предупреждает глубокие нарушения митохондриального дыхания, фосфорилирования, ограничивает накопление оксида азота, предотвращает существенной активации ПОЛ, однако не имеет влияния на сроки нормализации биоэнергетических процессов в обновленном периоде острой интоксикации нитратом натрия. Применение ГБО и церулоплазмينا за экспериментально разработанной схемой даёт положительные результаты которые отражены в работе. Активизирует процессы антиоксидантной защиты, предупреждает нарушение энергетического метаболизма, активизирует образование фермента α -амилазы.

Ключевые слова: хроническая нитратная интоксикация, слюнные железы, α -амилаза, перекисное окисление липидов, воспаление, церулоплазмин, гипербарическая оксигенация.

V.V. Bondarenko. Changes of energy metabolism and lipid peroxidation in salivary glands tissues by overmeasure nitric oxide from internal and external sausages. –A manuscript.

A thesis in search for the degree of a Candidate of medical sciences on the speciality 14.03.04 –Pathologic Physiology. The Institute of Physiology named after A.A. Bogomolets NAS of Ukraine, Kyiv, 2001.

The thesis is devoted to the investigation of energy metabolism and lipid peroxide oxidation in salivary glands of white rats which were introduced with sodium nitrate. In cronic intoxication with sodium nitrate the were revealed the significant violations of mitochondrea functional condition of tissues in salivary glands of provision of oxigenation substrates, there were also marked the lowering of effectiveness of oxygenative phosphorylation ADD, decreasing of antioxidant enzymes activity, there were disturbances in processes of α -amylase enzyme producing. The administration of course of hyperbaric oxigenation prevents deep violations of mitochondrial respiration, phosphorylation; limits the accumulation of nitric oxide, prevents significant lipid peroxidation activation but does not influence the terms of normalization of bioenergetic processes in renewed period of acute sodium nitrate intoxication. The use of HBO and ceruloplasmin going on according to the experimentally worked out scheme, activates the processes of antioxidant protection, violation of energy metabolism, activates the α -amylase enzyme formation.

Keywords: nitric oxide, chronic nitrate

Intoxication, salivary glands, α -amilase, lipid peroxidation, inflammation, ceruloplasmin, hyperbaric oxygenation