

УДК 616.13-004.6:615.225

КП

№ ДР 0108U010079

Інв. №

Міністерство охорони здоров'я України
Вищий державний навчальний заклад України
«Українська медична стоматологічна академія»
36024, м. Полтава, вул. Шевченка, 23; тел. (0532) 60-20-51, факс 60-20-51

“ЗАТВЕРДЖУЮ”
Ректор ВДНЗУ “УМСА”
д.мед.н., професор

Ждан В.М.
2014.21.12

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

«Кисень- та NO-залежні механізми ушкодження внутрішніх органів та їх корекція
фізіологічно активними речовинами» (заклучний)

Керівник НДР
д.мед.н., професор
2014.21.12

Костенко В.О.

Рукопис закінчено 1 грудня 2014 р.
Результати цієї роботи розглянуто Вченою Радою ВДНЗУ “УМСА”
протокол від 24.12.2014 р., № 5

Робота виконана згідно з планом за темою «Кисень- та NO-залежні механізми ушкодження внутрішніх органів та їх корекція фізіологічно активними речовинами», номер держреєстрації 0108U010079, ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія».

СПИСОК ВИКОНАВЦІВ

Керівник теми	
Завідувач кафедри патофізіології, доктор медичних наук, професор	Костенко В.О. (реферат, вступ, висновки)
1.12.2014 р.	
Виконавці - Відповідальний виконавець - викладач кафедри патофізіології	Левков А.А. (розділ 1, висновки 1-3)
1.12.2014 р.	
Здобувач кафедри патофізіології	Коваленко О.В. (розділ 2, висновки 4-7)
1.12.2014 р.	
Асистент кафедри ортодонції	Стасюк А.А. (розділ 3, висновки 8-11)
1.12.2014 р.	
Здобувач кафедри патофізіології	Сорокін Б.В. (розділ 4, висновки 12-14)
1.12.2014 р.	
Асистент кафедри пропедевтики хірургічної стоматології	Ляшенко Л.І. (розділ 5, висновки 15-17)
1.12.2014 р.	
Заочний аспірант кафедри патофізіології	Єлінська А.М. (розділ 5, висновки 15)
1.12.2014 р.	

РЕФЕРАТ

Досліджено кисень- та NO-залежні механізми, що обумовлюють патологічні зміни в організмі за умов станів з надлишковим утворенням оксиду азоту (при розвитку локального та системного запалення, інтоксикацій, метаболічних розладів). На різних моделях патологічних процесів (гостра тонкокишкова недостатність, інтоксикації нітратом та фторидом натрію, травматичні ураження слинних залоз, глюкокортикоїдний остеопороз, метаболічний синдром) показано розвиток дизрегуляторних розладів у функціонуванні циклу оксиду азоту, порушення авторегуляторних механізмів, пов'язаних з функціонуванням нітрат- і нітритредуктазної та NO-синтазної компонентів підтримки адекватного рівня NO у тканинах, а також конкурентних стосунків між NO-синтазним та аргіназним шляхами метаболізму L-арнініну. Такі зміни супроводжується істотними функціонально-метаболічними розладами різних органів, пов'язаними з гіперпродукцією супероксидного аніон-радикала, активацією вільнорадикальних процесів, дезорганізацією сполучної тканини.

Ключові слова: оксид азоту, супероксидного аніон-радикал, NO-синтази, пероксинітрит, L-аргінін, окиснювальний метаболізм, вільнорадикальне окиснення, дизрегуляторна патологія.

ЗМІСТ

СПИСОК ВИКОНАВЦІВ.....	2
РЕФЕРАТ.....	3
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	5
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. Роль NO-синтаз і пероксинітриту у патогенезі розладів окиснювального метаболізму та бар'єрної функції тонкої кишки щурів за умов її гострої непрохідності.....	7
РОЗДІЛ 2. Участь NO-синтаз і пероксинітриту в патогенезі експериментального травматичного сіалоаденіту.....	13
РОЗДІЛ 3. NO-залежні механізми порушень окиснювального метаболізму у слинних залозах щурів за умов спільного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію.....	17
РОЗДІЛ 4. Роль компонентів системи оксиду азоту у патогенезі експериментального остеопорозу за умов надлишкового надходження в організм нітрату натрію.....	21
РОЗДІЛ 5. Роль NO-залежних процесів у патогенезі ушкоджень пародонта та СЗ за умов експериментального метаболічного синдрому.....	26
ВИСНОВКИ.....	27
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	29

ОСНОВНА ЧАСТИНА

ВСТУП

В основі уявлення про механізм ауторегуляції рівня NO в організмі ссавців лежить концепція “циклу оксиду азоту” (Реутов В.П., 2000).

Головні шляхи утворення оксиду азоту пов'язані з активністю NOS, а також ферментативними та неферментативними реакціями відновлення нітрат- та нітрит-іонів. Наявність NO-синтазного механізму забезпечує ендогенний синтез NO, який в кінцевому результаті окиснюється до нітрит- та нітрат-іонів. У той же час нітрат-іони за участю нітратредуктаз (мікрофлори та власних) можуть досить ефективно перетворюватись у нітрит-іони, а ті, у свою чергу (особливо за умов дефіциту кисню), – у NO.

Нітрат- та нітрит-редуктазний шлях вважається постачальником найбільшої кількості NO. Активність нітритредуктазних систем може бути в 10^2 - 10^3 разів вища, ніж NO-синтаз.

Висока активність нітритредуктазних систем створює умови для функціонування ланцюга L-аргінін \rightarrow NO \rightarrow NO₂⁻ \rightarrow NO₃⁻ по замкненому циклу, який В.П. Реутов та співавт. назвали циклом оксиду азоту.

За нормальних фізіологічних умов NO синтезується тільки тоді, коли він необхідний, і в такій кількості, яка є необхідною в кожний конкретний час. При дефіциті O₂ (наприклад, при функціональній гіпоксії, пов'язаній з посиленням споживання кисню, або при патологічних процесах, що протікають на тлі гіпоксії / ішемії) роль NO-синтазного (NOS) механізму може знижуватися і активується більш потужна нітритредуктазна компонента, яка є майже на три порядки ефективнішою, ніж NOS.

Аналіз ролі цих циклів дозволяє зрозуміти, чому іноді достатньо порушити лише деякі механізми інактивації агресивних сполук, як клітини піддаються руйнуванню, що має значення для процесів старіння та розвитку патології. У той же час багато інших змін клітини й організм у цілому переносять без особливих зусиль. Можна припустити, що це обумовлено наявністю ефективної системи самозахисту в самих клітинах, коли, наприклад, утворення NO і O₂⁻ здійснюється в межах одного і того ж активного центру. Прикладом може служити взаємна інактивація надмірного вмісту NO АФК з подальшим переходом NO у менш токсичні іони (NO₃⁻).

Таким чином, циклічну організацію метаболічних процесів можна розглядати як один з ауторегуляторних механізмів, які забезпечують підтримку концентрації фізіологічно активних сполук у межах норми.

Порушення функціонування циклів NO і O₂⁻ призводить до того, що замість відносно безпечних нітратних (NO₃⁻) іонів утворюється високореакційний пероксинітрит (ONOO⁻): NO + O₂⁻ \rightarrow ONOO⁻.

В останні роки було виявлено, що за умов надлишкового утворення оксиду азоту (NO) з екзогенних джерел (нітратів і нітритів) у організмі ссавців порушується функціонування циклу NO як механізму забезпечення негативного зворотного зв'язку (Костенко В.О. та співавт., 2008-2012). Так, за умов відтворення хронічної інтоксикації нітратом натрію активність NO-синтаз (NOS) (головним чином, індукбельна NOS, iNOS) у тканинах ясен та шлунка щурів не тільки не знижується, як це повинно бути за механізмом ауторегуляції рівня NO, але й значно підвищується, викликаючи суттєве збільшення продукції супероксидного аніон-радикала, активності пероксидного окиснення ліпідів, зниження антиоксидантного захисту.

Нещодавно виявлено, що про- і протизапальний характер дії оксиду азоту залежить від його здатності впливати на NF-κB-залежні процеси. Ядерний фактор κB відіграє важливу роль в регуляції експресії багатьох генів, що беруть участь у виживанні клітин, імунитеті, запаленні, активує індукбельну NO-синтазу (iNOS). Крім того, NO безпосередньо впливає на експресію NF-κB-залежних генів.

Важливим питанням проблеми дизрегуляторної NO-опосередкованої патології є з'ясування компонентів системи NO у патогенезі захворювань внутрішніх органів та стоматологічної патології.

Мета і задачі дослідження. Метою дослідження є розкриття кисень- та NO-залежних механізмів, що обумовлюють дизрегуляторні патологічні зміни в організмі за умов відтворення місцевого та системного запалення та інтоксикацій.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі задачі дослідження:

1. Дослідити продукцію супероксидного аніон-радикала мітросомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами (ЕТЛ) клітин тонкої кишки, слинних залоз (СЗ) та пародонта за умов відтворення непрохідності тонкої кишки, травматичних та постінтоксикаційних уражень СЗ та пародонта.

2. Дослідити стан білково-вуглеводних комплексів сполучної тканини тонкої кишки, слинних залоз (СЗ) та пародонта за умов відтворення непрохідності тонкої кишки, травматичних та постінтоксикаційних уражень СЗ та пародонта.

3. Дослідити стан вільнорадикальних процесів (продукцію активних форм кисню, пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), антиоксидантної (АО) системи) у тканинах тонкої кишки, СЗ та пародонта білих щурів за умов введення неселективного та селективних інгібіторів NO-синтаз, субстрату NO-синтазної реакції (L-аргініну) та скевенджеру пероксинітриту та відтворення різної патології.

4. Дослідити стан біоенергетичних процесів (вмісту та співвідношення аденіннуклеотидів, енергетичного потенціалу) у тканинах тонкої кишки білих щурів за умов введення неселективного та селективних інгібіторів NO-синтаз, субстрату NO-синтазної реакції (L-аргініну) та скевенджеру пероксинітриту. Дослідити біохімічний стан сполучної тканини та бар'єрну функцію тонкої кишки білих щурів за умов введення неселективного та селективних інгібіторів NO-синтаз, субстрату NO-синтазної реакції (L-аргініну) та скевенджеру пероксинітриту.

5. З'ясувати роль зміни продукції оксиду азоту NO-синтазними системами (при введенні їх інгібіторів та субстрату – L-аргініну) на структурно-метаболичні зміни тканини великогомілкових кісток і хребців білих щурів за умов відтворення глюкокортикоїдного ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію.

6. З'ясувати роль утворення пероксинітриту (за результатами дії його скевенджера L-селенометіоніну) на структурно-метаболичні зміни тканини великогомілкових кісток і хребців білих щурів за умов відтворення глюкокортикоїдного ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію.

Наукова новизна роботи. Вперше виявлено, що активність NO-синтаз істотно впливає на продукцію супероксидного аніон-радикала (O_2^-) у тканинах тонкої кишки білих щурів за умов гострої тонкокишкової недостатності (ГТКН). Показано, що продукція O_2^- мітохондріальним ЕТЛ при короткочасній (протягом 6 годин) ГТКН пов'язана з функціонуванням iNOS, при тривалій (протягом 18 годин) – iNOS та нейрональної NO-синтази (nNOS). Вперше виявлено, що за умов короткочасної (6 годин) ГТКН зниження концентрації макроергічних сполук та енергетичного потенціалу в тканинах тонкої кишки пов'язано з активністю iNOS, а при тривалішій (18 годин) – iNOS та nNOS.

Вперше виявлено, що за умов ГТКН (протягом 6 та 18 годин) функціонування iNOS викликає дезорганізацію сполучної тканини тонкої кишки; селективне пригнічення iNOS аміногуанідном супроводжується зменшенням концентрації мономерів глікопротеїнів та глікозаміногліканів сполучної тканини тонкої кишки, покращує стан кишкового бар'єра та знижують рівень летальності тварин (протягом 18 годин після відтворення ГТКН). Показано, що ефекти nNOS залежать від часу розвитку ГТКН: за умов короткотермінової ГТКН (протягом 6 годин) функціонування nNOS обмежує деполімерізацію фукоглікопротеїнів, а за умов тривалої ГТКН (протягом 18 годин) сприяє деполімерізації фуко- та сіалоглікопротеїнів сполучної тканини тонкої кишки. Селективне пригнічення iNOS обмежує порушення бар'єрної функції тонкої кишки та зменшує ризик транслокації мікроорганізмів і продуктів їхнього розпаду за межі кишки.

Вперше досліджено продукцію супероксидного аніон-радикала у клітинах нижньощелепних слинних залоз (СЗ) за умов експериментального травматичного сіалоаденіту (ТС) та змін функціонального стану NO-синтаз. Виявлено, що зміни продукції O_2^- мікросомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами у тканинах інтактної нижньощелепної слинної залози залежать від функціональної активності конституційних NO-синтаз. Гіперпродукція O_2^- мітохондріальним і мікросомальним електронно-транспортними ланцюгами у клітинах нижньощелепної слинної залози за умов травматичного сіалоаденіту пов'язана з функціонуванням індукцибельної ізоформи NO-синтази. Застосування L-аргініну та скевенджера пероксинітриту L-селенометіоніну обмежує гіперпродукцію O_2^- мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом у клітинах ушкодженої нижньощелепної слинної залози.

Виявлено, що функціонування нейрональної та індукцибельної NO-синтаз знижують активність супероксиддисмутази та каталази, але викликає різноспрямовані зміни ПОЛ у тканинах ушкоджених піднижньощелепних слинних залоз за умов ТС. Механізми активації ПОЛ та зниження антиоксидантного потенціалу у тканинах слинних залоз за умов ТС є пероксинітрит-залежними.

Отримані наукові результати підтверджують теоретичні погляди щодо можливості екзогенних токсикантів, які впливають на активність NO-синтаз, порушувати механізми акторегуляції вмісту NO в організмі ссавців.

Так, у ході експериментів вперше виявлено, що активність нейрональної та індукцибельної NO-синтаз призводить до різноспрямованих змін біоенергетичних процесів у тканинах ясен за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію. Функціональна активність iNOS порушує процес утворення АТФ, знижує енергетичний потенціал у тканинах ясен за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію. Функціонування nNOS, навпаки, активує ресинтез АТФ та підвищує енергетичний потенціал у тканинах ясен за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію. Функціональна активність iNOS підвищує за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію загальну протеолітичну активність тканин ясен, сприяє дезорганізації у них сполучної тканини через деполімерізацію фуко- та сіалоглікопротеїнів. Функціональна активність nNOS обмежує процес деполімерізації фукоглікопротеїнів у тканинах ясен за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію. Показано, що введення L-аргініну на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію обмежує вироблення супероксидного аніон-радикала мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом, пероксидне окиснення ліпідів і загальну протеолітичну активність тканин ясен щурів, збільшує у них антиоксидантний потенціал, пригнічує деполімерізацію сіалоглікопротеїнів і протеогліканів, але не впливає на активність каталази, вміст та співвідношення аденіннуклеотидів та енергетичний потенціал.

Вперше виявлено, що функціональний стан NO-синтаз істотно впливає на процес дезорганізації сполучної тканини та остеометричні характеристики великогомілкових кісток і хребців за умов відтворення глюкокортикоїдного остеопорозу на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію. Показано, що функціональна активність iNOS сприяє деполімерізації колагену та протеогліканів у тканині великогомілкової кістки та хребців, впливає на зниження маси цих кісток, їх щільності та міцності, що свідчить про розвиток дизрегуляторних розладів (порушення механізму авторегуляції кількості NO при його утворенні з екзогенного попередника). Виявлена здатність субстрату NO-синтазної реакції L-аргініну обмежувати процес колагенолізу у кістковій тканині.

Вперше виявлено, що порушення процесу ремоделювання кісток при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію є пероксинітрит-залежними. Показано, що введення скевенджера пероксинітриту L-селенометіоніну покращує процес формування кістки та пригнічує її резорбцію, обмежує колагеноліз і дезорганізацію протеогліканів у тканині великогомілкової кістки та хребців, підвищує їх щільність та мінеральну насиченість, зменшує індекс Simon, поліпшує біомеханічні властивості великогомілкової

кістки, підвищує у кістковій тканині середню щільність розташування клітинних елементів та відносну кількість остеобластів.

Вперше виявлено, що функціональна активність нейрональної NOS за умов експериментального метаболічного синдрому (МС) обмежує у тканинах пародонта та СЗ щурів вільнорадикальні процеси (загальний фон продукції супероксидного аніон-радикала, його вироблення мітросомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами, утворення вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів). Вперше виявлено, що функціонування pNOS за умов експериментального МС обмежує процес колагенлізу та деполімеризації протеогліканів у м'яких і кістковій тканинах пародонта щурів. Здатність pNOS забезпечувати down-регуляцію продукції супероксидного аніон-радикала, пероксидного окиснення ліпідів, колагенлізу та деполімеризації протеогліканів у тканинах пародонта щурів за умов експериментального МС є NF-κB-опосередкованою.

Показано, що з функціональною активністю iNOS і NF-κB за умов експериментального МС пов'язані односпрямовані зміни вільнорадикальних процесів у тканинах пародонта (гіперпродукція супероксидного аніон-радикала, розвиток декомпенсованого пероксидного окиснення ліпідів, що супроводжується виснаженням антиоксидантного потенціалу, зменшенням активності каталази), резорбція альвеолярного відростка щелеп, дезорганізація сполучної тканини (колагеноліз та деполімеризацію протеогліканів у м'яких і кістковій тканинах пародонта).

Виявлено, що введення L-аргініну за умов експериментального МС пригнічує у СЗ і м'яких тканинах пародонта щурів пероксидне окиснення ліпідів, підвищує антиоксидантний потенціал, обмежує процес резорбції альвеолярного відростка щелеп, колагеноліз та деполімеризацію протеогліканів у м'яких і кістковій тканинах пародонта.

Вперше виявлено, що введення інгібітора NF-κB JSH-23 за умов експериментального МС супроводжується підвищенням антиоксидантної та колагенопротективної дії L-аргініну в м'яких і кістковій тканинах пародонта.

Практичне значення роботи. Одержані результати можуть використовуватися як експериментальна база для розробки патогенетично обґрунтованих методів запобігання і корекції наслідків хірургічної травми. Обґрунтовано можливість застосування мексидолу та L-аргініну, іммобілізованих на ХШМ, як стреспротекторів. Розроблений спосіб одержання резорбтивного біологічно активного шовного матеріалу (патент України на корисну модель № 39088 від 10.02.2009 р.) з введенням L-аргініну у структуру хірургічної нитки внесений до Реєстру галузевих нововведень МОЗ України (2010 р., вип. 32-33) та може бути рекомендований для доклінічних та клінічних випробувань з подальшим застосуванням модифікованого ХШМ у хірургічній практиці.

Одержані результати можуть використовуватися як експериментальна база для розробки патогенетично обґрунтованих методів корекції процесів вільнорадикального та гіпоксичного некробіозу тканин тонкої кишки за умов ТС засобами, що впливають на активність ізоформ NOS, L-аргініном та скевенджерами пероксинітриду.

Одержані результати можуть використовуватися як експериментальна база для розробки патогенетично обґрунтованих методів попередження та корекції пошкодження СЗ і пародонта за умов МС засобами, що впливають на активність ізоформ NOS і NF-κB-сигналізації. Одержані результати можуть використовуватися як експериментальна база для розробки методів запобігання розвитку запально-дистрофічних захворювань СЗ і пародонта за умов МС. Розроблений спосіб моделювання метаболічного синдрому.

Одержані результати можуть використовуватися як експериментальна база для розробки патогенетично обґрунтованих методів корекції вільнорадикальних і біоенергетичних порушень тканин ясен у осіб, які проживають у забруднених неорганічними нітросполуками регіонах скевенджерами пероксинітриду, L-аргініном та засобами, що впливають на активність ізоформ NOS.

Одержані результати можуть використовуватися як експериментальна база для розробки патогенетично обґрунтованих методів попередження та корекції вільнорадикальних ушкоджень СЗ за умов сукупної дії надлишкових концентрацій нітрату та фториду натрію засобами, що впливають на активність ізоформ NOS, L-аргініном, скевенджерами пероксинітриду, пектином і пектиновмісними харчовими продуктами. Одержані результати можуть використовуватися як експериментальна база для розробки методів запобігання дизрегуляції фізіологічного рівня NO в організмі, пов'язаної з дисфункцією СЗ та ентеро-саліварного переносу неорганічних нітросполук.

Отримано деклараційний **патент** на корисну модель: Пат. 63237 Україна, МПК A61 G10/02. Спосіб обмеження накопичення оксиду азоту в організмі / Костенко В. О., Катрушов О.В., Соловійова Н.В., Коваленко О.В., Сорокін Б.В., Стасюк О.А., Фартушна А.М. ; № u 2010 13100 ; заявл. 04.11.2010 , опубл. 10.10.2011 , Бюл. №19;

РОЗДІЛ 1

Роль NO-синтаз і пероксинітриду у патогенезі розладів окиснювального метаболізму та бар'єрної функції тонкої кишки щурів за умов її гострої непрохідності.

1.1. Матеріали та методи дослідження

Експерименти виконані на 165 білих щурах лінії Вістар масою 180-240 г. При роботі з тваринами дотримувалися вимог "Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експерименті та інших наукових цілях" (Страсбург, 20.09.1985 р.). Комісією з питань біоетики Вищого державного навчального закладу України "Українська медична стоматологічна академія" (протокол № 78 від 19 січня 2010 р.) порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

Проведено десять серій дослідів: у першій серії необхідні показники вивчали у інтактних тварини (контрольна); у другій – відтворювали ГТКН (контрольна); у третій, четвертій та п'ятій серіях – тваринам з

модельованою ГТКН вводили відповідно неселективний інгібітор NO-синтаз (NOS) – метиловий ефір нітро-L-аргініну (L-NAME) виробництва "Sigma Chemical Co" (США) в дозі 5 мг/кг (Laude K. et al., 2003), селективний інгібітор нейрональної NO-синтази (nNOS) – 7-нітроіндазол (7-NI) виробництва "Sigma Chemical Co" (США) в дозі 30 мг/кг (Laude K. et al., 2003) та селективний інгібітор iNOS – аміногуанідин виробництва "Sigma Chemical Co" (США) в дозі 20 мг/кг (Takeuchi K. et al., 2007); у шостій і сьомій серіях – щурам з ГТКН вводили відповідно субстрат NOS – L-аргінін (L-Arg) виробництва "Kyowa Hakko Kogyo Co LTD" (Японія) в дозі 500 мг/кг (Дробінська О. та співавт., 2004) та скевенджер пероксинітриту – L-селенометіонін (L-Sem) виробництва "Sigma-Aldrich, Inc." (США) в дозі 3 мг/кг (Laude K. et al., 2003); у восьмій серії – інтактним щурам виконували несправжню операцію (операція обмежувалася введенням тварин у наркоз та розрізом та зшиванням шкіри, без травмування тонкої кишки та імплантації ХШМ) (контрольна); у дев'ятій серії – щурам після відтворення ГТКН виконували операцію формування тонкокишкового анастомозу із застосуванням немодифікованого ХШМ (контрольна); у десятій серії – щурам після відтворення ГТКН виконували операцію формування тонкокишкового анастомозу анастомозу із застосуванням ХШМ, модифікованого L-Arg.

У серіях дослідів № 3-7 наведені сполуки вводили внутрішньоочеревинно за 20 хв до початку відтворення ГТНК.

Евтаназію тварин проводили методом дислокації шийних хребців під ефірним наркозом.

Для експериментального моделювання ГТКН у лабораторних щурів під тіопенталовим наркозом (40 мг на 1 кг маси тіла) виконували лапаротомію, в рану виводили петлю тонкої кишки, знаходили і перев'язували одну з магістральних вен брижі. Кишку складали за типом "двостволки" (Лігоненко О.В. та співавт., 2007).

Резекцію кишки проводили під тіопенталовим наркозом (40 мг на 1 кг маси тіла), формували тонкокишковий анастомоз за типом „бік у бік”.

L-Arg виробництва "Kyowa Hakko Kogyo Co LTD" (Японія) іммобілізували на хірургічних нитках (кетгуті зі свинячої сировини виробництва НВП "Медар", м. Полтава) електролізним методом згідно з патентом України № 39088, підготовленим з нашою участю. Цей спосіб іммобілізації L-Arg на кетгут дозволяє отримати концентрацію препарату $0,050 \pm 0,005$ г/м нитки.

Біохімічні методи дослідження. Утворення супероксидного аніон-радикалу ($\cdot O_2^-$) оцінювали шляхом проведення тесту з нітросинім тетразолієм (НСТ) (Цебржинський О.И., 2002). При цьому оцінювали продукцію $\cdot O_2^-$ мікросомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами (ЕТЛ) та НАДФН-оксидазною системою лейкоцитів в гомогенаті тканин тонкої кишки за умов введення відповідних індукторів (НАДН, НАДФН, пірогенал).

Рівень пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканинах оцінювали за утворенням у реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними продуктами забарвленого триметінового комплексу до і після 1,5-годинної інкубації у залізо-аскорбатному буферному розчині (Кайдашев І.П. та співавт., 2003).

Активність антиоксидантної системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час півторагодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (СОД) (Брусов О.С., Герасимов А.М., Панченко Л.Ф., 1976) та каталази (Архипова О.Г., 1988).

Вміст аденозинтрифосфату (АТФ) визначали за методом E. Beutler (1975), в основі якого знаходиться вимірювання оптичної густини реагуючих речовин, яка пропорційна вмісту АТФ у пробі. Вміст аденозинди- та монофосфату (АДФ і АМФ) визначали за методом D. Jaworeck et al. (1974) в одній пробі за допомогою сполучених реакцій. На основі одержаних результатів обчислювали значення енергетичного потенціалу (ЕП) за формулою D.E. Atkinson (1968).

Стан біополімерів сполучної тканини органів травлення визначали шляхом оцінки вмісту фукоглікопротеїнів - за концентрацією фукози, незв'язаної з білками (Шараєв П.Н. та співавт., 1997), а також продуктів деградації сіалоглікопротеїнів - за концентрацією N-ацетилнейрамінової кислоти – NANA (Кайдашев І.П. та співавт., 2003) та глікозаміногліканів - за концентрацією гексуронових кислот (Шараєв П.Н. и др., 1987).

Методи дослідження бар'єрної функції тонкої кишки. Для оцінки бар'єрної функції тонкої кишки щурам інтрагастрально вводили 0,5 мл 1% розчину метиленового синього і 0,01 г тетрацикліну гідрохлориду, розчиненого у 1 мл 0,5 % гідрокарбонату натрію (Лігоненко О.В. та співавт., 2007).

Морфологічні методи дослідження. Для оглядової мікроскопії застосовували фарбування гематоксиліном і еозином і пікрофуксином за Ван-Гізона. Дослідження зрізів проводили на цифровому мікроскопі фірми Olympus "BX 41". Морфометричний аналіз було здійснено на зрізах шляхом підрахунку клітин різних класів методом стандартних площ (Автандилов Г.Г., 1990). Для проведення підрахунку клітин з кожної серії зрізів методом випадкових чисел було відібрано по 5. У кожному з них визначалася кількість нейтрофілів, макрофагів, лімфоцитів, плазматичних клітин і клітин фібробластичного ряду у 5 полях зору біокулярного мікроскопа (x900).

Отримані дані піддавали статистичній обробці (Гланц С., 1999; Реброва О.Ю., 2002). Для перевірки розподілу на нормальність було застосовано розрахунок критерію Шапіро-Віллка. Якщо дані відповідали нормальному розподілу, то для їх порівняння використовували t-критерій Ст'юдента для незалежних вибірок. У випадку, коли ряди даних не підлягали нормальному розподілу, статистичну обробку здійснювали, використовуючи непараметричний метод – тест Мана-Вітні. Для аналізу відмінностей частот у незалежних групах досліджень для перевірки нульової статистичної гіпотези про пропорційність частот застосовували розрахунок точного критерію Фішера, Статистичні розрахунки проводили з використанням програм "Microsoft Excel 2007" та "StatisticSoft 6.0".

1.2. Зміни окиснювальних процесів у тканинах тонкої кишки за умов її непрхідності та змін функціонування системи оксиду азоту

Через 6 годин після відтворення ГТКН у тканинах стандартної ділянки тонкої кишки відмічається суттєве збільшення продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним і мітохондріальним ЕТЛ відповідно на 46.4% ($p<0,001$) та 45.0% ($p<0,001$), а також НАДФН-оксидазною системою лейкоцитів – на 46.3% ($p<0,01$).

Нами виявлено, що на продукцію $\cdot\text{O}_2^-$ у тканинах тонкої кишки у значній мірі впливає функціональна активність NOS. Так, введення L-NAME перед відтворенням 6-годинної ГТКН обмежує підвищення вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним ЕТЛ у тканинах тонкої кишки – на 18.2 % ($p<0,001$), проте збільшує його продукцію мітохондріальним ЕТЛ – на 12.3% ($p<0,02$). Введення 7-NI обмежує зростання вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним ЕТЛ – на 22.5% ($p<0,001$) та істотно не позначається на продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріями та лейкоцитами. Введення аміногуанідину попереджає збільшення продукції $\cdot\text{O}_2^-$ у тканинах тонкої кишки за умов ГТКН. При цьому вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним і мітохондріальним ЕТЛ відповідно на 35.7% ($p<0,001$) та 17.4% ($p<0,001$) поступається даним другої серії (з відтворенням ГТКН).

Збільшення продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ при неселективному пригніченні NOS, очевидно, пов'язано із здатністю NO, що продукується конституційними NOS, викликати ефекти протилежні таким, що викликаються NO, джерелом якого є iNOS.

Примітно, що введення білим щурам L-Arg перед моделюванням 6-годинної ГТКН також не тільки не сприяє збільшенню продукції $\cdot\text{O}_2^-$, але й обмежує цей процес. Так, вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним ЕТЛ за цих умов зменшується – на 16.0% ($p<0,01$), мітохондріальним ЕТЛ – на 15.7% ($p<0,01$) у порівнянні з даними другої серії.

L-Sem за умов 6-годинної ГТКН неоднозначно впливає на продукцію $\cdot\text{O}_2^-$ різними джерелами у тканинах тонкої кишки: достовірно не позначається на виробленні $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним ЕТЛ, обмежує його продукцію мітохондріальним ЕТЛ (на 13.4%, $p<0,02$), збільшує вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ НАДФН-оксидазною системою лейкоцитів (на 19.6%, $p<0,05$) у порівнянні з даними другої серії.

У динаміці ГТКН продукція $\cdot\text{O}_2^-$ у тканинах тонкої кишки збільшується. Через 18 годин після відтворення ГТКН вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним, мітохондріальним ЕТЛ та НАДФН-оксидазою лейкоцитів у тканинах тонкої кишки – відповідно на 80.2% ($p<0,001$), 84.7% ($p<0,001$) та 68.5% ($p<0,01$) перевищує дані інтактної серії.

Введення L-NAME перед відтворенням моделі 18-годинної ГТКН обмежує підвищення продукції $\cdot\text{O}_2^-$ у тканинах тонкої кишки мікросомальним і мітохондріальним ЕТЛ – відповідно на 34.7% ($p<0,001$) та 12.1% ($p<0,01$). При введення 7-NI результати дослідження подібні до даних попередньої серії: вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ у тканинах тонкої кишки мікросомальним і мітохондріальним ЕТЛ відповідно на 35.5% ($p<0,001$) та 12.8% ($p<0,001$) поступається даним другої серії (з відтворенням ГТКН). Введення аміногуанідину перед відтворенням моделі 18-годинної ГТКН попереджає збільшення продукції $\cdot\text{O}_2^-$ у тканинах тонкої кишки мікросомальним ЕТЛ – на 39.7% ($p<0,001$), мітохондріальним ЕТЛ – на 17.0% ($p<0,01$) у порівнянні з даними другої серії.

При введенні L-Arg перед відтворенням 18-годинної ГТКН, як і за умов 6-годинної ГТКН, виявляється обмеження продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним і мітохондріальним ЕТЛ – відповідно на 9.5% ($p<0,02$) та 9.2% ($p<0,01$) у порівнянні з даними другої серії.

Введення L-Sem за умов 18-годинної ГТКН достовірно не впливає на продукцію $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним ЕТЛ – на 13.0% ($p<0,02$) та НАДФН-оксидазною системою лейкоцитів у тканинах тонкої кишки, проте обмежує вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ (на 19.9%, $p<0,001$). Таким чином, збільшується кількість $\cdot\text{O}_2^-$, вироблення якого пов'язано з участю пероксинітриду.

Через 6 годин після відтворення ГТКН у тканинах стандартної ділянки тонкої кишки відмічається вірогідне зростання концентрації ТБК-реактивів до інкубації – на 38.0% ($p<0,001$) – та після 1,5-годинної інкубації тканин в залізоаскорбатному буферному розчині – на 36.2% ($p<0,05$); спостерігається суттєве підвищення приросту концентрації ТБК-реактивів за час інкубації – на 31.9% ($p<0,05$), що вказує на розвиток антиоксидантної недостатності у тканинах тонкої кишки.

Введення L-NAME та 7-NI перед відтворенням 6-годинної ГТКН збільшує концентрацію ТБК-реактивів (до інкубації) – відповідно на 9.5% ($p<0,02$) та 16.7% ($p<0,001$) у порівнянні з даними другої серії (з відтворенням ГТКН). Це вказує на здатність конститутивних NOS чинити протективну дію щодо активації ПОЛ.

У той же час введення аміногуанідину обмежує підвищення концентрації ТБК-реактивів (до інкубації), яка на 17.4% ($p<0,001$) поступається даним другої серії. Введення шурам L-Arg також достовірно обмежує підвищення концентрації ТБК-реактивів (до інкубації), яка на 17.8% ($p<0,001$) поступається даним другої серії.

Примітно, що L-Sem, введений перед відтворенням 6-годинної ГТКН, достовірно не позначається на величині концентрації ТБК-реактивів у порівнянні з результатом другої серії.

Через 18 годин після відтворення ГТКН у тканинах стандартної ділянки тонкої кишки прогресує утворення вторинних продуктів пероксидації: у порівнянні з даними першої серії концентрація ТБК-реактивів до інкубації зростає – на 56.9% ($p<0,001$), після 1,5-годинної інкубації тканин в залізоаскорбатному буферному розчині – на 62.0% ($p<0,001$), приросту концентрації ТБК-реактивів за час інкубації – на 74.8% ($p<0,001$), що вказує на розвиток декомпенсованої антиоксидантної недостатності у тканинах тонкої кишки.

Введення L-NAME та 7-NI перед відтворенням 18-годинної ГТКН достовірно не позначаються на концентрації ТБК-реактивів. Введення аміногуанідину істотно обмежує підвищення концентрації ТБК-реактивів (до інкубації) та приросту концентрації ТБК-реактивів за час інкубації, які відповідно на 16.8% ($p<0,01$) та 19.5% ($p<0,05$) поступаються даним другої серії. Введення L-Arg достовірно обмежує підвищення концентрації ТБК-реактивів до інкубації – на 18.3% ($p<0,01$), концентрації ТБК-реактивів після інкубації – на 19.7% ($p<0,05$), а також приросту концентрації ТБК-реактивів за час інкубації – на 22.9% ($p<0,02$) у порівнянні з відповідними результатами другої серії. Введення L-Sem також достовірно обмежує підвищення концентрації ТБК-реактивів до інкубації – на 18.9% ($p<0,01$), концентрації ТБК-реактивів після інкубації – на 20.5% ($p<0,02$), а також приросту концентрації ТБК-реактивів за час інкубації – на 24.2% ($p<0,01$) у порівнянні з відповідними результатами другої серії.

Через 6 годин після відтворення ГТКН у тканинах стандартної ділянки тонкої кишки вірогідно зростає активність АО ферментів: СОД – на 20.7% ($p<0,01$), каталази – на 28.7% ($p<0,01$).

Введення L-NAME та аміногуанідину перед відтворенням 6-годинної ГТКН збільшує активність СОД у тканинах тонкої кишки – відповідно на 25.7% ($p<0,01$) та 27.1% ($p<0,001$) у порівнянні з даними другої серії. Введення аміногуанідину збільшує активність каталази у тканинах тонкої кишки – на 31.3% ($p<0,01$) у порівнянні з даними другої серії (з відтворенням ГТКН). У той же час введення 7-NI перед відтворенням 6-годинної ГТКН достовірно не позначається на активності СОД і каталази.

Введення шурам L-Arg та L-Sem перед моделюванням 6-годинної ГТКН достовірно не впливає на активність СОД і каталази у порівнянні з даними другої серії.

Через 18 годин після відтворення ГТКН у тканинах стандартної ділянки тонкої кишки активність АО ферментів на відміну від даних серії з моделюванням 6-годинної ГТКН вірогідно зменшується: СОД – на 41.4% ($p<0,001$), каталази – на 37.8% ($p<0,001$).

Введення L-NAME та селективних інгібіторів nNOS (7-NI) та iNOS (аміногуанідину) перед відтворенням 18-годинної ГТКН збільшує активність СОД у тканинах тонкої кишки – відповідно на 41.2% ($p<0,001$), 48.5% ($p<0,01$) (майже до величини інтактної серії) та 44.1% ($p<0,001$) у порівнянні з даними другої серії (з відтворенням ГТКН). Введення L-NAME та аміногуанідину збільшує активність каталази у тканинах тонкої кишки до величини, що достовірно не відрізняється від даних інтактної серії, та на 39.2% ($p<0,02$) і 53.9% ($p<0,02$) перевищує відповідний результат другої серії.

Введення шурам L-Arg перед моделюванням 18-годинної ГТКН підвищує активність СОД у тканинах тонкої кишки – на 55.9% ($p<0,01$), тобто до величини, що достовірно не відрізняється від даних інтактної серії. Введення шурам L-Sem за цих умов підвищує активність СОД та каталази у тканинах тонкої кишки – відповідно на 30.9% ($p<0,05$) та 49.0% ($p<0,05$) у порівнянні з даними другої серії (з відтворенням ГТКН).

Через 6 годин після відтворення ГТКН у тканинах стандартної ділянки тонкої кишки відмічаються істотні порушення енергетичного обміну. Вміст АТФ і АДФ знижується відповідно на 19.5% ($p<0,001$) та 15.5% ($p<0,05$); АМФ підвищується в 3,7 рази ($p<0,001$). Енергетичний потенціал достовірно знижується (на 20.9%, $p<0,001$). Все це свідчить про значне зниження ресинтезу макроергічних сполук.

Нами виявлено, що вміст та співвідношення аденіннуклеотидів у тканинах тонкої кишки у значній мірі залежать від функціональної активності NOS. Так, введення L-NAME перед відтворенням 6-годинної ГТКН призводить до достовірного підвищення концентрації АТФ і АДФ відповідно на 11.4 ($p<0,01$) та 15.0% ($p<0,05$), енергетичного потенціалу на 13.2% ($p<0,001$) у порівнянні з даними серії з відтворенням ГТКН. Вміст АМФ знижується на 38.8% ($p<0,001$).

Основний внесок у продукцію NO у тканинах тонкої кишки перед відтворенням 6-годинної ГТКН, очевидно, має iNOS. Це підтверджує той факт, що саме її інгібування шляхом введення аміногуанідину збільшує вміст АТФ на 11.4% ($p<0,05$), енергетичний потенціал – на 12.8% ($p<0,001$). Вміст АМФ знижується на 34.3% ($p<0,001$). Введення 7-NI за цих умов не викликає статистично достовірних відмінностей величин концентрації аденіннуклеотидів у тканинах тонкої кишки у порівнянні з контрольною серією з відтворенням відповідного терміну ГТКН.

Проте введення білим шурам L-Arg перед моделюванням 6-годинної ГТКН збільшує концентрацію АТФ на 16.7% ($p<0,02$), енергетичний потенціал – на 16.4% ($p<0,001$). Вміст АМФ знижується на 44.8% ($p<0,001$).

Вплив L-Sem за умов 6-годинної ГТКН збільшує концентрацію АТФ на 19.7% ($p<0,01$), енергетичний потенціал – на 19.6% ($p<0,001$). Вміст АМФ знижується на 53.7% ($p<0,001$). Це підтверджує участь пероксинітриду у розвитку біоенергетичної недостатності у ранньому періоді ГТНК.

У динаміці ГТКН відмічається прогресуюче пригнічення енергетичного обміну у тканинах тонкої кишки. Через 18 годин після відтворення ГТКН концентрації АТФ і АДФ знижуються відповідно на 52.4% ($p<0,001$) та 26.8% ($p<0,01$) у порівнянні з даними інтактної серії. Вміст АМФ підвищується у 4,9 рази ($p<0,001$). Енергетичний потенціал зменшується на 39.6% ($p<0,001$).

Введення L-NAME перед відтворенням моделі 18-годинної ГТКН також призводить до достовірного підвищення концентрації АТФ на 76.9% ($p<0,001$), енергетичного потенціалу на 40.1% ($p<0,001$) у порівнянні з даними серії з відтворенням ГТКН. Вміст АМФ знижується на 37.5% ($p<0,001$).

Проте суттєвий внесок у продукцію NO у тканинах тонкої кишки перед відтворенням 18-годинної ГТКН, має не тільки iNOS, але і nNOS. Так, при введенні аміногуанідину перед відтворенням ГТКН вміст АТФ на 82.1% ($p < 0,001$), енергетичний потенціал – на 46.2% ($p < 0,001$) перевищують дані серії з відтворенням ГТКН. Вміст АМФ поступається останній на 46.6% ($p < 0,001$). При введення 7-NI – концентрація АТФ на 83.3% ($p < 0,001$), а енергетичний потенціал на 47.9% ($p < 0,001$) перевищують дані серії з відтворенням ГТКН. Вміст АМФ знижується на 47.7% ($p < 0,001$).

У той же час, при введенні L-Arg перед відтворенням 18-годинної ГТКН достовірних відмінностей величин концентрації аденіннуклеотидів у тканинах тонкої кишки у порівнянні з серією з моделюванням відповідного терміну ГТКН не виявлено. Тобто L-Arg у дозі 500 мг/кг виявляє здатність підвищувати біоенергетичні процеси у тканинах тонкої кишки за умов її непрохідності тільки у ранній період розвитку цієї патології (протягом 6 годин розвитку).

При введенні L-Sem за умов 18-годинної ГТКН вміст АТФ на 56.4% ($p < 0,01$), енергетичний потенціал – на 25.8% ($p < 0,001$) перевищують дані серії з відтворенням ГТКН.

Це вказує на те, що на 18 годину розвитку ГТКН також виявляється роль пероксинітриду у пригніченні енергетичного обміну у тканинах тонкої кишки, проте природи показників концентрації АТФ і енергетичного потенціалу при введенні L-Sem в цей термін істотно поступаються таким при неселективному та селективному інгібуванні NOS. Це, очевидно, вказує на значний внесок власне NO у розвиток біоенергетичної недостатності тканин кишки за умов ГТКН.

1.3. Стан бар'єрної функції тонкої кишки за умов її непрохідності та змін функціонування системи оксиду азоту

Через 6 годин після відтворення ГТКН відмічаються істотні зміни вмісту мономерів сполучнотканинних структур тонкої кишки. Вміст фукози, NANA та гексуринових кислот підвищується відповідно на 39.1% ($p < 0,01$), 45.8% ($p < 0,02$) та 46.9% ($p < 0,001$). Все це свідчить про дезорганізацію сполучної тканини тонкої кишки внаслідок деполімеризації глікопротеїнів і протеогліканів.

Нами виявлено, що вміст мономерів сполучнотканинних структур тонкої кишки за умов ГТКН у значній мірі залежать від функціональної активності певних ізоформ NOS. Так, якщо введення 7-NI перед відтворенням 6-годинної ГТКН достовірно підвищує концентрацію фукози (на 18.7%, $p < 0,02$), то введення аміногуанідину знижує вміст фукози, NANA та гексуринових кислот відповідно на 18.8% ($p < 0,02$), 26.7% ($p < 0,05$) та 21.5% ($p < 0,01$). Таким чином, nNOS у цей період формування ГТКН виконує протективну функцію щодо стану фукоглікопротеїнів.

Введення L-NAME перед відтворенням 6-годинної ГТКН достовірно знижує концентрацію NANA та гексуринових кислот відповідно на 26.7% ($p < 0,05$) та 22.9% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними другої серії. Введення білим шурам L-Arg знижує вміст фукози та NANA відповідно на 21.9% ($p < 0,05$) та 30.2% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними другої серії. Вплив L-Sem за цих умов істотно зменшує концентрацію усіх мономерів сполучнотканинних структур тонкої кишки, що досліджувалися. Так, вміст фукози знижується – на 28.1% ($p < 0,01$), NANA – на 31.4% ($p < 0,01$) та гексуринових кислот – на 25.0% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними другої серії.

У динаміці ГТКН відмічається, що процес деполімеризації глікопротеїнів і протеогліканів зростає, про що свідчить прогресуюче збільшення мономерів сполучнотканинних структур тонкої кишки. Через 18 годин після відтворення ГТКН концентрації фукози, NANA та гексуринових кислот підвищується відповідно в 3.3 рази ($p < 0,001$), 2.1 рази ($p < 0,001$) та 1.7 рази ($p < 0,001$) у порівнянні з даними першої серії.

Введення L-NAME перед відтворенням моделі 18-годинної ГТКН також достовірно зменшує концентрацію фукози та NANA – відповідно на 26.3% ($p < 0,01$) та 29.4% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними другої серії. Звертає на себе увагу, що за цих умов введення 7-NI не тільки не збільшує вміст фукози у тканинах тонкої кишки, але й достовірно його знижує (на 18.4%, $p < 0,01$) у порівнянні з даними другої серії. Введення 7-NI також достовірно зменшує концентрацію NANA – на 27.0% ($p < 0,01$). Введення аміногуанідину знижує концентрацію усіх мономерів сполучнотканинних структур тонкої кишки, що досліджувалися, – фукози – на 31.6% ($p < 0,001$), NANA – на 35.7% ($p < 0,01$), гексуринових кислот – на 18.6% ($p < 0,02$).

Введення L-Arg перед відтворенням 18-годинної ГТКН, як і за умов моделювання 6-годинної непрохідності, достовірно знижує вміст фукози та NANA – відповідно на 15.8% ($p < 0,02$) та 23.8% ($p < 0,05$) у порівнянні з даними другої серії. Виявлена нами в указаний термін ГТКН відсутність достовірної протекторної дії NOS на вміст мономерів глікопротеїнів і протеогліканів підтверджує думку, що цей ефект L-Arg не є пов'язаним з NO-синтазним механізмом.

Як і за умов 6-годинної ГТКН, L-Sem при відтворенні 18-годинної непрохідності зменшує концентрацію фукози, NANA та гексуринових кислот – відповідно на 35.5% ($p < 0,01$), 33.3% ($p < 0,02$) та 22.8% ($p < 0,05$) у порівнянні з даними другої серії, що підтверджує стійкий характер пероксинітрид-залежної дезорганізації сполучної тканини тонкої кишки за умов ГТКН.

Вивчення бар'єрної функції кишки, з порушенням якої пов'язані терміни та шляхи інфікування черевної порожнини через транслокацію мікрофлори з тонкої кишки, виконували шляхом інтрагастрального введення 0,5 мл 1% розчину метиленового синього і 0,01 г тетрацикліну гідрохлориду, розчиненого у 1 мл 0,5 % гідрокарбонату натрію (Лігоненко О.В. та співавт., 2007; Жданов С.М., 2008). Вказані сполуки не проникають через кишкову стінку в черевну порожнину в нормі (в усіх інтактних тварин забарвлення і люмінесценція були відсутні), проте проникають при порушенні бар'єрної функції.

При оцінці проб як з 1% розчином метиленового синього, так і з введенням тетрацикліну гідро хлориду, та за результатами розрахунку точного критерію Фішера виявлено, що введення перед відтворенням ГТКН

аміногуанідину, L-Sem, а також L-Arg достовірно знижує частоту порушень бар'єрної функції тонкої кишки на 18-годину цього патологічного процесу.

При спостереженні за щурами з відтвореною ГТКН протягом 18 годин у всіх тварин стан був тяжкий, виражена тахікардія, тахіпноє. Летальність тварин у другій серії дослідів складає 56.0%. Причиною загибелі, за даними патоморфологічного дослідження, був перитоніт.

Введення перед відтворенням ГТКН NAME та 7-NI достовірно не впливає на рівень летальності, яка складає відповідно 33.3% та 26.7%. Введення аміногуанідину достовірно знижує летальність тварин протягом 18-годинного терміну до 20.0%. Тобто надлишкова продукція NO iNOS призводить до істотного збільшення летальності білих щурів за умов експериментальної ГТКН. Ураховуючи цей факт, при застосуванні NAME можна було б також очікувати зменшення летальності тварин, проте цей факт не був виявлений у нашому дослідженні, що може бути пов'язано з наявністю протективних властивостей NO, що утворюється конституційними NOS (Beck P.L. et al., 2004; Aoi Y. et al., 2008).

Ця думка у певній мірі підтверджується достовірним зменшенням летальності тварин при введенні перед відтворенням ГТКН L-Arg (до 20.0%). Проте введення перед відтворенням ГТКН L-Sem достовірно не позначається на показнику летальності щурів.

1.4. Патоморфологічні та морфометричні зміни зони тонкокишкового анастомозу за умов введення L-аргініну, іммобілізованого на хірургічному шовному матеріалі

Для оцінки стану відновлювальних процесів у зоні тонкокишкового анастомозу, операція формування якого проводилася за умов відтворення 18 годинної ГТКН, нами проведено морфологічні дослідження зразків паравульнарних тканин, з'єднаних немодифікованим та модифікованим L-Arg ХШМ. Використання лікарських засобів у складі ХШМ забезпечує цілеспрямоване їх введення у *locus morbi*, дозволяє створити у ньому необхідну концентрацію препарату безпосередньо під час оперативного втручання, уникнути небажаних системних ефектів (Костенко В.О. та співавт., 2008; Лігоненко О.В. та співавт., 2007).

При використанні ХШМ, модифікованого L-Arg, на 7 добу після оперативного втручання в області у зоні тонкокишкового анастомозу визначаються ділянки некрозу, які поширюються на всі оболонки стінки тонкої кишки. У зоні некрозу у всіх спостереженнях визначаються фрагменти ХШМ, які мало чим відрізняються від таких при використанні немодифікованої хірургічної нитки.

По периферії некротизованої тканини визначається зона запальної інфільтрації, в якій переважають поліморфноядерні лейкоцити. За даними морфометричного дослідження, кількість останніх (2.0 ± 0.1) на 58.3% ($p < 0.001$) менше, ніж при використанні немодифікованого кетгуту. Число лімфоцитів – 5.1 ± 0.4 , плазматичних клітин – 2.4 ± 0.2 . Кількість макрофагів (8.8 ± 0.8) – в 2,3 рази ($p < 0.001$), а клітинних елементів фібробластичного ряду (18.6 ± 2.8) – в 2,1 рази ($p < 0.05$) перевищує відповідні дані серії із застосуванням немодифікованого ХШМ.

Навколо запального інфільтрату розташовується зона, що має морфологічні ознаки дозріваючої грануляційної тканини. Для останньої притаманним, в першу чергу, є густе розташування тонкостінних кровоносних мікросудин і клітинних елементів фібробластичного ряду, а також нечисленних лімфоцитів. Слід зазначити, що в цій зоні щільність розташування кровоносних мікросудин вище, ніж у такій при використанні немодифікованого шовного матеріалу.

Після використання ХШМ, модифікованого L-Arg, на 14 добу після оперативного втручання, також як і при використанні немодифікованої нитки, в зоні тонкокишкового анастомозу визначаються фрагменти шовного матеріалу, що мають вид дрібних, слабо забарвлених, еозинофільних структур. По периферії останніх, на відміну даних на 7 добу післяопераційного періоду, зона некрозу практично не визначається. Безпосередньо залишки шовного матеріалу оточені зоною, для якої характерна добре виражена клітинна інфільтрація і значна кількість кровоносних мікросудин. У порівнянні з результатами дослідження із застосуванням немодифікованого ХШМ, серед клітинних елементів спостерігається істотне збільшення клітин фібробластичного ряду, їх кількість зростає – до 32.6 ± 2.6 , що на 45.5% ($p < 0.01$) перевищує дані контрольної серії та на 96.4% ($p < 0.001$) серії з використанням немодифікованого кетгуту.

Зменшується кількість макрофагів – до 4.8 ± 0.2 , що на 61.9% ($p < 0.001$) поступається результатам серії з використанням немодифікованого кетгуту. Кількість лімфоцитів (6.8 ± 0.2) – також поступається результатам серії з використанням немодифікованого кетгуту (на 33.3%, $p < 0.001$).

Описані нами вище гігантські клітини чужорідних тіл зустрічаються лише в поодиноких спостереженнях. У той же час, серед клітин фібробластичного ряду виявляється деяке збільшення зрілих клітинних форм і більш інтенсивне утворення колагенових волокон, у порівнянні з даними з використанням немодифікованого ХШМ.

По периферії зони тонкокишкового анастомозу, зміни, що спостерігаються в слизовій, м'язовій та серозній оболонках тонкої кишки, практично не відрізняються від таких у серії з використанням немодифікованого ХШМ.

Таким чином, наведена вище морфологічна картина свідчить, що застосування ХШМ, модифікованого L-Arg, прискорює процес загоєння тканин в зоні тонкокишкового анастомозу. Так, при застосуванні L-Arg, на 7 добу в паравульнарних тканинах достовірно збільшується кількість лімфоцитів та фібробластів, а на 14 добу істотно збільшується кількість клітинних елементів фібробластичного ряду. Така динаміка клітинних реакцій свідчить про прискорення переходу ранового запалення на моноцитарно-макрофагальну та фібробластичну стадії відповідно.

РОЗДІЛ 2.

Участь NO-синтаз і пероксинітриту в патогенезі експериментального травматичного сіалоаденіту

2.1. Матеріали та методи дослідження.

Дослідження були проведені на 60 білих щурах лінії Вістар масою 180-200 г. Травматичний сіалоаденіт моделювали шляхом дозованого механічного пошкодження протоки нижньощелепної залози під ефірним наркозом (протягом 4 хвилин вивідну протоку підщелепної СЗ стискають та розтискають поперемінно 1 раз на добу щоденно протягом 1 місяця) (Чулак Л.Д. та співавт., 2007). Тваринам протягом часу відтворення ТС внутрішньоочеревинно вводили відповідно ізотонічний розчин натрію хлориду ("плацебо"), неселективний інгібітор NO-синтаз – метиловий ефір нітро-L-аргініну (L-NAME), селективний інгібітор нейрональної NO-синтази – 7-нітроіндазол (7-NI), селективний інгібітор індукцибельної NO-синтази – аміногуанідин, субстрат NO-синтазної реакції – L-аргінін, скевенджер пероксинітриту – L-селенометіонін. Контролем слугували результати, одержані при дослідженні за тих же умов інтактної контрлатеральної нижньощелепної СЗ.

Зазначені вище сполуки вводили 2 рази на тиждень протягом часу відтворення хронічного ТС: L-NAME - у дозі 5 мг/кг (Laude K. et al., 2003), 7-NI – 30 мг/кг (Laude K. et al., 2003), аміногуанідин – 20 мг/кг (Takeuchi K. et al., 2007), L-Arg – 500 мг/кг (Дробінська О. та співавт., 2004) та L-Sem – 3 мг/кг (Laude K. et al., 2003). Евтаназію тварин виконували методом дислокації шийних хребців під ефірним наркозом.

Утворення $\cdot\text{O}_2^-$ у гомогенаті СЗ оцінювали при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм з індукторами у вигляді нікотинамідаденіндинуклеотиду відновленого (НАДН) та нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату відновленого (НАДФН) (Цебржинський О.І., 2002)

Рівень ПОЛ у тканинах оцінювали по утворенню в реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними продуктами забарвленого триметінового комплексу до і після 1,5-годинної інкубації (Кайдашев І.П. та співавт., 2003). Активність антиоксидантної системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час півторагодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (СОД) та каталази (Кайдашев І.П. та співавт., 2003).

Концентрацію аденозинтрифосфату (АТФ) у тканинах СЗ визначали за допомогою вимірювання оптичної густини реагуючих речовин, яка пропорційна вмісту АТФ у пробі (Beutler E., 1975). Вміст аденозинди- та монофосфату (АДФ і АМФ) визначали в одній пробі за допомогою сполучених реакцій (Jaworeck D., 1974). На основі одержаних результатів обчислювали значення енергетичного потенціалу за формулою D.E. Atkinson.

Отримані дані піддавали статистичній обробці. Для перевірки розподілу на нормальність було застосовано розрахунок критерію Шапіро-Вілکا. Якщо дані відповідали нормальному розподілу, то для їх порівняння використовували t-критерій Ст'юдента для незалежних вибірок. У випадку, коли ряди даних не підлягали нормальному розподілу, статистичну обробку здійснювали, використовуючи непараметричний метод – тест Мана-Вітні. Статистичні розрахунки проводили з використанням програм "Microsoft Excel 2007" та "StatisticSoft 6.0".

2.2. NO-залежні зміни продукції супероксидного аніон-радикала в нижньощелепних слинних залозах за умов експериментального травматичного сіалоаденіту

Відтворення ТС істотно не впливає на продукцію клітинами ушкодженої СЗ $\cdot\text{O}_2^-$ у мікросомальному ЕТЛ, але призводить до збільшення його вироблення у мітохондріальному ЕТЛ – до 15.45 ± 0.49 нмоль/г·с (на 14.9%, $p < 0.001$).

Нами виявлено, що на продукцію $\cdot\text{O}_2^-$ у тканинах СЗ у значній мірі впливає функціональна активність NOS.

Так, введення L-NAME знижує вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним ЕТЛ у тканинах інтактних СЗ – до 15.08 ± 0.23 нмоль/г·с (на 7.9%, $p < 0.01$), проте збільшує його продукцію мітохондріальним ЕТЛ – до 14.84 ± 0.28 нмоль/г·с (на 6.2%, $p < 0.05$).

Введення селективного інгібітору nNOS 7-NI також знижує вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним ЕТЛ у інтактних СЗ – до 15.5 ± 0.22 нмоль/г·с (на 5.4%, $p < 0.05$), але, як і при застосуванні L-NAME призводить до збільшення продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ – до 14.73 ± 0.26 нмоль/г·с (на 5.3%, $p < 0.05$).

Введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину, L-аргініну та L-селенометіоніну істотно не позначається на рівні генерації $\cdot\text{O}_2^-$ неушкодженими СЗ.

Відомо, що мікросомальний ЕТЛ, з яким пов'язана НАДФН-індукована продукція $\cdot\text{O}_2^-$, має спільні компоненти з НАДФН-діафорозою – маркером NO-синтази (Kathy K., 2000). Тому пригнічення NO-синтаз може позначатися на продукції $\cdot\text{O}_2^-$ (Pou S., 1999). При цьому звертає на себе увагу той факт, що пригнічення iNOS практично не позначається на рівні вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ інтактними СЗ, що, вочевидь, пов'язано з незначною функціональною активністю цього ферменту поза умовами запального процесу.

Збільшення утворення $\cdot\text{O}_2^-$ за умов введення неселективного інгібітору NOS L-NAME та селективного інгібітору nNOS 7-NI, очевидно, відбиває здатність конституційних NOS регулювати продукцію супероксиду, тобто виконувати протективну роль щодо накопичення та пошкоджуючої дії цього радикала.

Примітно, що продукція $\cdot\text{O}_2^-$ у СЗ з експериментальним ТС дещо по-іншому реагує на зміни функціональної активності NOS.

Так, якщо при введенні L-NAME знижується вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ мітросомальним ЕТЛ у тканинах СЗ з відтвореним ТС – до 14.12 ± 0.28 нмоль/г·с (на 8.6%, $p < 0.05$), та при застосуванні селективного інгібітору nNOS 7-NI величина вказаного показника збільшується – до 17.29 ± 0.25 (на 11.9%, $p < 0.01$).

Введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину призводить до зменшення продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мітросомальним ЕТЛ у тканинах СЗ з відтвореним ТС – до 13.7 ± 0.36 нмоль/г·с (на 11.3%, $p < 0.02$).

Таким чином, у тканинах СЗ за умов ТС nNOS справляє протективну дію щодо продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мітросомальним ЕТЛ, у той час як активність iNOS сприяє їй.

Введенні L-NAME істотно не позначається на виробленні $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ у тканинах СЗ з відтвореним ТС.

У той же час, застосування селективного інгібітору nNOS 7-NI збільшує величину цього показника – до 16.98 ± 0.27 (на 5.7%, $p < 0.05$).

Введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину, навпаки, призводить до зменшення продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ у тканинах СЗ з відтвореним ТС – до 14.55 ± 0.32 нмоль/г·с (на 9.5%, $p < 0.01$).

Тобто, підтверджуються відмінності в ефектах nNOS та iNOS: функціонування першої супроводжується обмеженням продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ у СЗ з відтвореним ТС, а другої – сприяє цьому процесу.

Примітно, що введення білим щурам субстрату NOS L-аргініну не тільки не сприяє збільшенню продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ у СЗ з відтвореним ТС, але й обмежує цей процес. Так, вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ за цих умов зменшується – до 15.02 ± 0.26 нмоль/г·с (на 6.5%, $p < 0.02$).

Відомо, що L-аргінін поряд з тетрагідробіоптерином попереджають роз'єднання переносу електронів в оксигеназних ферментах, унаслідок чого кисень стає єдиним акцептором електронів, запобігаючи тим самим утворення $\cdot\text{O}_2^-$.

Введення білим щурам субстрату NOS L-аргініну не тільки не сприяє збільшенню продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ у СЗ з відтвореним ТС, але й обмежує цей процес.

Застосування скевенджеру пероксинітриду (L-селенометіоніну) обмежує у СЗ з відтвореним ТС гіперпродукцію $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріями – до 14.47 ± 0.35 нмоль/г·с (на 10.0%, $p < 0.01$).

Обмеження вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ при дії L-селенометіоніну, очевидно, відбиває здатність пероксинітриду пригнічувати біоенергетичні процеси у клітинах (інактивувати НАДН- та сукцинат-залежні мітохондріальні ферментні комплекси (МФК), руйнувати FeS-кластерів, нітрувати аконітазу, окиснювати тіолові групи аденіннуклеотидтрансферази та креатинкінази) ((Szabó S. et al., 2007). Порушення функціонування мітохондріального ЕТЛ (особливо МФК-I) вважаються ключовими чинниками гіперпродукції $\cdot\text{O}_2^-$ внутрішньою мембраною мітохондрій (Szabó S. et al., 2007).

2.3. NO-залежні зміни процесів пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту у тканинах піднижньощелепних слинних залоз за умов відтворення травматичного сіалоаденіту

Відтворення ТС призводить до активації у тканинах ураженої СЗ процесів ПОЛ, на що вказує достовірне збільшення концентрації ТБК-реактивів до та після інкубації у прооксидантному буферному розчині відповідно на 28.3% ($p < 0.001$) та 25.3% ($p < 0.01$).

Нами виявлено, що тільки зміни функціональної активності nNOS істотно впливають на активність ПОЛ у тканинах інтактних СЗ. Так, введення селективного інгібітору nNOS 7-NI на 11.4% ($p < 0.05$) зменшує концентрацію ТБК-реактивів після інкубації гомогенату СЗ у залізо-аскорбатному буферному розчині. Раніше ми виявили роль nNOS в продукції супероксидного аніон-радикала мітросомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами у клітинах інтактною нижньощелепної СЗ.

Значно більше змінена активність NOS впливає на ПОЛ за умов відтворення ТС.

Так, введення за цих умов 7-NI підвищує концентрацію ТБК-активних сполук до інкубації на 9.89% ($p < 0.05$), що відбиває пригнічуючу роль nNOS на процеси пероксидації. Це може бути пов'язано зі здатністю nNOS попереджувати за цих умов гіперпродукцію супероксидного аніон-радикала мітохондріями та мітросомами.

У той же час, введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину зменшує концентрацію ТБК-реактивів до та після інкубації - відповідно на 14.8% ($p < 0.01$) та 15.7% ($p < 0.05$). Тобто саме активність iNOS вносить істотний внесок у інтенсифікацію процесів ПОЛ.

Примітно, що введення L-аргініну істотно не позначається на утворенні ТБК-активних сполук у гомогенаті СЗ.

Застосування L-селенометіоніну істотно зменшує концентрацію ТБК-реактивних до та після інкубації - відповідно на 16.7% ($p < 0,01$) та 17.9% ($p < 0,05$), що вказує на роль пероксинітриту в ініціації ПОЛ у СЗ за умов ТС.

Пероксинітрит здатний окиснювати NH- і SH-групи білків, ДНК, що може призводити до інактивації ряду ферментів (α_1 -інгібітора протеїназ, тканинного інгібітора металопротеїназ, Mn/Fe-СОД тощо) (Szabó S. et al., 2007). Реагуючи з іонами металів, що входять до складу СОД, пероксинітрит викликає утворення реактивного і високотоксичного іона нітронія, який, у свою чергу, утворює нітрофеноли (Hon W.M. et al., 2002). Через це порушуються функції цитоплазматичних рецепторів. У присутності пероксинітриту або продукту його розпаду утворюються тілні радикали глутатіону, в результаті чого останній перетворюється з антиоксиданту в прооксидант, який ініціює процеси ПОЛ (Kim S.H. et al., 2004).

Відтворення ТС призводить до суттєвого обмеження антиоксидантної забезпеченості тканин уражених СЗ, на що вказує достовірне збільшення приросту концентрації ТБК-активних продуктів за час півторагодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині (на 17.3%, $p < 0,02$).

Введення на тлі відтворення ТС селективного інгібітору nNOS 7-NI на 20.5% ($p < 0,01$) підвищує приріст концентрації ТБК-реактивних, що свідчить про значення nNOS у регуляції антиоксидантного стану у СЗ за умов їхнього запалення.

В експериментах *in vitro* продемонстровано, що NO може фактично сповільнювати ПОЛ, діючи як скевенджер кисневих радикалів. Передбачається, що одним з механізмів антиоксидантної дії NO, який утворюється конституційними NOS, може бути зв'язування вільних іонів заліза у складі нітрозильних комплексів (Шумаев К.Б. и соавт., 2006). При цьому інгібуються реакції вільно-радикального окиснення, що каталізуються редокс-активними іонами заліза. ПОЛ пригнічується також завдяки взаємодії NO з алкілпероксильними й алкоксильними радикалами. NO може захищати інші біологічні молекули від окисної модифікації, шляхом нітрозилування гему та відновлення оксоферилформ гемопроетидів.

У той же час, дослідження неушкоджених контрлатеральних СЗ виявило здатність nNOS обмежувати антиоксидантний потенціал (при введенні 7-NI приріст концентрації ТБК-реактивних зменшується - на 12.0% ($p < 0,05$)).

Введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину за умов відтворення ТС зменшує в уражених СЗ приріст концентрації ТБК-реактивних - на 8.2% ($p < 0,02$), що вказує на внесок iNOS у виснаження антиоксидантного потенціалу СЗ.

Введення L-аргініну істотно не позначається на величині приросту концентрації ТБК-активних сполук у гомогенаті СЗ.

Застосування L-селенометіоніну достовірно зменшує приріст концентрації ТБК-реактивних - на 22.7% ($p < 0,05$), що вказує на роль пероксинітриту в обмеженні антиоксидантних резервів у СЗ за умов ТС.

Примітно, що за умов відтворення ТС у тканинах СЗ збільшення активності антиоксидантних ферментів: СОД (на 33.3%, $p < 0,02$) і каталази (на 24.6%, $p < 0,001$) все ж таки не здатне підтримати достатній рівень антиоксидантного потенціалу та компенсувати ПОЛ, тому підвищується приріст концентрації ТБК-активних продуктів за час півторагодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині.

Відомо, що синтез СОД індукується на рівні трансляції субстратом (тобто супероксидним аніон-радикалом) (Поберезкина Н.Б. и соавт., 1989), вироблення якого істотно підвищується у цей термін як мітосомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами. Активність каталази, у свою чергу, індукується на рівні трансляції H_2O_2 (Ponrdenz E., Kahl R., 1998). У зв'язку з цим активності цих ферментів знаходяться у взаємозв'язку, тому що СОД забезпечує каталазу субстратом, а остання регенерує O_2 для потреб клітин.

Досить значні зміни активності СОД і каталази відмічаються при зміні режимів функціонування системи оксиду азоту.

Так, введення неселективного інгібітору NOS L-NAME та селективного інгібітору nNOS 7-NI достовірно підвищує активність СОД - відповідно на 27.8% ($p < 0,05$) та 33.3% ($p < 0,02$), каталази - на 25.4% ($p < 0,001$) та 23.2% ($p < 0,001$).

Відома здатність NO взаємодіяти з іоном міді активного центру СОД (Monzani E. et al., 2000). Відомо, що за умов зв'язування каталази з NO генерується ферікаталаза-NO, що є пригніченою формою ферменту (Kim S.H. et al., 2004).

Введення L-NAME, 7-NI та аміногуанідину за умов відтворення ТС збільшує в уражених СЗ активність СОД - відповідно на 37.5% ($p < 0,01$), 33.3% ($p < 0,01$) та 41.7% ($p < 0,01$).

Активність каталази також підвищується в СЗ при введенні L-NAME, 7-NI та аміногуанідину за умов відтворення ТС - відповідно на 37.4% ($p < 0,001$), 40.1% ($p < 0,001$) та 44.2% ($p < 0,001$).

При введенні L-аргініну за умов відтворення ТС в уражених СЗ достовірно обмежується активність каталази - на 10.9% ($p < 0,05$).

Застосування L-селенометіоніну збільшує активність СОД та каталази в уражених СЗ - відповідно на 41.7% ($p < 0,001$) та 45.4% ($p < 0,001$).

Реагуючи з іонами металів, що входять до складу СОД, пероксинітрит викликає утворення реактивного і високотоксичного іона нітронія, який у свою чергу зв'язується з фенольними групами і утворює нітрофеноли. У цій реакції СОД виконує роль каталізатора нітрування широкого спектра похідних фенолу, в тому числі тирозину. Утворення нітротирозинів у значній мірі визначає токсичність NO, оскільки при інактивації тирозинкінази не відбувається фосфорилування білків і порушуються функції цитоплазматичних рецепторів (Szabó S. et al., 2007).

2.4. NO-залежні зміни вмісту та співвідношення аденіннуклеотидів у тканинах піднижньощелепних слинних залоз за умов відтворення травматичного сіалоаденіту

Відтворення ТС призводить до порушення біоенергетичних процесів у тканинах ураженої СЗ, на що вказує достовірне зменшення концентрації АТФ - на 17.0% ($p < 0,02$).

Звертає на себе увагу, що зміни функціональної активності NOS істотно впливають на вміст АТФ у тканинах інтактних СЗ. Так, введення неселективного інгібітору nNOS L-NAME та селективного інгібітору nNOS 7-NI відповідно на 14.7% ($p < 0,02$) та 15.6% ($p < 0,02$) зменшують концентрацію АТФ у тканинах СЗ. Тобто NO, що продукується у порівняно незначній кількості конститутивними NOS здатний позитивно впливати на вміст макроергічних сполук у тканинах СЗ.

У той же час за умов відтворення ТС відмічаються залежні від стану функціональної активності певних ізоформ NOS зміни концентрації АТФ.

Так, введення за цих умов L-NAME і 7-NI достовірно не позначаються на концентрацію АТФ і АДФ у тканинах СЗ. У той же час, введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину достовірно збільшує концентрацію АТФ – на 18.2% ($p < 0,02$).

Примітно, що введення L-аргініну істотно не позначається на концентрації АТФ і АДФ як у гомогенаті інтактних, так і ушкоджених СЗ.

Застосування L-селенометіоніну не впливає на вміст АТФ і АДФ у тканинах інтактних СЗ, але попереджує зниження концентрації АТФ в ушкоджених СЗ. За цих умов вміст АТФ на 19.3% ($p < 0,02$) перевищує відповідну величину серії дослідів з моделюванням ТС у щурів, яким вводили плацебо. Це доводить істотну роль пероксинітриду в розвитку дефіциту макроергічних сполук у тканинах СЗ за умов ТС.

Відтворення ТС призводить до достовірного збільшення концентрації АМФ у тканинах уражених СЗ – на 42.4% ($p < 0,001$).

Зміни функціональної активності NOS також істотно позначаються на концентрації АМФ у тканинах інтактних СЗ. Так, введення неселективного інгібітору nNOS L-NAME та селективного інгібітору nNOS 7-NI відповідно на 12.1% ($p < 0,01$) та 24.2% ($p < 0,001$) збільшують концентрацію АМФ у тканинах СЗ.

Вміст АТФ також зазнає за умов відтворення ТС різноспрямованих змін, залежних від стану функціональної активності конститутивних та індукційної NOS. Так, введення за цих умов 7-NI збільшує концентрацію АМФ у тканинах СЗ – на 36.2% ($p < 0,001$). Введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину, навпаки, зменшує концентрацію АТФ – на 14.9% ($p < 0,001$).

Введення L-аргініну на концентрації АМФ у СЗ достовірно не позначається.

Застосування L-селенометіоніну не впливає на вміст АМФ у інтактних СЗ, але обмежує ріст концентрації АТФ в ушкоджених тканинах.

За цих умов концентрація АМФ на 21.3% ($p < 0,001$) поступається даним серії з моделюванням ТС у щурів, яким вводили плацебо.

Розрахунок інтегральних показників, що відбивають уміст і співвідношення аденіннуклеотидів у тканинах СЗ, дозволяє більш детально визначити характер змін біоенергетичних процесів. Слід зазначити, що сума аденіннуклеотидів у всіх дослідних серіях істотних змін не зазнавала. Більш чутливим показником виявився енергетичний потенціал.

Так, за умов відтворення ТС у тканинах СЗ відмічається зниження енергетичного потенціалу – на 6.5% ($p < 0,01$), що вказує на достовірне зниження за умов розвитку запального процесу в СЗ процесу ресинтезу макроергічних сполук, що відмічалось і при відтворенні гострого запалення СЗ при введенні карагеніну (Бондаренко В.В., 2002).

Звертає на себе увагу, що зміни функціональної активності nNOS достовірно обмежують величину енергетичного потенціалу в тканинах інтактних СЗ - на 4.9% ($p < 0,05$), що підтверджує роль NO, який синтезується конститутивними NOS, у регуляції біоенергетичних процесів у тканинах СЗ.

За умов відтворення ТС енергетичний потенціал також змінюється у залежності від стану функціональної активності конститутивних та індукційної NOS.

Так, введення за цих умов 7-NI знижує енергетичний потенціал у тканинах СЗ – на 4.8% ($p < 0,05$). У той же час, введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину, навпаки, збільшує енергетичний потенціал – на 4.9% ($p < 0,05$).

Можна припустити, що саме NO, що виробляється nNOS, бере участь у забезпеченні адаптивних змін під час розвитку ТС. За цих умов NO може ініціювати реакції з розгалуженими ланцюгами, що супроводжується переходом білків з розчинного у мембранозв'язаний стан і має велике значення для метаболічної активації внутрішньоклітинних процесів, які, зокрема, забезпечують синтез АТФ і проліферацію клітин (наприклад, каскаду реакцій, контрольованих протеїнкіназою С) (Реутов В.П. и соавт, 1998). Унаслідок цього ферменти переходять з менш активного стану (розчинна форма) у більш активне (мембранозв'язана форма).

У той же час велика кількість NO, який виробляється iNOS, пригнічує біоенергетичні процеси у СЗ, порушуючи процес ресинтезу АТФ. Відомо, що нітрозилювання FeS груп (що беруть участь в транспорті електронів від флавінового компоненту на убіхінон) в активному центрі 1-го і 2-го комплексів дихального ланцюга порушує окиснення основних субстратів тканинного дихання. Не можна виключити інгібуючої дії NO на інші флавінові ферменти, які містять FeS центри (наприклад, ацидо-КоА-дегідрогеназу, α -гліцерофосфатдегідрогеназу). У циклі трикарбонових кислот аконітаза (аконітат-гідратаза) інгібується NO, ймовірно, за рахунок зв'язування з іоном двовалентного заліза, що входить в активний центр цього ферменту (Калашников С.П. и соавт, 1999).

Звертає на себе увагу той факт, що введення субстрату NOS L-аргініну істотно не позначається на енергетичному потенціалі у тканинах як інтактних, так і ушкоджених СЗ.

Введення L-селенометіоніну достовірно попереджує зниження енергетичного потенціалу в ушкоджених СЗ. При цьому енергетичний потенціал на 5.8% ($p < 0,01$) перевищує дані серії з моделюванням ТС у щурів, яким вводили плацебо.

Тобто зниження енергетичного потенціалу в СЗ за умов ТС є пероксинітрит-залежним процесом.

Відома здатність цієї сполуки інактивувати НАДН- та сукцинат-залежні мітохондріальні ферментні комплекси (МФК), руйнувати FeS-кластери, нітрувати аконітазу, окиснювати тіолові групи аденіннуклеотидтранслокази та креатинкінази, викликати вихід із мітохондрій цитохрому с – потужного активатора апоптозу (Szabó S. et al., 2007).

РОЗДІЛ 3.

NO-залежні механізми порушень окиснювального метаболізму у слинних залозах щурів за умов спільного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію

3.1. Матеріали та методи дослідження.

Експерименти виконані на 57 білих щурах лінії Вістар масою 180-215 г. При роботі з тваринами дотримувалися вимог “Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експерименті та інших наукових цілях” (Страсбург, 20.09.1985 р.). Комісією з питань біоетики Вищого державного навчального закладу України “Українська медична стоматологічна академія” (протокол № 107 від 14.11.2012 р.) порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

Проведено 11 серій дослідів: у першій серії необхідні показники вивчали в інтактних тварин (*контрольна серія*); у другій – після відтворення хронічної інтоксикації нітратом натрію (200 мг/кг маси тіла, 30 діб); у третій – після відтворення хронічної інтоксикації фторидом натрію (10 мг/кг маси тіла; 30 діб); у четвертій – після сполученого введення нітрату натрію (200 мг/кг маси тіла) та фториду натрію (10 мг/кг маси тіла) протягом 30 діб (відтворення бінарної хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію); у п'ятій і шостій – протягом періоду 30-денної сполученої токсичної дії нітрату та фториду натрію тваринам вводилися (2 рази на тиждень) відповідно селективний інгібітор нейрональної NOS (nNOS) – 7-нітроіндазол (7-NI) виробництва "Sigma Chemical Co" (США) в дозі 30 мг/кг (Laude K. et al., 2003) та селективний інгібітор індуктибельної NOS (iNOS) – аміногуанідин виробництва "Sigma Chemical Co" (США) – в дозі 20 мг/кг (Takeuchi K. et al., 2007); у сьомій – протягом періоду 30-денної сполученої токсичної дії нітрату та фториду натрію вводився (2 рази на тиждень) субстрат NOS – L-аргінін виробництва “Kyowa Hakko Kogyo Co LTD” (Японія) – в дозі 500 мг/кг (Дробінська О. та співавт., 2004); у восьмій і дев'ятій серіях – протягом періоду 30-денної сполученої токсичної дії нітрату та фториду натрію вводилися скевенджери пероксинітриту – відповідно L-селенометіонін виробництва “Sigma-Aldrich, Inc.” (США) у дозі 3 мг/кг 2 рази на тиждень (Laude K. et al., 2003) та сечова кислота виробництва "Sigma Chemical Co" (США) у дозі 250 мг/кг 3 рази на тиждень (Durante P. et al., 2010). Евтаназію тварин проводили методом дислокації шийних хребців під ефірним наркозом.

Нітрат натрію вводили тваринам у дозі 200 мг/кг маси тіла у вигляді водного розчину. Введення здійснювали інтрагастрально за допомогою спеціального зонду щоденно протягом 30 діб. Використання цієї методики дозволяє відтворити надлишкове утворення NO та депонування його у вигляді парамагнітних комплексів з гемовим та негемовим залізом (Костенко В.О. та співавт., 2004). Рівень метгемоглобіну (визначеним ціангеміглобіновим методом) в крові становить приблизно 6-7% від загального вмісту гемоглобіну («безсимптомна» метгемоглобінемія).

Фторид натрію вводили тваринам у дозі 10 мг/кг маси тіла у вигляді 0,1% водного розчину (Костенко А.Г., Міщенко А.В., 2001). Введення здійснювали інтрагастрально за допомогою спеціального зонду щоденно протягом 30 діб.

Біохімічні методи дослідження. Активність NOS визначали за різницею концентрації нітрит-іонів (NO_2^-) до та після інкубації гомогенату тканин піднижньощелепних СЗ у середовищі, що містить L-аргінін (субстрат NOS) та нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений (НАДФН) (Nevel J.M., 1991). Концентрацію NO_2^- визначали шляхом утворення діазосполук у реакції з сульфаніловою кислотою, а потім проводили реакцію з α -нафтилетиленаміном, у результаті якої утворюються похідні червоного кольору (азобарвники).

Активність орнітиндекарбоксилази визначали за зниженням вмісту орнітину в інкубаційному середовищі методом Chinard у модифікації В.А. Храмова (1997). Метод базується на нінгідриновій реакції при $\text{pH}=1.0$ і є специфічним, оскільки значне забарвлення дають тільки орнітин, пролін та цитрулін. Інтенсивність забарвлення розчину з продуктами взаємодії нінгідрину з амінокислотами пропорційна концентрації орнітину в досліджуваному розчині. Оптичну щільність визначали при $\lambda=490$ нм.

Утворення супероксидного аніон-радикала оцінювали в гомогенаті СЗ при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм у модифікації О.І. Цебржинського (2002) з використанням спектрофотометру СФ-46 з такими індукторами: НАДН – для оцінки продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ; НАДФН – для оцінки продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним ЕТЛ. Рівень ПОЛ у тканинах оцінювали за утворенням у реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними продуктами забарвленого триметінового комплексу до і після 1,5-годинної інкубації у залізо-аскорбатному буферному розчині (Кайдашев І.П. та співавт., 2003). Активність антиоксидантної системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час півторагодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю АО ферментів – супероксиддисмутази (СОД) (Брусов О.С., Герасимов А.М., Панченко Л.Ф., 1976) та каталази (Архипова О.Г., 1988).

Активність α -амілази визначали за методикою Каравея за допомогою набору реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна, м. Дніпропетровськ) (Меньшиков В.В. та співавт., 1987).

Отримані дані піддавали статистичній обробці (Гланц С., 1999; Реброва О.Ю., 2002). Для перевірки розподілу на нормальність було застосовано розрахунок критерію Шапіро-Вілکا. Якщо дані відповідали нормальному розподілу, то для їх порівняння використовували t-критерій Ст'юдента. У випадку, коли ряди даних не підлягали нормальному розподілу, статистичну обробку здійснювали, використовуючи непараметричний метод – тест Мана-Вітні. Статистичні розрахунки проводили з використанням програм "Microsoft Excel 2007" та "StatisticSoft 6.0".

3.2. Зміни окиснювальних процесів у тканинах слинних залоз білих щурів за умов спільного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію

Введення нітрату натрію протягом 30 діб достовірно знижує активність NOS з 4.09 ± 0.12 мкмоль $[\text{NO}_2^-]/\text{г} \cdot \text{хв.}$ – до 3.62 ± 0.16 мкмоль $[\text{NO}_2^-]/\text{г} \cdot \text{хв.}$ (на 11.5%, $p < 0.05$).

Такі зміни відбивають мету функціонуванню циклу оксиду азоту – обмежують за умов екзогенного надходження потужного джерела NO інтенсивність ендогенного синтезу цієї сполуки за участю NOS (Jensen F.B., 2009; Костенко В.О. та співавт., 2011; Stefano G.B., Kream R.M., 2011; Zuckerbraun B.S. et al., 2011).

За нашими даними, цей процес супроводжується активацією у тканинах СЗ реакцій аргіназного шляху метаболізму L-аргініну, на що вказує підвищення активності орнітиндекарбоксилази – з 267.11 ± 7.21 до 311.12 ± 8.47 нмоль/г·хв. (на 16.5%, $p < 0.01$). Цей фермент є ключовим у процесі синтезу поліамінів, які регулюють процеси реплікації та транскрипції, і як наслідок проліферацію клітин та синтез білків (Moinard C. et al., 2005). За даними літератури, неокисний (аргіназний) шлях ефективно конкурує з NOS за субстрат і, таким чином, обмежує продукцію NO (Wu G. et al., 2009).

Введення фториду натрію протягом 30 діб супроводжується достовірним збільшенням активності NOS – до 4.61 ± 0.18 мкмоль $[\text{NO}_2^-]/\text{г} \cdot \text{хв.}$ (на 12.7%, $p < 0.05$). Активність орнітиндекарбоксилази зменшується – до 244.67 ± 6.59 нмоль/г·хв. (на 8.4%, $p < 0.01$).

Раніше повідомлялося, що у тканинах щура іон F^- зворотно та неконкурентно здатний інгібувати аргіназу (Геворкян М.Л. та співавт., 2008).

За умов сполученої дії нітрату та фториду натрію активність NOS достовірно збільшується – до 5.18 ± 0.21 мкмоль $[\text{NO}_2^-]/\text{г} \cdot \text{хв.}$, що перевищує на 26.7% ($p < 0.001$) дані інтактної групи та на 43.1% ($p < 0.001$) – результати другої серії.

Активність орнітиндекарбоксилази за цих умов зменшується – до 236.32 ± 7.13 нмоль/г·хв., що на 11.5% ($p < 0.02$) поступається даним інтактної групи та на 24.0% ($p < 0.001$) – результатам другої серії.

Отримані дані вказують на той факт, що введення фториду натрію порушує механізм ауторегуляції утворення оксиду азоту в організмі при надлишковому надходженні солей азотної кислоти. Через це надмірна продукція NO шляхом відновлення нітрат- та нітрит іонів не супроводжується обмеженням його вироблення NOS. Очевидно, реалізації цього ефекту сприяє також пригнічення аргінази та залежних від неї біохімічних реакцій, на що вказує зниження активності у СЗ орнітиндекарбоксилази.

Введення нітрату натрію протягом 30 діб достовірно підвищує вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним ЕТЛ у тканинах СЗ – до 19.25 ± 0.39 нмоль/г·с (на 21.4%, $p < 0.001$) та мітохондріальним ЕТЛ – до 17.16 ± 0.34 нмоль/г·с (на 21.9%, $p < 0.001$). Введення фториду натрію протягом 30 діб достовірно не позначається на продукції у тканинах СЗ $\cdot\text{O}_2^-$ як мікросомальним, так і мітохондріальним ЕТЛ.

За умов сполученої дії нітрату та фториду натрію вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним ЕТЛ у тканинах СЗ істотно збільшується – до 21.12 ± 0.34 нмоль/г·с, що перевищує на 33.2% ($p < 0.001$) дані інтактної групи та відповідно на 9.7% ($p < 0.01$) та 25.8% ($p < 0.001$) – результати другої та третьої серій.

За цих умов продукція $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним ЕТЛ у тканинах СЗ також істотно збільшується – до 18.94 ± 0.32 нмоль/г·с, що перевищує на 34.5% ($p < 0.001$) дані інтактної групи та відповідно на 10.4% ($p < 0.01$) та 25.7% ($p < 0.001$) – результати другої та третьої серій.

Порушення функціонування мітохондріального ЕТЛ вважаються ключовим фактором надлишкової продукції $\cdot\text{O}_2^-$ внутрішньою мембраною мітохондрій (Murphy M.P., 2009).

Введення нітрату натрію протягом 30 діб істотно впливає на стан ПОЛ у тканинах СЗ, що підтверджується достовірним збільшенням концентрації ТБК-реактивів до та після інкубації у прооксидантному буферному розчині – відповідно до 32.3 ± 1.1 мкмоль/г (на 42.3%, $p < 0.001$) та 43.1 ± 1.6 мкмоль/г (на 43.7%, $p < 0.001$).

При цьому відмічається суттєве обмеження антиоксидантної забезпеченості тканин СЗ, на що вказує достовірне збільшення приросту концентрації ТБК-активних продуктів за час півторогодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині – до 10.8 ± 0.4 мкмоль/г (на 47.9%, $p < 0.001$).

Це також підтверджується істотним зменшенням активності антиоксидантних ферментів – СОД та каталази – відповідно до 0.17 ± 0.02 од. акт. (на 22.7%, $p < 0.05$) та 2.50 ± 0.12 мкат/г (на 13.5%, $p < 0.05$).

Зниження активності СОД і каталази може бути пов'язано з блокуванням відповідно йонів міді та заліза (в активному центрі ферментів) оксидом азоту, що утворюється в процесі метаболізму нітрат- та нітрит-іонів (Ponrdenz E., Kahl R., 1998; Kim Y.S., Han S., 2000; Monzani E. et al., 2000).

Введення фториду натрію протягом 30 діб також достовірно активує ПОЛ у тканинах СЗ, на що вказує збільшення концентрації ТБК-реактивів до та після інкубації у прооксидантному буферному розчині – відповідно до 34.5 ± 1.4 мкмоль/г (на 52.0%, $p < 0.001$) та 46.8 ± 1.9 мкмоль/г (на 56.0%, $p < 0.001$).

Виявляється суттєве обмеження антиоксидантної забезпеченості тканин СЗ, оскільки приріст концентрації ТБК-активних продуктів за час півторогодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині достовірно зростає – до 12.3 ± 0.5 мкмоль/г (на 68.5%, $p < 0.001$). Зниження антиоксидантного захисту у тканинах СЗ також підтверджується достовірним зменшенням активності каталази – до 2.61 ± 0.07 мкат/г (на 9.7%, $p < 0.05$).

Відомо, що каталаза є гемопротеїном, простатичною групою якого є гем, який містить іон тривалентного заліза. При взаємодії з останнім фторид-іон конкурує з киснем за лігандне місце, пригнічуючи активність ферменту (Цебржинский О.И., 1993).

За умов сполученої дії нітрату та фториду натрію концентрації ТБК-реактивів до та після інкубації у прооксидантному буферному розчині достовірно підвищуються – відповідно до 35.8 ± 1.2 мкмоль/г (на 57.7%, $p < 0.001$) та 50.1 ± 1.4 мкмоль/г (на 67.0%, $p < 0.001$). При цьому величина концентрації ТБК-реактивів після інкубації достовірно перевищує (на 16.2%, $p < 0.01$) результат другої серії.

За умов сполученого впливу нітрату та фториду натрію прогресує порушення антиоксидантної забезпеченості тканин СЗ, оскільки приріст концентрації ТБК-активних продуктів за час півторогодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині підвищується до 14.3 ± 0.4 мкмоль/г, що на 95.9% ($p < 0.001$) перевищує дані інтактної групи та відповідно на 32.4% ($p < 0.001$) та 16.3% ($p < 0.01$) – результати другої та третьої серій.

Розвиток антиоксидантної недостатності у тканинах СЗ також підтверджується істотним зменшенням активності антиоксидантних ферментів – СОД та каталази – відповідно до 0.15 ± 0.01 од. акт. (на 31.8%, $p < 0.001$) та 2.34 ± 0.07 мкат/г (на 19.0%, $p < 0.001$). При цьому активність каталази на 10.3% ($p < 0.02$) поступається даним третьої серії.

Введення нітрату натрію протягом 30 діб істотно не впливає на активність α -амілази у тканинах піднижньощелепної СЗ. Введення фториду натрію протягом 30 діб зменшує активність α -амілази у тканинах піднижньощелепної СЗ на 8.89% ($p < 0.05$) – з 70.32 ± 1.97 мг/год \times г – до 64.06 ± 2.04 мг/год \times г.

За умов сполученої дії нітрату та фториду натрію активність α -амілази у тканинах СЗ достовірно знижується – до 60.11 ± 1.89 мг/год \times г, що поступається на 14.5% ($p < 0.01$) даним інтактної групи та на 10.8% ($p < 0.05$) – результату другої серії.

3.3. Вплив інгібіторів NO-синтаз на окиснювальні процеси у тканинах слинних залоз білих щурів за умов спільного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію

За нашим припущенням, введення надлишкової кількості попередників NO (нітратів), а також інгібітору аргінази фториду натрію, що втручаються у функціонування циклу оксиду азоту та сполучених з ним метаболічних процесів, може істотно змінювати рівень продукції NO через порушення функціонування механізму ауторегуляції рівня NO. За цих умов можна очікувати змін активності NO-синтаз та ферментів аргіназного шляху метаболізму L-аргініну та розвиток залежних від них розладів окиснювальних процесів у тканинах СЗ щурів за умов спільного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію.

Нами виявлено, що введення інгібіторів NOS 7-NI та аміногуанідину у динаміці сполученого надлишкового введення нітрату та фториду натрію знижує активність NOS у тканинах СЗ – відповідно на 48.2% ($p < 0.001$) та 75.1% ($p < 0.001$) у порівнянні з даними першої серії та на 59.1% ($p < 0.001$) та 80.3% ($p < 0.001$) у порівнянні з даними четвертої серії.

Введення за цих умов селективного інгібітору nNOS 7-NI достовірно не впливає на величину активності орнітиндекарбоксилази в тканинах СЗ, у той час як введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину – на 10.0% ($p < 0.05$) підвищує активність цього ферменту в порівнянні з даними четвертої серії.

Таким чином, за умов надмірного утворення NO внаслідок відновлення нітрат- та нітрит-іонів, що повинно було б за механізмом роботи циклу оксиду азоту знизити активність NOS (Jensen F.B., 2009; Костенко В.О. та співавт., 2011; Stefano G.B., Kream R.M., 2011; Zuckerbraun B.S. et al., 2011), та за умов пригнічення активності аргіназ фторид-іонами (Petthe S. et al., 2002; Tormanen C.D., 2003; Геворкян М.Л. та співавт., 2008), несподівано виявляється роль iNOS у регуляції реакцій аргіназного шляху метаболізму L-аргініну. За нашими даними, за вказаних умов функціональна активність iNOS у певній мірі негативно позначається на активності орнітиндекарбоксилази, що усувається введенням селективного інгібітору iNOS аміногуанідину.

Крім того, оскільки орнітиндекарбоксилаза є ключовим ферментом синтезу поліамінів, які регулюють процеси реплікації та транскрипції, і як наслідок проліферацію клітин та синтез білків (Moinard C. et al., 2005), селективне пригнічення iNOS позитивно позначається на стані процесів репаративної регенерації у СЗ.

Введення селективного інгібітору nNOS 7-NI за умов бінарної 30-денної інтоксикації нітратом і фторидом натрію достовірно не впливає на вироблення у тканинах СЗ $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним ЕТЛ, але збільшує його продукцію мітохондріальним ЕТЛ – на 13.1% ($p < 0.01$) у порівнянні з даними четвертої серії.

Введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину бінарної 30-денної інтоксикації нітратом і фторидом натрію, навпаки, зменшує вироблення у тканинах СЗ $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним і мітохондріальним ЕТЛ – відповідно на 12.1% ($p < 0.01$) та 10.9% ($p < 0.02$) у порівнянні з даними четвертої серії.

Це вказує, що гіперактивація продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним і мітохондріальним ЕТЛ при сполученій дії зазначених токсикантів, у певній мірі, пов'язана з утворенням NO через активацію iNOS. Це є прикладом

дизрегуляції у реакціях циклу оксиду азоту та призводить к підвищенню у тканинах його концентрації та негативних ефектів.

Введення селективного інгібітору nNOS 7-NI під час відтворення хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію достовірно не впливає на показники ПОЛ – концентрацію ТБК-реактантів, але підвищує приріст концентрації останніх за час півторогодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині (на 17.5%, $p < 0,01$) у порівнянні з даними четвертої серії.

Це пов'язано з певним обмеженням у тканинах СЗ внаслідок дії 7-NI антиоксидантного потенціалу, що вказує на роль NO, який продукується nNOS, як чинника, що забезпечує підтримку антиоксидантного захисту.

У той же час дія 7-NI не призводить до достовірних змін активності у тканинах СЗ СОД і каталази.

Введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину за цих умов зменшує концентрацію у тканинах СЗ ТБК-реактантів до та після інкубації – відповідно на 19.6% ($p < 0,01$) та 20.0% ($p < 0,001$). Тобто саме активність iNOS вносить істотний внесок у інтенсифікацію процесів ПОЛ. При цьому введення аміногуанідину також зменшує приріст концентрації ТБК-реактантів за час інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині – на 21.0% ($p < 0,001$), що вказує на зв'язок розвитку антиоксидантної недостатності з функціонуванням iNOS та виявляє протекторну дію її інгібітору аміногуанідину.

Це підтверджується також достовірним підвищенням при дії аміногуанідину активності антиоксидантних ферментів – СОД і каталази – відповідно на 40.0% ($p < 0,02$) та 15.0% ($p < 0,05$) у порівнянні з даними четвертої серії.

Введення за умов спільного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію селективного інгібітору nNOS 7-NI достовірно знижує активність α -амілази в тканинах піднижньощелепних СЗ – на 24.0% ($p < 0,001$) у порівнянні з даними інтактної групи та на 11.1% ($p < 0,05$) – з результатом четвертої серії.

Це узгоджується з даними літератури щодо ролі nNOS у забезпеченні білоксинтезуючої функції СЗ (Lomniczia A. et al., 1998; Sayardoust S., Ekström J., 2003; Shimomura H. et al., 2004; Proctor G.B., Carpenter G.H., 2007).

У той час як введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину – на 13.3% ($p < 0,02$) підвищує активність цього ферменту в порівнянні з даними четвертої серії.

3.4. Вплив L-аргініну на окиснювальні процеси у тканинах слинних залоз білих щурів за умов спільного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію

Якщо сполучене введення нітрату та фториду натрію протягом 30 діб призводить до суттєвого підвищення активності NOS та орнітиндекарбоксилази у тканинах піднижньощелепних СЗ, то при призначенні за цих умов L-аргініну достовірні зміни активності ферментів уже не спостерігаються.

Отримані нами дані не виявляють феномен «аргінінового парадоксу» при оцінці активності NOS у тканинах піднижньощелепних СЗ щурів за умов надходження L-аргініну під час відтворення бінарної інтоксикації нітратом та фторидом натрію. Проте введення L-аргініну за цих умов у певній мірі попереджує достовірне зниження активності орнітиндекарбоксилази, що, вочевидь, пов'язано з оптимізацією функціонування аргіназного шляху метаболізму цієї амінокислоти.

Введення білим щурам L-аргініну за умов бінарної 30-денної інтоксикації нітратом та фторидом натрію достовірно не впливає на вироблення у тканинах СЗ $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним ЕТЛ та зменшує його продукцію мітохондріальним ЕТЛ – на 10.1% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними четвертої серії.

Отриманий результат підтверджує здатність L-аргініну попереджати роз'єднання переносу електронів в оксигеназних ферментах, запобігаючи тим самим утворенню $\cdot\text{O}_2^-$ (Xia Y. et al., 1998).

Введення тваринам L-аргініну під час відтворення хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію достовірно не позначається на концентрації ТБК-реактантів, але значно знижує приріст концентрації останніх за час півторогодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині (на 11.2%, $p < 0,05$) у порівнянні з даними четвертої серії.

Це вказує на здатність L-аргініну обмежувати зниження антиоксидантного потенціалу в тканинах СЗ при дії токсичних агентів, що також підтверджується достовірним підвищенням у тканинах СЗ активності каталази – 13.2% ($p < 0,05$) у порівнянні з даними четвертої серії.

Введення тваринам L-аргініну під час відтворення бінарної хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію достовірно підвищує активність α -амілази у тканинах піднижньощелепних СЗ – на 10.9% ($p < 0,05$) у порівнянні з даними четвертої серії.

3.5. Вплив скевенджерів пероксинітриту на окиснювальні процеси у тканинах слинних залоз білих щурів за умов спільного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію

Ми дослідили вплив скевенджерів пероксинітриту L-селенометіоніну та сечової кислоти на продукцію $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним та мітохондріальним ЕТЛ у тканинах піднижньощелепних СЗ за умов бінарної 30-денної інтоксикації нітратом та фторидом натрію. Введення білим щурам L-селенометіоніну за цих умов достовірно знижує вироблення у тканинах СЗ $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним та мітохондріальним ЕТЛ – відповідно на 23.9% ($p < 0,001$) та 14.9% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними четвертої серії.

При введенні сечової кислоти також достовірно знижується продукція у тканинах СЗ $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним та мітохондріальним ЕТЛ – відповідно на 11.9% ($p < 0,01$) та 19.7% ($p < 0,001$) у порівнянні з даними четвертої серії.

Обмеження генерації $\cdot\text{O}_2^-$ мікросомальним та мітохондріальним ЕТЛ при дії скевенджерів пероксинітриту, вочевидь, відбиває здатність $\cdot\text{ONOO}^-$ порушувати у клітинах функціонування цих ланцюгів (інактивувати НАДН- та НАДФН-залежні оксидоредуктази, руйнувати FeS-кластери) (Szabó S. et al., 2007). У мітохондріях пероксинітрит окиснює цистеїнові та метіонінові залишки білків, інгібує комплекси I та II, аконітазу, АТФ-азу, Мп-СОД, креатинкіназу та глутатіонпероксидазу, знижує рівень відновленого глутатіону (Дмитренко Н.П., Холиан А., 2005; Szabó S. et al., 2007).

Введення тваринам L-селенометіоніну під час відтворення хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію достовірно зменшує концентрацію ТБК-реактивних до інкубації – на 22.1% ($p<0,01$), після інкубації – на 21.4% ($p<0,01$). Величина приросту концентрації ТБК-активних сполук за час півторигодиної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині – знижується на 19.6% ($p<0,01$) у порівнянні з даними четвертої серії.

Введення щурам сечової кислоти під час відтворення хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію також достовірно зменшує концентрацію ТБК-реактивних до інкубації – на 20.4% ($p<0,01$), після інкубації – на 20.6% ($p<0,001$). Величина приросту концентрації ТБК-активних сполук за час півторигодиної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині – знижується на 21.0% ($p<0,001$) у порівнянні з даними четвертої серії.

Достовірне зменшення приросту концентрації ТБК-активних сполук за час інкубації при введенні скевенджерів пероксинітриту вказує на їхню здатність обмежувати зниження антиоксидантного потенціалу в тканинах СЗ при дії токсикантів, що також підтверджується достовірним підвищенням у тканинах активності АО ферментів.

Так, при введенні тваринам L-селенометіоніну під час відтворення хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію активність СОД і каталази збільшується – відповідно на 33.3% ($p<0,01$) та 16.2% ($p<0,02$) у порівнянні з даними четвертої серії. При введенні сечової кислоти активність зазначених ферментів – збільшується відповідно на 46.7% ($p<0,001$) та 17.1% ($p<0,02$) у порівнянні з даними четвертої серії.

Введення тваринам L-селенометіоніну та сечової кислоти під час відтворення бінарної хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію підвищує у тканинах піднижньощелепних СЗ активність α -амілази – відповідно на 13.4% ($p<0,02$) та 14.4% ($p<0,01$) у порівнянні з даними четвертої серії.

У той же час, введення L-селенометіоніну та сечової кислоти достовірно не позначається на змінах активності у тканинах піднижньощелепних СЗ активності орнітиндекарбоксилази.

РОЗДІЛ 4.

Роль компонентів системи оксиду азоту у патогенезі експериментального остеопорозу за умов надлишкового надходження в організм нітрату натрію

4.1. Матеріали та методи дослідження.

Експерименти виконані на 56 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-230 г. При роботі з тваринами дотримувалися вимог «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експерименті та інших наукових цілях» (Страсбург, 20.09.1985 р.). Комісією з питань біоетики Вищого державного навчального закладу України “Українська медична стоматологічна академія” (протокол № 113 від 10.12.2013 р.) порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

Проведено десять серій дослідів: у першій серії необхідні показники вивчали в інтактних тварин (контрольна серія); у другій – після відтворення хронічної інтоксикації нітратом натрію (200 мг/кг маси тіла, 60 діб); у третій – після відтворення експериментального глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу; у четвертій – експериментальний глюкокортикоїд-індукований остеопороз відтворювали на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію; у п'ятій, шостій і сьомій – за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію та моделювання експериментального глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу щурам вводили відповідно неселективний інгібітор NOS – метиловий ефір нітро-L-аргініну (L-NAME), селективний інгібітор iNOS – аміногуанідин та субстрат NO-синтазної реакції – L-аргінін; у восьмій – за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію та моделювання експериментального глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу тваринам вводили скевенджер пероксинітриту L-селенометіонін. Евтаназію тварин проводили методом дислокації шийних хребців під ефірним наркозом.

Нітрат натрію вводили тваринам у дозі 200 мг/кг маси тіла у вигляді водного розчину. Введення здійснювали інтрагастрально за допомогою спеціального зонду щоденно протягом 60 діб. Використання цієї методики дозволяє відтворити надлишкове утворення NO та депонування його у вигляді парамагнітних комплексів з гемовим та негемовим залізом (Костенко В.О. та співавт., 2004). Рівень метгемоглобіну (визначеним ціангеміглобіновим методом) в крові становить приблизно 6-7% від загального вмісту гемоглобіну («безсимптомна» метгемоглобінемія).

Для моделювання експериментального глюкокортикоїдного остеопорозу щурам через добу (протягом 45 діб) внутрішньом'язово вводили 2,5% суспензію гідрокортизону ацетату виробництва ЗАТ "Харківське підприємство по виробництву імунобіологічних і лікарських препаратів "Біолік" (м. Харків, Україна) в дозі 50 мг/кг маси тіла (Батура І.О., 2005). При моделюванні остеопорозу на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію гідрокортизон ацетат вводили, починаючи з 16 доби інтоксикації.

Неселективний інгібітор NOS – метиловий ефір нітро-L-аргініну (N ω -nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME) виробництва "Sigma Chemical Co" (США) вводили внутрішньоочеревинно в дозі 5 мг/кг (Laude K. et al., 2003). Селективний інгібітор індукційної NO-синтази – аміногуанідин виробництва "Sigma Chemical Co" (США) вводили внутрішньоочеревинно в дозі 20 мг/кг (Takeuchi K. et al., 2007). Субстрат NO-синтазної реакції – L-аргінін (субстанція виробництва "Kyowa Hakko Kogyo Co LTD" (Японія) вводили внутрішньоочеревинно в дозі 100 мг/кг

(Дробінська О. та співавт., 2004). Скевенджер пероксинітриту L-селенометіонін виробництва “Sigma-Aldrich, Inc.” (США) вводили внутрішньоочередово в дозі 3 мг/кг (Laude K. et al., 2003). Усі сполуки вводили внутрішньоочередово 2 рази на тиждень протягом часу відтворення глюкокортикоїдного остеопорозу.

У дев'ятій серії дослідів для збагачення раціону тварин пектином використовували сухий яблучний пектин виробництва “Herbstreith & Fox KG Pektin-Fabriken” (Німеччина), який додавали в їжу із розрахунку 80 г/кг корму (Pirman T. et al., 2009) в період ранкового годування протягом часу відтворення ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію.

У десятій серії дослідів до раціону щурів додавали пектиновмісне борошно вівсяної крупи (вміст білка – $6,5 \pm 0,8\%$, вміст крохмалю – $67,6 \pm 0,7\%$, вміст слизових речовин – $5,10 \pm 0,06\%$) із розрахунку 100 г/кг корму (згідно з патентом України № 63237) в період ранкового годування протягом часу відтворення ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію.

Біохімічні методи дослідження. Кісткову тканину знежирювали 3 рази ацетоном, 3 рази сумішшю хлороформу та метанолу (1:1) та 3 рази ефіром. Суху кісткову тканину гомогенізували в ступці. Далі в отриманому порошку проводили визначення органічних компонентів кісткової тканини.

Стан колагену визначали за вмістом у тканині кісток вільного оксипроліну (Тетянец С.С., 1985). Стан неколагенових білків (протеогліканів та фукоглікопротеїнів) кісткової тканини оцінювали шляхом визначення їх мономерів фукози (Леонтьев В.К., Гайдамака А.Н., 1975) та гексуронової кислоти (Шараев П.Н., 1987).

Активності лужної фосфатази, кислої фосфатази та її кісткової (тартратрезистентної) ізоформи визначали кінетичним методом з використанням наборів реактивів фірми «Ольвекс діагностикум» (Росія).

Концентрацію загального кальцію у плазмі крові та сечі визначали фотометрично з використанням набору реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна). Екскреція кальцію розраховували згідно з рекомендаціями О. Шюка (1981) за умов спонтанного діурезу. Тварини знаходилися у метаболічних клітках з вільним доступом до води та корму, забір сечі проводився за 24 год.

Визначення остеометричних характеристик кісток. Виділяли та скелетували великогомілкові кістки, а також третій поперековий хребець. Проводили їхню остеометрію за допомогою штангенциркулю з точністю до 0,02 мм (Лузин В.И. та співавт., 2008). З метою інтеграції ростових параметрів кісток, міцнісних властивостей мікроструктури та мінерального балансу (Пикалюк В.С., 2007; Лузин В.И. та співавт., 2008) розраховували індекс Simon як співвідношення максимальної довжини кістки (для хребця – висота його тіла) і кубічного кореня маси кісткового органу.

Визначення біофізичних характеристик кісток. Визначали біофізичні властивості цілих сухих кісток, які кількісно відображають щільність структурної композиції кісткової речовини: щільність і мінеральну насиченість. Ступінь мінералізації кісткової речовини оцінювали за показником зольності. Об'єм кісток визначали за допомогою градуїрованої пробірки за об'ємом витісненої рідини. Озолення кісток виконували у муфельній печі при температурі 520°C протягом 12 годин.

Визначення біомеханічних властивостей великогомілкових кісток здійснювали шляхом випробовування на згин за 3-точковою схемою за допомогою деформаційної установки МРК-1. За діаграмою проводили розрахунок біомеханічних характеристик кісткової тканини: модуль пружності Юнга, межа міцності, відносна залишкова деформація до руйнування.

Гістологічні та морфометричні методи дослідження. Перед виготовленням мікропрепаратів проводили фіксацію фрагментів кісток у 10% розчині нейтрального формаліну протягом 48 годин. Декальцинацію проводили у 4% розчині трилону Б (етилендіамінтетраацетату) (Пикалюк В.С., 2007). Після цього матеріал проводили через батарею спиртів зростаючої концентрації, через хлороформ та заливали у парафін. З парафінових блоків виготовляли зрізи 4-6 мкм завтовшки, які забарвлювали гематоксиліном та еозином.

Морфометричне дослідження було проведено у відповідності з принципами системного кількісного аналізу. Визначали такі морфометричні показники: густину клітинних елементів за методом стандартних площ ($S=0,1 \text{ мм}^2$); відносну кількість остеобластів серед усіх клітинних елементів тканини (Автанділов Г.Г., 2002).

Отримані дані піддавали статистичній обробці (Гланц С., 1999; Реброва О.Ю., 2002). Для перевірки розподілу на нормальність було застосовано розрахунок критерію Шапіро-Вілکا. Якщо дані відповідали нормальному розподілу, то для їх порівняння використовували t-критерій Ст'юдента для незалежних вибірок. У випадку, коли ряди даних не підлягали нормальному розподілу, статистичну обробку здійснювали, використовуючи непараметричний метод – тест Мана-Вітні. Статистичні розрахунки проводили з використанням програм «Microsoft Excel 2007» та «StatisticSoft 6.0».

4.2. Метаболічні та структурно-функціональні зміни кісткової тканини при відтворенні експериментального остеопорозу за умов надлишкового утворення оксиду азоту із екзогенного попередника (модель хронічної інтоксикації нітратом натрію)

У процесі ремоделювання кісткової тканини активовані остеокласти за участю лізосомальних ферментів резорбують поверхню кістки, після чого порожнина, що утворилася, заповнюється компонентами органічного матриксу та кальцій-фосфорними солями (Жилкин Б.А. та співавт., 2003). У процесі ремоделювання значна роль належить як колагену, так і неколагеновим білкам: глікопротеїнам і протеогліканам (Білець М.В., 2007). Останні взаємодіють з колагеном, еластином і обумовлюють зв'язок колагену та кристалів апатитів, за рахунок чого забезпечують механічні властивості кісток.

Введення нітрату натрію протягом 60 діб істотно не позначається на концентрації вільного оксипроліну в тканині великогомілкової кістки та хребців.

Відтворення глюкокортикоїдного ОП у щурів збільшує концентрацію вільного оксипроліну в тканині ВГК (на 12.3%, $p < 0.02$), але достовірно не змінює величину цього показника у хребцях.

Моделювання експериментального ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію супроводжується суттєвим підвищенням вмісту вільного оксипроліну в тканині ВГК, який на 25.9% ($p < 0.001$) перевищує результат інтактної групи тварин, на 21.5% ($p < 0.001$) – другої серії, та на 12.1% ($p < 0.001$) – третьої серії дослідів.

Концентрація вільного оксипроліну також достовірно збільшується при дослідженні за цих умов кісткової тканини хребців, перевищуючи на 16.5% ($p < 0.01$) дані інтактної групи тварин, на 15.6% ($p < 0.01$) – другої серії, та на 8.4 % ($p < 0.05$) – третьої серії дослідів.

При дослідженні вмісту фукози в кістковій тканині ВГК та хребців достовірних відмінностей отриманих результатів при порівнянні результатів різних експериментальних серій не виявлено.

Введення нітрату натрію протягом 60 діб також істотно не позначається на концентрації гексуронових кислот у тканині ВГК та хребців.

Відтворення ОП у щурів збільшує вміст гексуронових кислот в тканині великогомілкової кістки (на 11.2%, $p < 0.05$), але достовірно не змінює величину цього показника у хребцях.

Моделювання експериментального ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію супроводжується істотним підвищенням вмісту гексуронових кислот в тканині ВГК, який на 24.1% ($p < 0.001$) перевищує результат інтактної групи тварин, на 12.6% ($p < 0.02$) – другої серії, та на 11.5% ($p < 0.01$) – третьої серії дослідів.

У хребцях концентрація гексуронових кислот достовірно за цих умов достовірно перевищує результат інтактної групи – на 21.1% ($p < 0.01$).

Порушення процесів ремоделювання кістки, як правило, супроводжується виникненням відхилень у рівні низки біохімічних маркерів. Проте відтворення ізольованої 60-денної інтоксикації нітратом натрію та ізольованого глюкокортикоїдного ОП не призводить до достовірних змін маркеру формування кістки – активності лужної фосфатази, та маркерів резорбції – активності кислої фосфатази та її тартратрезистентної ізоформи.

Моделювання ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію супроводжується зміною показників маркерів резорбції кістки: збільшенням активності кислої фосфатази та її кісткової ізоформи – тартратрезистентної кислої фосфатази – відповідно на 45.9% ($p < 0.01$) і 44.3% ($p < 0.01$) у порівнянні з даними першої серії. Проте за цих умов активність лужної фосфатази достовірно не змінюється.

Звертає на себе увагу той факт, що в усіх серіях дослідів відсутні достовірні зміни величини концентрації загального кальцію у плазмі крові та сечі, а також його екскреції нирками.

При проведенні остеометричних досліджень ВГК ми виявили, що відтворення ізольованої 60-денної інтоксикації нітратом натрію достовірно не позначається на величинах максимальної довжини та маси нативної кістки, індексі Simon.

Відтворення ізольованого ОП також істотно не змінює максимальну довжину та масу нативної ВГК, проте виявляє достовірне підвищення (на 6.1%, $p < 0.05$) такого чутливого показника як індекс Simon (співвідношення максимальної довжини і кубічного кореня маси кісткового органу), що інтегрує ростові параметри кісток, міцнісні властивості мікроструктури та мінерального балансу.

При оцінці остеометричних показників кісток при відтворенні ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію звертає на себе увагу зниження маси нативної ВГК – відповідно на 38.0% ($p < 0.01$) і 37.9 % ($p < 0.01$) у порівнянні з даними першої та другої серії.

За цих умов істотно підвищується величина індексу Simon при розрахунку показників ВГК як у порівнянні з даними інтактної групи – на 11.2% ($p < 0.001$), так і інших експериментальних серій: другої – на 12.1% ($p < 0.01$) і третьої – на 4.8 % ($p < 0.05$).

При дослідженні показників структурної композиції кісток ми виявили, що відтворення ізольованої 60-денної інтоксикації нітратом натрію суттєво не позначається на показниках щільності ВГК, їх мінеральної насиченості та зольності.

При ізольованому моделюванні ОП щільність ВГК достовірно знижується – на 13.1 % ($p < 0.05$) у порівнянні з даними першої групи.

Відтворення ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію супроводжується істотним зменшенням величини щільності ВГК – на 23.8% ($p < 0.001$) в порівнянні з даними першої серії, на 24.7 % ($p < 0.02$) – другої серії, на 12.3 % ($p < 0.05$) – третьої серії дослідів. При цьому, мінеральна насиченість ВГК – на 19.6% ($p < 0.02$) – поступається величині першої серії дослідів. У той же час, у всіх серіях дослідів істотних змін відсотка зольності ВГК ми не виявили.

При оцінці біомеханічних властивостей ВГК при відтворенні ОП величини модулю Юнга та межі міцності достовірно не змінюються, відносна залишкова деформація до руйнування – знижується на 79.5% ($p < 0.05$) у порівнянні з даними першої серії. Це вказує на зменшення пластичності кісткової тканини за умов моделювання глюкокортикоїдного ОП.

Відтворення ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію супроводжується істотним зниженням модуля Юнга, що характеризує пружні властивості ВГК, – на 63.0% ($p < 0.05$), межі міцності – на 41.5% ($p < 0.05$) у порівнянні з даними першої серії. Проте показник відносної залишкової деформації до руйнування достовірно не змінюється.

При проведенні остеометричних досліджень третього поперекового хребця ми виявили, що відтворення ізольованої 60-денної інтоксикації нітратом натрію достовірно не позначається на величинах висота тіла та маси нативного хребця, індексі Simon.

Відтворення ізольованого ОП також істотно не змінює значення висоти тіла та маси хребця, проте виявляє достовірне підвищення (на 3.6%, $p < 0.05$) індексу Simon.

При оцінці остеометричних показників хребців при відтворенні ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію також звертає на себе увагу зниження маси нативного хребця – на 26.7% ($p<0.001$) у порівнянні з даними першої серії. За цих умов істотно підвищується величина індексу Simon при розрахунку показників хребців як у порівнянні з даними інтактної групи – на 7.1% ($p<0.001$), так і інших експериментальних серій: другої – на 5.3% ($p<0.05$) і третьої – на 3.4% ($p<0.05$).

При дослідженні показників структурної композиції третього поперекового хребця ми виявили, що відтворення ізольованої 60-денної інтоксикації нітратом натрію суттєво не позначається на показниках щільності, мінеральної насиченості та зольності.

При ізольованому моделюванні ОП достовірно знижується щільність і мінеральна насиченість хребців – відповідно на 14.0% ($p<0.01$) та 16.2% ($p<0.05$) у порівнянні з даними першої групи.

ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію також супроводжується істотним зменшенням величини щільності хребців – на 10.7% ($p<0.02$) у порівнянні з результатом першої серії. При цьому, мінеральна насиченість хребців – відповідно на 22.1% ($p<0.01$) та 23.2% ($p<0.05$) поступається величинам як першої, так і другої дослідних груп. У той же час, у всіх серіях дослідів істотних змін відсотка зольності хребців ми не виявили.

4.3. Вплив функціонального стану NO-синтаз на структурно-метаболічні зміни кісткової тканини різних відділів скелету при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію

Нами виявлено, що на колагеноліз у кістковій тканині різних відділів скелету у значній мірі впливає функціональна активність NOS. Але, якщо введення L-NAME достовірно не впливає на концентрацію вільного оксипроліну в тканині великогомілкової кістки, то в кістковій тканині хребців величина цього показника на 9.2% ($p<0.02$) перевищує результат четвертої серії. У той же час, введення селективного інгібітора iNOS аміногуанідину, навпаки, достовірно знижує вміст вільного оксипроліну в тканині великогомілкової кістки та хребців – відповідно на 11.9% ($p<0.01$) та 13.3% ($p<0.01$) у порівнянні з даними четвертої серії.

Неоднозначна дія неселективного інгібітора NOS L-NAME та селективного інгібітора iNOS аміногуанідину, вочевидь, пов'язана з різнаспрямованими ефектами конституційних і індукційних ізоформ ферменту. Відомо, що ендотеліальна NOS підсилює активність остеобластів та утворення кісткової тканини (van't Hof R.J., Ralston S.H., 2001; Taylor B.C. et al., 2006). Можна припустити її здатність обмежувати процес колагенолізу.

Введення субстрату NO-синтазної реакції L-аргініну також зменшує концентрацію вільного оксипроліну в тканині великогомілкової кістки та хребців – відповідно на 8.1% ($p<0.05$) та 11.5% ($p<0.02$) у порівнянні з даними четвертої серії.

Вочевидь, наявність додаткової концентрації L-аргініну активує конститутивну NOS (“аргініновий парадокс”) (Dioguardi F.S., 2011), для якої притаманна протективна дія, спрямована на підтримання достатньої кількості органічних складових кісткової тканини, обмеження процесів їх деполімеризації.

При дослідженні впливу функціонального стану NOS на концентрацію фукози в кістковій тканині ВГК і хребців достовірних відмінностей отриманих результатів при порівнянні результатів різних експериментальних серій не виявлено.

За нашими даними, процес деполімеризації протеогліканів у кістковій тканині у значній мірі залежить від функціональної активності певних NOS. Введення L-NAME достовірно не впливає на концентрацію гексуронових кислот в тканині великогомілкової кістки та хребців у порівнянні з даними четвертої серії. У той же час, введення селективного інгібітора iNOS аміногуанідину достовірно знижує вміст гексуронових кислот у тканині великогомілкової кістки та хребців – відповідно на 10.8% ($p<0.05$) та 10.5% ($p<0.02$) у порівнянні з даними четвертої серії.

Введення субстрату NO-синтазної реакції L-аргініну достовірно не позначається на величині концентрації гексуронових кислот в тканині великогомілкової кістки та хребців у порівнянні з даними четвертої серії.

За нашими даними, введення інгібіторів NOS та її субстрату L-аргініну достовірно не впливає на зміни активності ферментів – маркерів функції остеобластів (лужна фосфатаза) та остеокластів (кисла фосфатаза та її тартратрезистентна ізоформа).

Зміни остеометричних показників ВГК залежать від каталітичної активності певних NOS. Так, введення селективного інгібітора iNOS аміногуанідину достовірно підвищує масу нативної ВГК – на 20.8% ($p<0.01$) у порівнянні з даними четвертої серії. Введення аміногуанідину достовірно знижує індекс Simon при розрахунку показників ВГК – на 5.3% ($p<0.05$) у порівнянні з даними четвертої групи. Це вказує на той факт, що у механізмі зниження міцності кісток за умов глюкокортикоїдного ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію суттєву роль відіграє функціонування iNOS.

Звертає на себе увагу відсутність достовірних зрушень значень цього показника при введенні неселективного інгібітора NOS L-NAME та субстрату NO-синтазної реакції L-аргініну, що, вочевидь, свідчить про те, що з активністю конститутивних ферментів пов'язана дія, протилежна такій, що опосередковується iNOS (Костенко В.О. та співавт., 2008).

Введення аміногуанідину достовірно підвищує щільність ВГК – на 26.6% ($p<0.01$) у порівнянні з даними четвертої групи. Тобто, у механізмі зниження щільності кісток за умов глюкокортикоїдного ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію важливу роль також відіграє функціонування iNOS. У той час в усіх серіях дослідів істотних змін відсотка зольності ВГК ми не виявили.

Введення аміногуанідину достовірно підвищує масу нативного хребця – на 18.4% ($p<0.01$), знижує індекс Simon – на 3.3% ($p<0.05$) у порівнянні з даними четвертої групи. Це також підтверджує той факт, що у механізмі

зниження міцності кісток за умов глюкокортикоїдного ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію важливу роль відіграє функціонування iNOS.

При дослідженні хребців також відмічається відсутність достовірних зрушень індексу Simon при введенні неселективного інгібітора NOS L-NAME та субстрату NO-синтазної реакції L-аргініну, що, узгоджується з наведеною вище думкою про те, що з активністю конститутивних ферментів пов'язана дія, протилежна такій, що опосередкується iNOS.

Введення аміногуанідину достовірно підвищує щільність хребців – на 16.7% ($p < 0.01$) у порівнянні з даними четвертої групи. Тобто, у механізмі зниження щільності кісток за умов глюкокортикоїдного ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію важливу роль також відіграє функціонування iNOS. У той час в усіх серіях дослідів істотних змін відсотка зольності хребців ми не виявили.

4.4. Роль утворення пероксинітриту в розвитку структурно-метаболічних змін кісткової тканини різних відділів скелету при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію

Ми дослідили вплив скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну на структурно-метаболічні зміни кісткової тканини різних відділів скелету (великогомілкова кістка, хребці) білих щурів при відтворенні експериментального ОП за умов надлишкового утворення оксиду азоту із екзогенного попередника (модель хронічної інтоксикації нітратом натрію).

Нами виявлено, що процес колагенолізу у кістковій тканині різних відділів скелету у значній мірі є пероксинітрит-залежним. Так, введення L-селенометіоніну за умов ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію достовірно знижує в тканині ВГК та хребців вміст вільного оксипроліну – відповідно на 12.3% ($p < 0.01$) та 12.9% ($p < 0.02$) у порівнянні з даними четвертої серії.

При дослідженні вмісту фукози в кістковій тканині ВГК та хребців достовірних відмінностей отриманих результатів при порівнянні результатів різних експериментальних серій не виявлено.

У ході нашого дослідження виявлено, що процес деполімеризації протеогліканів у кістковій тканині різних відділів скелету також є пероксинітрит-залежним. Введення L-селенометіоніну за умов ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію достовірно знижує в тканині ВГК та хребців вміст гексуронових кислот – відповідно на 12.9% ($p < 0.02$) та 13.8% ($p < 0.05$) у порівнянні з даними четвертої серії.

Вплив скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну на стан процесів ремоделювання кісток при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію підтверджується змінами активності ферментів – маркерів функції остеобластів та остеокластів.

Так, введення L-селенометіоніну за умов ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію достовірно підвищує у сироватці крові активність біохімічного маркера формування кістки – лужної фосфатази – на 24.8% ($p < 0.02$). У той же час активність ферментів-маркерів резорбції кістки знижується: кислотої фосфатази – на 24.5% ($p < 0.05$), її кісткової ізоформи – тартратрезистентної кислотої фосфатази – на 20.5% ($p < 0.05$).

Введення L-селенометіоніну за умов ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію достовірно підвищує масу нативної ВГК – на 33.3% ($p < 0.05$) у порівнянні з даними четвертої серії дослідів. Індекс Simon за цих умов зменшується – на 6.2% ($p < 0.05$). За цих умов суттєво підвищується щільність (на 29.7%, $p < 0.001$) та мінеральна насиченість (на 18.9%, $p < 0.05$) ВГК у порівнянні з даними четвертої серії дослідів. Змін відсотка зольності ВГК за наведених умов не виявлено.

При оцінці біомеханічних властивостей ВГК при введенні L-селенометіоніну за умов ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію виявляється суттєве перевищення показника модулю Юнга (у 2.1 рази, $p < 0.05$) у порівнянні з даними четвертої серії дослідів.

За цих умов, звертає на себе увагу відсутнє достовірне зменшення величини межі міцності (у порівнянні з даними першої серії), виявлене у четвертій серії дослідів. Показник відносної залишкової деформації до руйнування достовірно не змінюється.

Введення L-селенометіоніну за умов ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію достовірно підвищує масу третього поперекового хребця – на 20.8% ($p < 0.01$) у порівнянні з даними четвертої серії дослідів. Індекс Simon за цих умов зменшується – 4.2% ($p < 0.01$). За цих умов суттєво підвищується щільність хребців – на 9.3% ($p < 0.05$) у порівнянні з даними четвертої серії дослідів. Мінеральна насиченість хребців збільшується – на 22.6% ($p < 0.05$). Змін відсотка зольності хребців за наведених умов не виявлено.

У щурів, яким за умов експерименту вводили L-селенометіонін, у тканині великогомілкових кісток щільність розташування судинних каналів практично не відрізняється від відповідного показника інтактних тварин.

Розподіл остеокитів на поверхні великогомілкової кістки відносно більш рівномірний у порівнянні з тваринами четвертої дослідної групи. Також у меншій мірі спостерігаються деструктивні зміни гістологічної структури кістки (потоншення кісткових трабекул, спонгіозування кортикальної кістки). Число мікропереломів трабекул в середньому на 15% поступається даним четвертої серії.

За даними морфометричного дослідження зразків великогомілкових кісток призначення L-селенометіоніну призводить до збільшення у тканині діафізу середньої щільності розташування клітинних елементів та відносної кількості остеобластів, які відповідно на 22.9% ($p < 0.001$) та 17.9% ($p < 0.001$) перевищують результати четвертої серії.

При дослідженні тіл 3-х поперекових хребців щура при введенні L-селенометіоніну за умов відтворення ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію на частині препаратів виявляється кісткова тканина з незначними дистрофічними змінами остеокитів.

Призначення L-селенометіоніну також підвищує середню щільність клітинних елементів та відносну кількість остеобластів у кістковій тканині 3-х поперекових хребців, які відповідно на 38.1% ($p<0.001$) та 23.0% ($p<0.001$) перевищують дані четвертої серії.

Тобто, отримані результати підтверджують точку зору, що утворення пероксинітриду істотно змінює спрямованість фізіологічних ефектів NO за умов відтворення хронічної нітратної інтоксикації, призводить до негативних наслідків.

РОЗДІЛ 5.

Роль NO-залежних процесів у патогенезі ушкоджень пародонта та СЗ за умов експериментального метаболічного синдрому

5.1. Матеріали та методи дослідження.

Дослідження були проведені на 50 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-230 г у 5 серіях дослідів: у першій необхідні показники вивчали у інтактних тварин (контрольна серія), у другій - після моделювання МС, у третій, четвертій і п'ятій серіях - протягом відтворення МС тваринам вводили відповідно селективний інгібітор нейрональної NOS (nNOS) 7-нітроіндазол (7-NI), селективний інгібітор iNOS - аміногуанідин і субстрат NO-синтазної реакції - L-аргінін.

Для моделювання МС гризунам протягом двох місяців призначали 20% водний розчин фруктози для пиття та "дієту західного типу", що містить такі складові: рафіноване пшеничне борошно – 45%, сухе знежирене коров'яче молоко – 20%, крохмаль – 10%, столовий маргарин (зі складом жирів 82%) – 20%, переокиснена соняшникова олія – 4%, натрію хлорид – 1%. 7-NI ("Sigma", США) призначали в дозі 30 мг/кг, аміногуанідин ("Sigma", США) - 20 мг/кг, L-аргінін ("Kyowa Hakko Kogyo Co LTD", Японія) - 500 мг/кг. Усі сполуки вводили внутрішньоочеревинно 2 рази на тиждень протягом періоду відтворення МС. Тварин декапітували під ефірним наркозом. Об'єктами дослідження були м'які тканини пародонту та тканини піднижньощелепних СЗ.

Рівень пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканинах оцінювали за утворенням у реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними продуктами забарвленого триметінового комплексу до і після 1,5-годинної інкубації. Активність антиоксидантної (АО) системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час півторогодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю АО ферментів – супероксиддисмутази (СОД) та каталази.

Отримані дані обробляли варіаційно-статистичним методом з використанням критерію Ст'юдента.

5.2. Роль NO-синтаз у механізмах порушень вільнорадикальних процесів у тканинах пародонта і слинних залоз щурів за умов експериментального метаболічного синдрому

Після введення фруктози з питною водою та призначення "дієти західного типу" протягом двох місяців у щурів відмічаються порушення обміну речовин, характерні для МС (зниження толерантності до глюкози, вісцеральне ожиріння, дисліпопротеїнемія, системна запальна відповідь). За цих умов концентрація глюкози крові натще складає $6,95 \pm 0,21$ ммоль/л (у інтактних тварин – $5,08 \pm 0,14$ ммоль/л, $p<0,001$); ліпопротеїнів низької щільності + ліпопротеїнів дуже низької щільності – $3,27 \pm 0,14$ г/л (у інтактних – $2,48 \pm 0,15$ г/л, $p<0,01$); церулоплазміну – $352,9 \pm 28,6$ мг/л (у інтактних – $265,7 \pm 28,8$ мг/л, $p<0,05$). Маса абдомінального жиру – $2,86 \pm 0,09$ г (у інтактних – $1,27 \pm 0,08$ г, $p<0,001$). За даними підшкірного інсулінового тесту, вміст глюкози у крові через 60 хв після введення інсуліну в дозі 0,2 МО/кг маси тварини зменшується у середньому на 21% (у інтактних – на 48%).

Відтворення МС викликає істотні зміни прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу. Так, концентрація ТБК-реактивів зростає в тканинах пародонта - на 69.6% ($p<0,01$), СЗ – на 52.4% ($p<0,001$), що вказує на активацію у цих структурах процесів ПОЛ.

Приріст концентрації ТБК-реактивів за час півторогодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині – збільшується в тканинах пародонта і СЗ – відповідно на 69.9% ($p<0,001$) та 48.1% ($p<0,01$) у порівнянні з даними інтактної групи, що вказує на істотне зниження АО потенціалу. Це також підтверджується зменшенням активності АО ферментів. Так, активність каталази знижується у тканинах пародонта і СЗ - відповідно на 38.5% ($p<0,05$) та 35.8% ($p<0,01$), СОД у СЗ - на 37.5% ($p<0,02$).

За нашими даними, на стан прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу значною мірою впливає функціональна активність NOS.

Так, введення селективного інгібітору nNOS 7-NI достовірно підвищує концентрацію ТБК-реактивів у тканинах СЗ – на 15.5% ($p<0,01$) у порівнянні з даними другої серії. За цих умов підвищується приріст концентрації ТБК-реактивів за час інкубації у прооксидантному буферному розчині в тканинах пародонта (на 13.0%, $p<0,02$) у порівнянні з даними інтактної групи, що вказує на додаткове зниження АО потенціалу.

Проте при внесенні 7-NI збільшується активність каталази у тканинах пародонта і СЗ - відповідно на 43.5% ($p<0,05$) та 35.4% ($p<0,01$) у порівнянні з даними другої серії (без істотної зміни активності СОД у СЗ).

Таким чином, NO, що генерується nNOS, має неоднозначний вплив на АО систему. З одного боку, він, очевидно, виконує сигнальну функцію, підтримуючи АО потенціал і обмежуючи інтенсифікацію ПОЛ. З іншого боку, ця молекула пригнічує у тканинах пародонта і СЗ активність каталази. Вважається, що зниження активності останньої може бути пов'язано із зв'язуванням цього ферменту з продуктом метаболізму нітратів – NO – та утворенням менш активної ферікаталази-NO.

Введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину за умов відтворення МС, навпаки, зменшує концентрацію ТБК-реактивів у тканинах пародонта і СЗ – відповідно на 38.5% ($p<0,01$) та 11.5% ($p<0,01$) у порівнянні з даними другої серії. Тобто саме активність iNOS вносить істотний внесок у інтенсифікацію процесів

ПОЛ. При цьому застосування аміногуанідину знижує приріст концентрації ТБК-реактивів за час інкубації тканин пародонта і СЗ у залізоаскорбатному буферному розчині – відповідно на 39.1% ($p<0,001$) та 27.5% ($p<0,05$) у порівнянні з даними другої серії. Це вказує на зв'язок розвитку АО недостатності з функціонуванням iNOS та виявляє протекторну дію її інгібітору аміногуанідину.

Наведена думка також підтверджується підвищенням при внесенні аміногуанідину активності АО ферментів: СОД у СЗ - на 46.7% ($p<0,05$); каталази у тканинах пародонта і СЗ – відповідно на 58.9% ($p<0,05$) та 48.1% ($p<0,01$) у порівнянні з даними другої серії.

Різностямовані ефекти NO, що виробляється nNOS та iNOS можна пояснити характеристиками місця його утворення, наявністю функціональної компартменталізації. Відомо, наприклад, що конститутивні NOS пов'язані з плазматичною мембраною. Гідрофобний і ліпофільний характер NO сприяє його компартменталізації в ліпідному бішарі, що захищає його від реакції з гідрофільним супероксидом та попереджає утворення високоактивного пероксинітриду. У той же час, всередині ліпідного бішару NO може легко (константа швидкості реакції – $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) реагувати з ліпідними пероксидними радикалами.

Введення тваринам L-аргініну за умов MC знижує концентрацію ТБК-реактивів у гомогенаті пародонта та їх приріст за час інкубації у прооксидантному буферному розчині – відповідно на 32.8% ($p<0,01$) та 32.1% ($p<0,001$) у порівнянні з даними другої серії. У СЗ ці показники суттєво не змінюються, проте величина активності каталази – на 23.8% ($p<0,05$) перевищує дані другої серії.

Відомо, що L-аргінін попереджає роз'єднання переносу електронів в оксигеназних ферментах, через що кисень стає єдиним акцептором електронів, попереджуючи тим самим утворення АФК.

ВИСНОВКИ

1. NO-синтазний механізм утворення оксиду азоту суттєво впливає на перебіг вільнорадикальних процесів у тканинах тонкої кишки білих щурів за умов моделювання її гострої непрохідності. Застосування неселективного інгібітору NO-синтаз (L-NAME), селективних інгібіторів iNOS (аміногуанідину) та nNOS (7-нітроіндазолу) обмежує збільшення продукції супероксидного аніон-радикала мікросомами. Надлишкова продукція супероксидного аніон-радикала мітохондріальним ЕТЛ при короткочасній (протягом 6 годин) ГТКН пов'язана з функціонуванням iNOS, при тривалій (протягом 18 годин) – iNOS та nNOS. За умов ГТКН активація пероксидного окиснення ліпідів у тканинах тонкої кишки пов'язана з активністю iNOS та супроводжується (при 18-годинній непрохідності) зниженням антиоксидантного потенціалу, активності супероксиддисмутази та каталази. Застосування селективного інгібітору iNOS аміногуанідину обмежує ці порушення. За умов короткочасної ГТКН (протягом 6 годин) функціонування nNOS справляє протективну дію щодо активації пероксидного окиснення ліпідів у тканинах тонкої кишки. Застосування неселективного інгібітору NO-синтаз L-NAME та селективного інгібітору nNOS 7-нітроіндазолу сприяє активації цього процесу. За умов короткочасної (6 годин) ГТКН зниження концентрації макроергічних сполук та енергетичного потенціалу в тканинах тонкої кишки пов'язано з активністю iNOS, а при тривалішій (18 годин) – iNOS та nNOS. Застосування неселективного інгібітору NOS L-NAME, селективних інгібіторів iNOS аміногуанідину та nNOS 7-нітроіндазолу попереджує істотне зменшення концентрації АТФ та енергетичного потенціалу.

2. За умов ГТКН (протягом 6 та 18 годин) функціонування iNOS викликає дезорганізацію сполучної тканини тонкої кишки; селективне пригнічення iNOS аміногуанідином супроводжується зменшенням концентрації мономерів глікопротеїнів та глікозаміногліканів сполучної тканини тонкої кишки, покращує стан кишкового бар'єра та знижують рівень летальності тварин (протягом 18 годин після відтворення ГТКН). Ефекти nNOS залежать від часу розвитку ГТКН: за умов короткотермінової ГТКН (протягом 6 годин) функціонування nNOS обмежує деполімерізацію фукоглікопротеїнів, а за умов тривалої ГТКН (протягом 18 годин) сприяє деполімерізації фуко- та сіалоглікопротеїнів сполучної тканини тонкої кишки. Селективне пригнічення iNOS обмежує порушення бар'єрної функції тонкої кишки та зменшує ризик транслокації мікроорганізмів і продуктів їх розпаду за межі кишки.

3. Утворення пероксинітриду неоднозначно впливає на генерацію супероксидного аніон-радикала різними ЕТЛ у тканинах тонкої кишки білих щурів за умов моделювання її гострої непрохідності. Застосування скевенджеру пероксинітриду (L-селенометіоніну) обмежує продукцію цієї речовини мітохондріями (за умов 6- та 18-годинного процесу) та збільшує вироблення супероксиду НАДФН-оксидазою лейкоцитів (за умов 6-годинної непрохідності). Застосування L-селенометіоніну обмежує у тканинах тонкої кишки активацію ПОЛ, зниження антиоксидантного потенціалу, активності антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази та каталази), зниження концентрації АТФ та енергетичного потенціалу, покращує стан кишкового бар'єра.

4. Активність конституційних NO-синтаз активує пероксидне окиснення ліпідів та обмежує антиоксидантний потенціал у тканинах інтактних піднижньощелепних слинних залоз. Введення селективного інгібітору nNOS 7-NI збільшує антиоксидантний потенціал, введення неселективного інгібітору NOS L-NAME та селективного інгібітору nNOS 7-NI підвищує активність СОД і каталази. Індуцибельна NO-синтаза, введення субстрату NOS L-аргініну та утворення пероксинітриду не впливають на стан зазначених процесів у тканинах інтактних піднижньощелепних слинних залоз.

5. Активність нейрональної та індукційної NOS призводить до різностямованих змін пероксидного окиснення ліпідів у тканинах ушкоджених піднижньощелепних слинних залоз за умов травматичного сіалоаденіту. Введення за цих умов селективного інгібітору nNOS 7-NI обмежує рівень процесів пероксидації, підвищує антиоксидантний потенціал, селективного інгібітору iNOS аміногуанідину – сприяє активації пероксидного окиснення ліпідів і зниженню антиоксидантного потенціалу тканин слинних залоз. Збільшення антиоксидантного

потенціалу в тканинах ушкоджених піднижньощелепних слинних залоз за умов травматичного сіалоаденіту, пов'язане з функціонуванням nNOS, не залежить від активності супероксиддисмутази та каталази. Всі ізоферменти NO-синтази, що досліджувалися (nNOS, iNOS), негативно впливають на активність названих ферментів. Механізми активації пероксидного окиснення ліпідів та зниження антиоксидантного потенціалу у тканинах ушкоджених піднижньощелепних слинних залоз за умов травматичного сіалоаденіту є пероксинітрит-залежними процесами.

6. Функціональна активність конститутивних NO-синтаз позитивно впливає на вміст АТФ та підвищує енергетичний потенціал у тканинах інтактних піднижньощелепних слинних залоз. Введення селективного інгібітору nNOS 7-NI пригнічує процес ресинтезу в них АТФ. Індуцибельна NO-синтаза, введення субстрату NOS L-аргініну та утворення пероксинітриту не впливають на вміст та співвідношення аденіннуклеотидів у тканинах піднижньощелепних слинних залоз.

7. Активність нейрональної та індуктибельної NOS призводить до різноспрямованих змін біоенергетичних процесів у тканинах ушкоджених піднижньощелепних слинних залоз за умов травматичного сіалоаденіту. Введення за цих умов селективного інгібітору nNOS 7-NI знижує ресинтез АТФ та енергетичний потенціал, введення селективного інгібітору iNOS аміногуанідину - підвищує енергетичний потенціал у тканинах слинних залоз. Введення субстрату NOS L-аргініну не впливає на вміст та співвідношення аденіннуклеотидів у тканинах як інтактних, так і ушкоджених слинних залоз. Механізми порушення ресинтезу АТФ та зниження енергетичного потенціалу в тканинах піднижньощелепних слинних залоз за умов травматичного сіалоаденіту є пероксинітрит-залежними процесами.

8. 30-денне введення фториду натрію поряд з нітратом натрію змінює характер реагування у тканинах піднижньощелепних слинних залоз конкурентних NO-синтазних і аргіназних шляхів метаболізму L-аргініну: типове для ізолюваного призначення нітрату натрію пригнічення активності сумарних NO-синтаз змінюється на їх гіперактивацію, активність орнітиндекарбоксилази суттєво зменшується.

9. Введення щурам селективного інгібітору iNOS аміногуанідину на тлі бінарної хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію зменшує продукцію у тканинах піднижньощелепних слинних залоз супероксидного аніон-радикала мікросомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами, обмежує інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів, підвищує антиоксидантний потенціал, активність антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази, каталази) та α -амілази, що вказує на роль NO ендогенного походження, що виробляється за участю iNOS, у стимулюванні продукції активних форм кисню, активації вільнорадикальних процесів, пригніченні системи антиоксидантного захисту та порушенні білоксинтезуючої функції слинних залоз.

10. Введення щурам селективного інгібітору nNOS 7-нітроіндазолу на тлі бінарної хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію підвищує продукцію у тканинах піднижньощелепних слинних залоз супероксидного аніон-радикала мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом, інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів, знижує антиоксидантний потенціал та активність α -амілази, що вказує на протективну роль NO, що виробляється за участю nNOS, при активації у слинних залозах вільнорадикальних процесів та порушенні біосинтезу білка.

11. Порушення вільнорадикальних процесів у тканинах піднижньощелепних слинних залоз на тлі бінарної хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію є пероксинітрит-залежними. Введення щурам скевенджерів пероксинітриту (L-селенометіоніну та сечової кислоти) за цих умов знижує продукцію супероксидного аніон-радикала (мікросомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами) та активність пероксидного окиснення ліпідів, покращує стан антиоксидантного захисту та білоксинтезуючої функції слинних залоз.

12. Процес дезорганізації сполучної тканини та остеометричні характеристики великогомілкових кісток і хребців за умов відтворення глюкокортикоїдного остеопорозу на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію у значній мірі залежать від функціонального стану NO-синтаз. Функціональна активність iNOS сприяє деполімеризації колагену та протеогліканів у тканині великогомілкової кістки та хребців, впливає на зниження маси цих кісток, їх щільності та міцності, що свідчить про розвиток дизрегуляторних розладів (порушення механізму авторегуляції кількості NO при його утворенні з екзогенного попередника).

13. Порушення процесу ремоделювання кісток при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію є пероксинітрит-залежними. Введення скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну за цих умов покращує процес формування кістки та пригнічує її резорбцію (у сироватці крові активність лужної фосфатази підвищується на 24,8%, $p < 0,02$, активність кислої фосфатази та її тартратрезистентної ізоформи знижується – відповідно на 24,5%, $p < 0,05$, та 20,5%, $p < 0,05$), обмежує колагеноліз (вміст вільного оксипроліну в тканині великогомілкових кісток та хребців знижується – відповідно на 12,3%, $p < 0,01$, та 12,9%, $p < 0,02$) і дезорганізацію протеогліканів (концентрація гексуонових кислот у тканині великогомілкових кісток та хребців знижується – відповідно на 12,9%, $p < 0,02$, та 13,8%, $p < 0,05$), підвищує щільність великогомілкових кісток і хребців (на 29,7%, $p < 0,001$, та 9,3%, $p < 0,05$), поліпшує біомеханічні властивості великогомілкової кістки.

14. Призначення скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію обмежує порушення гістологічної структури великогомілкової кістки (потоншення кісткових трабекул, збільшення відстані між окремими трабекулами, спонгізування кортикальної кістки, кількість мікропереломів трабекул) та деструктивні процеси у 3-х поперекових хребцях (потоншення компактної речовини, розширення міжбалкових просторів губчастої кісткової речовини), підвищує у тканині діяфізу великогомілкових кісток і тіла 3-х поперекових хребців середню щільність розташування клітинних елементів (на 22,9%, $p < 0,001$, та 38,1%, $p < 0,001$) та відносну кількість остеобластів (на 17,9%, $p < 0,001$, та 23,0%, $p < 0,001$).

15. Функціональна активність нейрональної NO-синтази за умов експериментального метаболічного синдрому обмежує у СЗ та м'яких тканинах пародонта щурів вільнорадикальні процеси: загальний фон продукції

супероксидного аніон-радикала, його вироблення мікросомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами, утворення вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів, що коригується введенням селективного інгібітору nNOS 7-нітроіндазолу. Збільшення антиоксидантного потенціалу в тканинах пародонта за умов МС, пов'язане з функціонуванням nNOS, не залежить від активності каталази.

16. З функціональною активністю iNOS і NF-κB за умов експериментального метаболічного синдрому пов'язані односпрямовані зміни вільнорадикальних процесів у СЗ та тканинах пародонта (гіперпродукція супероксидного аніон-радикала, розвиток декомпенсованого пероксидного окиснення ліпідів, що супроводжується виснаженням антиоксидантного потенціалу, зменшенням активності каталази), резорбція альвеолярного відростка щелеп, дезорганізація сполучної тканини (колагеноліз та деполімеризацію протеогліканів у м'яких і кістковій тканинах пародонта).

17. Введення L-аргініну за умов експериментального метаболічного синдрому істотно не впливає у м'яких тканинах пародонта щурів на загальний фон генерації $\cdot O_2^-$ та його вироблення мікросомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами, але пригнічує пероксидне окиснення ліпідів (концентрація ТБК-активних продуктів знижується на 32.8%, $p < 0,01$), підвищує антиоксидантний потенціал, обмежує процес резорбції альвеолярного відростка щелеп (коефіцієнт оголення коренів молярів нижньої щелепи зменшується – на 22.0%, $p < 0,05$), колагеноліз та деполімеризацію протеогліканів у м'яких і кістковій тканинах пародонта (концентрація вільного оксипроліну знижується – відповідно на 32.8%, $p < 0,001$, та 30.8%, $p < 0,001$, глікозаміногліканів – на 27.0%, $p < 0,001$, та 32.4%, $p < 0,001$).

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Бабина О.А. Источники активных форм кислорода в тканях ротовой полости в норме и при патологии / О.А. Бабина, В.В. Бондаренко, М.А. Гранько [и др.] // Стоматология. – 1999. – Т. 78, № 5. – С. 9-11.
2. Бондаренко В.В. Зміни енергетичного метаболізму, вільнорадикального окиснення в слинних залозах при утворенні надлишкової кількості оксиду азоту з екзогенних та ендогенних попередників : дис. ... канд. мед. наук : 14.03.04 / Бондаренко Валерій Володимирович. – Полтава, 2002. – 151 с.
3. Бондаренко В.В. Соколова Н.А., Міщенко А.Г., Костенко А.Г., Вплив хронічної інтоксикації на ферментну активність слинних залоз // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії. – Т. 16., вип. 4. – 2006. – С. 159 – 160.
4. Брусов О.С. Влияние природных ингибиторов радикальных реакций на автоокисление адреналина / О.С. Брусов, А.М. Герасимов, Л.Ф. Панченко // Бюл. эксперим. биол. мед. – 1976. – №1. – С.33-35.
5. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах / А.Ф. Ванин // Биохимия. – 1998. – Т. 63, Вып. 7. – С. 924-928.
6. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях / А.Ф. Ванин // Вестн. РАМН. – 2000. – №4. – С.3-5.
7. Гвак Г.В. Хирургический стресс и естественные стресс-лимитирующие системы у детей : дис. ... доктора мед. наук : 14.00.37 / Гвак Геннадий Владимирович. – М., 2005. – 158 с.
8. Гвак Г.В. Хирургический стресс. Клинико-лабораторные параллели в условиях активации естественных стресс-лимитирующих систем / Г.В. Гвак, В.Г. Еременко, Е.А. Иванов, В.А. Сманцер // Анестезиол. и реаниматол. – 2004 – № 4. – С.33-36
9. Герман К.Б. Вільнорадикальні процеси у патогенезі порушень, зумовлених хірургічною травмою, при різних видах знеболювання : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.04 “Патологічна фізіологія” / К.Б. Герман. – Харків, 2008. – 19 с.
10. Гланц С. Медико-биологическая статистика : пер. з англ. / Стентон Гланц. – М. : Практика, 1999. – 459 с
11. Денисенко С.В. Бієтичні особливості використання лабораторних тварин в експерименті / С.В. Денисенко, М.В. Денисенко, С.Б. Передера // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Укр. мед. стоматол. акад. – 2009. – Т.9, Вип. 2. – С. 39-44.
12. Денисенко С.В. Біоетичні питання експериментів на тваринах / С.В. Денисенко, Л.Ю. Глєбова, С.М. Назаренко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Укр. мед. стоматол. акад. – 2006. – Т.6, № 3. – С. 186-189.
13. Денисенко С.В. Динаміка змін перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантного захисту в сім'яниках при хронічній нітратній інтоксикації / С.В. Денисенко // Пробл. екол та мед. – 2002. – Т.6, №5. – С.8-10.
14. Денисенко С.В. Изменения митохондриального окисления и фосфорилирования в семенниках белых крыс в условиях избыточного поступления в их организм нитрата натрия / Денисенко С.В., Костенко В.А. // Укр. биохим. журн. – 2003. – Т.75, №1. – С.95-97.
15. Денисенко С.В., Костенко В.А. Изменения продукции активных форм кислорода в семенниках белых крыс в условиях хронической интоксикации нитратом натрия / Денисенко С.В., Костенко В.А. // Совр. пробл. токсикологии. – 2002. – №4. – С.44-46.
16. Денисенко С.В. Изменения содержания и соотношения аденинуклеотидов в семенниках белых крыс в условиях избыточного поступления в организм нитрата натрия / С.В. Денисенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Укр. мед. стоматол. акад. – 2002. – Т.2, №1. – С.16-17.
17. Денисенко С.В. Кислородные соединения азота и их место среди негативных влияний на

репродукцію / С.В. Денисенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Укр. мед. стоматол. акад. – 2001. – Т.1, №1-2. – С.3-5.

18. Денисенко С.В. Пошкодження сперматогенного епітелію сім'яників, зумовлені хронічною нітратною інтоксикацією / С.В. Денисенко // Вісн. пробл. біол. і мед. – 2002. – №6. – С.76-80.

19. Денисенко С.В. Опосередкованість порушень ембріо- та фетогенезу нітратною інтоксикацією самців і коригувальний вплив мексидолу на ці процеси / Денисенко С.В. // Вісн. Сумськ. держ. ун-ту : Серія Медицина. – 2005. – №3(75). – С. 37–39.

20. Денисенко С.В. Особливості спермограми при хронічній інтоксикації нітратом натрію / С.В. Денисенко // Вісн. пробл. біол. і мед. – 2002. – №7-8. – С.38-41.

21. Діхтенко Т.Г. Роль ізоформ NO-синтази та аргінази у механізмах порушень окиснювального метаболізму у паравульнарних тканинах оперованої тонкої кишки щурів / Т.Г. Діхтенко, В.О. Костенко // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2012. – Т. 7, №3. – С. 56–62.

22. Діхтенко Т.Г. Роль NO-синтазного та аргіназного шляхів у механізмах дії L-аргініну, введеного у складі хірургічної нитки, на окиснювальні процеси у тканинах тонкої кишки щурів після ентєротомії / Т.Г. Діхтенко, В.О. Костенко // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2012. – Т. 7, №4. – С.44–49.

23. Діхтенко Т.Г. Механізми впливу L-аргініну, іммобілізованого на хірургічному шовному матеріалі, на інтегральні показники дезорганізації сполучної тканини оперованої тонкої кишки щурів / Т.Г. Діхтенко, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2013. – Т. 13, №1. – С. 336–338

24. Діхтенко Т.Г. Вплив L-аргініну, іммобілізованого на полігліколідній нитці, на патоморфологічні та морфометричні зміни у паравульнарних тканинах оперованої тонкої кишки щурів / Т.Г. Діхтенко, І.І. Старченко, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2013. – Т. 13, №2. – С. 138–141.

25. Діхтенко Т.Г. Вплив L-аргініну, іммобілізованого на хірургічному шовному матеріалі, на окиснювальний обмін у паравульнарних тканинах оперованої тонкої кишки (експериментальне дослідження) / Т.Г. Діхтенко, А.А. Левков, В.О. Костенко // Клін. хірургія. – 2013. – №9. – С. 66–69.

26. Діхтенко Т.Г. Перспективы создания и применения новых хирургических шовных материалов с метаболическим действием на ткани / Т.Г. Діхтенко, А.А. Левков, В.А. Костенко // Актуальные вопросы современной хирургии : сб. науч.-практ. работ. – Красноярск : Версо, 2013. – С. 434–436.

27. Должкова К. П. Вплив пригнічення та індукції NO-синтаз на біохімічний склад кісткової тканини нижньої щелепи при відтворенні її перелому на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію / К. П. Должкова, В. О. Костенко // Проблеми екології та медицини. – 2010. – Т. 14, № 1–2. – С. 35–38.

28. Дробінська О. Вплив L-аргініну на ураження в слизовій оболонці шлунка, спричинені серотоніном / О. Дробінська, Л. Остапченко, О. Цирюк [та ін.] // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2004. – Вип. 38. – С. 201-204.

29. Єлінська А.М. Роль пероксинітриту у механізмах вільнорадикальних процесів у слинних залозах за умов відтворення експериментального метаболічного синдрому / А.М. Єлінська, Н.В. Соловйова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2014. – Т.14, №3. – С. 198-201.

30. Єлінська А.М. Роль ядерного фактора κВ у механізмах порушень окиснювальних процесів у слинних залозах за умов відтворення експериментального метаболічного синдрому / А.М. Єлінська, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2014. – Т.14, №4. – С. 192-195.

31. Єлінська А.М. NO- та NF-κB – залежні механізми порушення білоксинтезуючої функції слинних залоз щурів за умов експериментального метаболічного синдрому / А.М. Єлінська, В.О. Костенко // Світ мед. та біол. – 2014. – № 4. – С. 120-123.

32. Залевська В.А. Біохімічне дослідження ефективності патогенетичної терапії травматичного сіалоаденіту в пацієнтів в експерименті / В.А. Залевська // Новини стоматології. – 2007. – №4. – С.98-103.

33. Звягинцева Т.В. Особенности показателей центральной гемодинамики при операционной травме в условиях различных видов обезболивания в эксперименте / Т.В. Звягинцева, К.Б. Герман // Эксперим. і клін. мед. – 2006. – № 1. – С. 5–7.

34. Звягинцева Т.В. Свободнорадикальные процессы в патогенезе стресса / Т.В. Звягинцева, Е.В. Желнин, К.Б. Герман // Клін. та експерим. патологія. – 2004. – Т. 3, № 2. Ч. 2. – С. 313–315.

35. Звягинцева Т.В. Состояние окислительно-антиоксидантных процессов при хирургической травме в эксперименте / Т.В. Звягинцева, К.Б. Герман // Эксперим. і клін. мед. – 2006. – № 4. – С. 38–41.

36. Зильбер А.П. Клиническая физиология в анестезиологии и реаниматологии / А.П. Зильбер. – М. : Медицина, 1984. – 486 с.

37. Калашников С.П. Оксид азота – новый биологический модулятор / С.П. Калашников, А.Н. Маянский, П.П. Загоскин, Н.А. Маянский // Нижегород. мед. журн. – 1999. – № 1. – С. 69-82.

38. Клініка та лікування сіалоаденітів / [Чулак Л.Д., Левицький А.П., Залевська В.А., Шутурмінський В.Г.]. - Чернівці : Прут, 2006 - 114 с.

39. Коваленко О.В. NO-залежні зміни вмісту та співвідношення аденіннуклеотидів у тканинах піднижньощелепних слинних залоз за умов відтворення травматичного сіалоаденіту / О. В. Коваленко, В. О. Костенко // Вісн. проблем біології і медицини. – 2011. – № 4. – С. 106–110.

40. Коваленко О.В. NO-залежні зміни продукції супероксидного аніон-радикала в піднижньощелепних слинних залозах за умов експериментального травматичного сіалоаденіту / О. В. Коваленко, В. О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2011. – Т. 11, № 2. – С. 42–45.

41. Коваленко О.В. NO-залежні зміни процесів пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту у тканинах піднижньощелепних слинних залоз за умов відтворення травматичного сіалоаденіту / О. В. Коваленко, В. О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2011. – Т. 11, № 4 (ч. 2). – С. 153–1575.
42. Коваленко О.В. Морфофункціональні зміни піднижньощелепної залози щурів за умов відтворення хронічного травматичного сіалоаденіту та введення L-селенометіоніну / О. В. Коваленко, Г. А. Єрошенко, В. О. Костенко // Світ медицини та біології – 2012. – № 1. – С. 125–129.
43. Костенко А. Г. Зміна активності антиоксидантного захисту і процесів перекисного окислення ліпідів у тканинах тонкого кишечника і печінці при фтористій інтоксикації та радіації / А. Г. Костенко, А. В. Міщенко // Одеський медичний журнал. – 2000. – № 6. – С. 13–15.
44. Костенко А. Г. Зміна тканинного дихання й окисного фосфорилювання в тканинах тонкого кишечника і печінки білих пацюків під впливом фтористої інтоксикації та радіації / А. Г. Костенко, А. В. Міщенко // Вісник Вінницького державного медичного університету. – 2001. – № 2. – С. 329–331.
45. Костенко А. Г. Вплив поєднаної хронічної дії підвищених доз натрію фториду та іонізуючого опромінення на антиоксидантний статус та енергетичний обмін у печінці тварин / А. Г. Костенко, А. В. Міщенко // Український Радіологічний Журнал. – 2001. – № 4. – С. 413–417.
46. Костенко А. Г. Влияние комплекса антиоксидантов на состояние свободнорадикального окисления в печени и крови при введении фторида натрия и воздействии ионизирующей радиации / А. Г. Костенко, А. В. Мищенко // Український медичний альманах. – 2002. – Т. 5, № 1. – С. 81–84.
47. Костенко А.Г., Мищенко А.В. Изменение содержания ядерной ДНК, цитоплазматической РНК и суммарного белка в печени крыс, облученных рентгеновскими лучами // Світ медицини та біології -2007.-№2.-С. 95-97.
48. Костенко В.А. Антигипоксанта метаболического действия – перспективные средства коррекции окислительных и репаративных процессов в тканях / В.А. Костенко, Л.Ю. Глебова, Н.Н. Мельник [и др.] // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2003. – Т.3, №1. – С. 4-8.
49. Костенко В.А. Влияние рассасывающихся шовных материалов на процессы внутриклеточной регенерации в эксперименте / В.А. Костенко // Клін. хірургія. - 1997. - №9-10. - С.74-75.
50. Костенко В.А. Влияние модифицированной этонием хирургической нити из биофила на пластический метаболизм в почках белых крыс / В.А. Костенко // Клін. хірургія. - 1997. - №11-12.- С.71-73.
51. Костенко В.А. Местное или системное действие антигипоксантов, иммобилизованных на хирургических нитях, определяет их фармакологические эффекты? / В.А. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. - 2001. – Т.1, №1-2. - С.30-33.
52. Костенко В.А. Глебова Л.Ю. Филатова В.Л. Антигипоксанта метаболического действия - перспективные средства коррекции окислительных и репаративных процессов в тканях // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії. - Т.3., вип.1.- 2003.- С. 4 – 8.
53. Костенко В.А. Не только концентрация, но и происхождение оксида азота определяет его патогенетическую или саогенетическую роль / [В.А. Костенко, И.В. Батухина, А.А. Левков и др.] // Патологія. – 2008. – Т.5, №2. – С.58.
54. Костенко В.А. Новые подходы к разработке и применению шовных материалов в абдоминальной хирургии / В.А. Костенко, А.В. Лигоненко, Н.Н. Гвоздяк [и др.] // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2008. – Т.8, №1-2. – С.97-99.
55. Костенко В.А. Перспективы создания и применения новых метаболитотропных хирургических шовных материалов / В.А. Костенко, С.В. Гончар, Е.Н. Пронина [и др.] // Таврический медико-биол. вестн. – 2008. – Т.11, №3. – Ч.2. – С.37-39.
56. Костенко В.А. Роль окислительного метаболизма в патогенезе раневого процесса / В.А. Костенко, Н.В. Крышталь, А.В. Мищенко [и др.] // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2003. – Т.3, №2. – С.119-122.
57. Костенко В.А. NO- и пероксинитрит-зависимые изменения продукции супероксидного анион-радикала в органах крыс при экспериментальном метаболическом синдроме / В.А. Костенко А.Н. Елинская, Л.И. Ляшенко, Н.В. Соловьева, В.В. Талаш // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2014. – № 2 (46). – С. 74–77.
58. Костенко В.А. Хирургический шовный материал будущего: конструктивные взаимоотношения нити и паравульнарных тканей / В.А. Костенко, А.В. Лигоненко, Е.Н. Пронина, А.С. Ставничий // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2006. – Т.6, №1-2. – С. 259-261.
59. Костенко В.О. Зміни біоенергетичних і репаративних процесів у тканинах зони тонкокишкового анастомозу при використанні нових синтетичних шовних матеріалів, що розсмоктуються / В.О. Костенко, О.В. Лігоненко, А.А. Левков, О.М. Дмитрук // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения : Тр. Крымского гос. мед. ун-та им. С.И.Георгиевского. – 2007. – Т.143, Ч. V. – С.343.
60. Костенко В.О. Зміни енергетичного метаболізму в нирках білих щурів у динаміці гострої інтоксикації нітратом натрію // Фізіол. журн. - 1995. - Т.41, N.5-6. - С.91-96.
61. Костенко В.О. Експериментальне обґрунтування корекції L-аргініном, іммобілізованим на шовному матеріалі, метаболічних розладів за умов хірургічної травми / В.О. Костенко, Л.В. Скотнікова, А.А. Левков // Загальна патологія та патологічна фізіологія – 2010. – Т.5, № 2. – С.18.

62. Костенко В.О. Механізми ауторегуляції утворення оксиду азоту в організмі ссавців та їх порушення при розвитку патологічних процесів / В.О. Костенко, Н.В. Соловйова, О.В. Коваленко, О.А. Левченко, Б.В. Сорокін, О.А. Стасюк, А.М. Фартушна, О.В. Богданов // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2011. – Т.11, №3. – С. 150-154.
63. Костенко В.О. Механізми порушення окисних процесів у тканинах при надлишковому утворенні оксиду азоту з екзогенних попередників / В.О. Костенко, А.Г. Костенко, С.В. Денисенко [та ін.] // Клін. та експ. патол. – 2004. – Т.3, № 2 (Ч.1). – С.202-204.
64. Костенко В.О. Перспективи створення нових хірургічних шовних матеріалів з біорегуляторною дією / В. О. Костенко, О. В. Лігоненко, Т. Г. Діхтенко, Л. В. Скотнікова // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2011. – Т.11, №1. – С. 227-230.
65. 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.
66. Костенко В.О. Роль слинних залоз у механізмах ауторегуляції рівня оксиду азоту в організмі ссавців та їх порушень / В.О. Костенко, А.М. Єлінська, Л.І. Ляшенко, І.В. Нагорняк, О.А. Стасюк // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2013. – Т.13, №2. – С. 10-14.
67. Костенко В.О. Фармакологічна регуляція окиснювальних і репаративних процесів в оперованих органах антигіпоксантами, іммобілізованими на хірургічних нитках : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук : спец. 14.03.05 „Фармакологія” / В.О. Костенко. – К., 2002. – 32 с.
68. Кузнецова Т.Ю. Моделирование механизма антирадикальных процессов на наноуровне с участием глутатиона в биологических системах / Т.Ю. Кузнецова, Н.В. Соловйова // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2014. – Т.14, №4. – С. 201-204.
69. Левков А. А. Енергетичний обмін у тканинах тонкої кишки за умов її гострої непрохідності та зміни функціональної активності NO-синтаз / А. А. Левков // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2009. – Т.9, №2. – С. 86-90.
70. Левков А.А. Зміни процесів пероксидного окиснення ліпідів в тканинах тонкої кишки за умов її гострої непрохідності, залежні від функціонування NOсинтаз / А.А. Левков, В.О. Костенко, А.В. Міщенко, Москаленко П.О. // Актуальні проблеми сучасної медицини. Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2011 – Т. 11.- №3. - С. 64-66.
71. Левков А. А. NO-залежні зміни продукції супероксидного аніон-радикала в тканинах тонкої кишки за умов її гострої непрохідності / А. А. Левков, В. О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2010. – Т.10, №1. – С. 43-48.
72. Левков А. А. NO-залежні зміни метаболізму біополімерів сполучної тканини в тканинах тонкої кишки за умов гострої тонкокишкової непрохідності / А. А. Левков, В. О. Костенко // Загальна патологія та патологічна фізіологія – 2010. – Т.5, № 3. – С.65-70.
73. Лесовая И.Г. Частота неопухолевых заболеваний слюнных желез в пределах центрального и восточного регионов Украины / И.Г. Лесовая, А.А. Тимофеев // Совр. стоматология. – 2000. - № 2. – С. 67-70.
74. Ляшенко Л.І. Роль NF-κВ-опосередкованої дії NO-синтаз у дезорганізації сполучної тканини пародонта за умов експериментального метаболічного синдрому / Л.І. Ляшенко, В.О. Костенко // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2013. – Т. 8, № 3. – С. 53–57.
75. Ляшенко Л.І. 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.
76. Ляшенко Л.І. Роль транскрипційного ядерного фактора κВ у механізмах порушень вільнорадикальних процесів і дезорганізації сполучної тканини пародонта за умов експериментального метаболічного синдрому / Л.І. Ляшенко, С.В. Денисенко, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2014. – Т. 14, № 1. – С. 97–100.
77. Ляшенко Л.І. NF-κВ-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
78. Методы исследования в профпатологии / под ред. О.Г.Архиповой. – М. : Медицина, 1988. – 208 с.
79. 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.
80. Мищенко А.В. Влияние гипербарической оксигенации на выживаемость белых крыс при экспериментальной острой фтористой интоксикации / А. В. Мищенко // Вестник проблем биологии и медицины. – 1997. – Вып. 19. – С. 88–93.
81. Мищенко А. В. Механизмы повреждения клетки при фтористой интоксикации / А. В. Мищенко // Вісник проблем біології і медицини. — 1999. – № 6. – С. 36–39.
82. Мищенко А.В. Изменение содержания макроэргов в тканях тонкого кишечника белых крыс в ранний период острой фтористой интоксикации / Мищенко А.В., Костенко А.Г. // Проблеми екології та медицини — 1999. - №5. - С. 31 -32.
83. Мищенко А.В. Вплив гострої фтористої інтоксикації на зміну активності антиоксидантного захисту і процесів перекисного окислення ліпідів у тканинах тонкого кишечника білих щурів / Мищенко А.В., Костенко А.Г. // Вісник Вінницького державного медичного університету. — 2000. – Т.4, №2. - С. 409-410.

84. Мищенко А.В. Изменение процессов тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в тканях тонкого кишечника и печени белых крыс при фтористой интоксикации / Мищенко А.В., Костенко А.Г. // Проблемы экологии та медицини. - 2000. - №2. - С. 10-12.
85. Мищенко А.В. Вплив гіпербаричної оксигенації на вміст аденіннуклеотидів у тканинах тонкої кишки білих щурів при гострій фтористій інтоксикації / Мищенко А.В., Глебова Л.Ю. // Буковинський медичний вісник.-2000.-№4.- С. 172-175.
86. Мищенко А.В. Энергетичний метаболізм тонкого кишечника при гострій інтоксикації фторидом натрію і застосуванні гіпербаричної оксигенації: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец: 14.03.04 «Патофізіологія» / А.В.Мищенко - К., 2001. - 20 с.
87. Мищенко А.В. Зміни вмісту аденіннуклеотидів у тканинах тонкого кишечника та печінки білих щурів при фтористій інтоксикації та впливу іонізуючої радіації / Мищенко А.В., Костенко А.Г., Глебова Л.Ю. // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. - 2001. - Т. 1., вип.1-2.- С. 34-35.
88. Костенко А. Г. Зміна тканинного дихання й окисного фосфорилування в тканинах тонкого кишечника і печінки білих пацюків під впливом фтористої інтоксикації та радіації / А. Г. Костенко, А. В. Мищенко // Вісник Вінницького державного медичного університету. – 2001. – № 2. – С. 329–331
89. Мищенко А. В. Зміни вмісту аденіннуклеотидів у тканинах тонкого кишечника і печінки білих щурів при фтористій інтоксикації та впливі іонізуючої радіації / А. В. Мищенко, А. Г. Костенко, В. В. Ришко // Одеський медичний журнал. – 2002. – № 2. – С. 11–12.
90. Пат. 28311 Україна, МПК А61В 5/03. Спосіб виготовлення моделі травматичного сіалоаденіту підщелепної залози / Чулак Л.Д., Залевська В.А., Шутурмінський В.Г., Чулак О.Л., Чулак Ю.Л.; заявник і патентовласник Залевська В.А. – Заявка № u200705666; Заявл. 22.05.2007; Опубл. 10.12.2007, Бюл. № 20.
91. Пат. 39088 Україна, МПК А61 L17/00. Спосіб одержання резорбтивного біологічно активного шовного матеріалу / Гончар С.В., Проніна О.М., Костенко В.О., Скотнікова Л.В., Левков А.А.; № u 2008 06857; заявл. 19.05.2008, опубл. 10.02.2009, Бюл. №3
92. Пат. UA 81798 U Спосіб оптимізації репаративних процесів у хірургічній рані / Діхтенко Т.Г., Костенко В.О., Левков А.А. [та ін.]; заяв. і патентовласник Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія».- u 2013 01174; заявл. 31.01.2013, опубл. 10.07.2013, Бюл. № 13.
93. Пат. UA 82289 U Спосіб оцінки системної дії хірургічних шовних матеріалів / Костенко В. О., Проніна О. М., Діхтенко Т. Г. [та ін.]; заяв. і патентовласник Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія». – u 201302179; заявл. 21.02.2013; опубл. 25.07.2013, Бюл.№ 14.
94. Поберезкина Н.Б. Биологическая роль супероксиддисмутазы / Н.Б. Поберезкина, Л.Ф. Осинская // Укр. биохим. журн. – 1989. – Т.61, №2. – С.14-23.
95. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
96. Реутов В.П. Медико-биологические аспекты циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала / В.П. Реутов // Вестн. РАМН. – 2000. – № 4. – С.35-41.
97. Рыбалов О.В. Функционально-морфологическая перестройка околоушных и поднижнечелюстных слюнных желёз на этапах развития сіалоаденита / О.В. Рыбалов, Л.М. Саяпина // Вестн. стоматол. - 1996. - № 2. - С. 290-292.
98. Соловйова Н.В. Зміни вільнорадикальних окиснювальних процесів у тканинах сім'яників білих щурів при дії на організм відпрацьованого моторного масла / Н.В. Соловйова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2010. – Т.10, №1. – С. 77-81.
99. Соловйова Н.В. Зміни окиснювального метаболізму в сперматозоїдах білих щурів при тривалій дії на організм відпрацьованого моторного масла / Н.В. Соловйова, В.О. Костенко // Вісн. пробл. біол. і мед. – 2010. – №1. – С. 177-179.
100. Соловйова Н.В. Зміни функціональних показників сперми білих щурів за умов тривалої дії на організм відпрацьованого моторного масла / Н.В. Соловйова, В.О. Костенко // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2008. – Т. 3, №4. – С. 34-39.
101. Соловйова Н.В. Кисень-залежні механізми патогенної дії відпрацьованого моторного масла на репродуктивну систему свавців/ Н.В. Соловйова, В.О. Костенко // Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии : Мат. V Междунар. научно-техн. конф. БФФХ-2009. - Севастополь, 2009. - С. 99-101.
102. Соловйова Н.В. Морфологічні та морфометричні зміни в сім'яниках щурів за умов тривалої дії на організм відпрацьованого моторного масла / Н.В. Соловйова, С.В. Стецук // Світ медицини та біології. – 2010. - №1. – С. 49-54.
103. Соловйова Н.В. Репродуктивна здатність білих щурів-самців за умов тривалого введення відпрацьованого автомобільного масла / Н.В. Соловйова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2009 – Т.9, №2. – С. 124-126.
104. Соловйова Н.В. Фізико-хімічна оцінка можливості використання оксиду азоту у якості ефективного регулятора багатьох патологій в організмі людини / Н.В. Соловйова // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2014. – Т.14, №4. – С. 223-228.
105. Сорокін Б. В. Роль утворення пероксинітриту на структурно-метаболічні зміни кісткової тканини при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / Б. В. Сорокін, В. О. Костенко // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2012. – №4, дод. Б. – С. 78-82

106. Сорокін Б. В. Зміни компонентів органічного матриксу кісткової тканини щурів при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / Б. В. Сорокін, В. О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2013. – Т.13, №2. – С. 220-224.
107. Сорокін Б.В. Вплив пектину та пектиновмісних продуктів на функціонально-метаболичні зміни кісткової тканини при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / Б. В. Сорокін, В. О. Костенко // Світ медицини та біології. – 2013. – № 4. – С. 86-89.
108. Сорокін Б. В. Вплив L-селенометіоніну на патоморфологічні зміни кісток при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / Б. В. Сорокін, І. І. Старченко, В. О. Костенко // Науковий вісник МНУ ім. В.О. Сухомлинського : сб. наукових праць / за ред. І.В. Наконечного, В.С. Черна. – Вип. 2 (101). – Миколаїв : МНУ ім. В.О. Сухомлинського, 2013. - (Сер. Біологічні науки). – С. 218-224.
109. Сорокін Б.В. Роль NO-синтаз у механізмах структурно-функціональних порушень кісток при відтворенні глюкокортикоїдного остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / Б. В. Сорокін, В. О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2013. – Т.13, №4. – С. 178-181.
110. Сорокин Б.В. Характер ремоделирования костей при воспроизведении экспериментального остеопороза при хронической интоксикации нитрата натрия / Б. В. Сорокин, В. А. Костенко // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2013. – № 4. – С. 74-76.
111. Сорокман Т.В. Роль монооксида нітрогену в розвитку гастродуоденальної патології / Т.В. Сорокман, Д.Р. Андрійчук, С.В. Сокольник, О.В. Макарова // Буковинськ. мед. вісн. – 2009. – Т. 13, №1. – С. 136-139.
112. Стасюк О. А. Вплив пектину та пектиновмісних продуктів на окиснювальні процеси у тканинах слинних залоз білих щурів за умов спільного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію / О.А. Стасюк, В. О. Костенко // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2012. – №4. – С. 112-116.
113. Стасюк О. А. Зміни окиснювального метаболізму у слинних залозах 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.12, №4. – С. 167-171.
114. Стасюк О. А. Роль ізоформ NO-синтази у механізмах порушень вільнорадикальних процесів у слинних залозах щурів за умов спільного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію / О.А. Стасюк, В. О. Костенко // Світ медицини та біології. – 2012. – № 4. – С. 101-104.
115. Стасюк О. А. Вплив скевенджерів пероксинітриту на окиснювальні процеси у тканинах слинних залоз білих щурів за умов спільного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію / О.А. Стасюк, В. О. Костенко // Проблеми екології та медицини. – 2012. – Т.16, №5-6. – С. 30-33.
116. Степанов Ю.М. Аргинин в медичинській практиці / Ю.М. Степанов, І.Н. Кононов, А.І. Журбина, А.Ю. Филиппова // Журн. АМН України. – 2004. – Т. 10, № 1. – С. 340-352.
117. Тарасенко Л.М. Корекція L-аргініном ушкоджень клітин шлунка за пептичної виразки / Л.М. Тарасенко, К.С. Непорада, І.М. Скрипник // Укр. біохім. журн. – 2002. – Т.74, №4а (Додаток 1). – С.106.
118. Тарасенко Л.М. Паралелізм метаболічних порушень в тканинах шлунка і пародонта при стрессорних воздействиях / Л.М. Тарасенко, І.Н. Скрипник, К.С. Непорада // Бюл. експерим. биол. мед. – 2000. – Т.130, №7. – С.31-34.
119. Фартушна А. М. Вплив скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну на стан окиснювальних і відновлювальних процесів у тканинах ясен білих щурів за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / А. М. Фартушна, В. О. Костенко // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2012. – Т.7, №1. – С. 111-116.
120. Фартушна А. М. Стан окиснювальних процесів у тканинах ясен білих щурів у динаміці хронічної інтоксикації нітратом натрію / А. М. Фартушна, В. О. Костенко // Проблеми екології та медицини. – 2012. – Т.16, №5-6. – С. 81-84.
121. Фартушна А. М. NO-залежні зміни окиснювального метаболізму у тканинах ясен білих щурів за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / А. М. Фартушна, В. О. Костенко // Проблеми екології та медицини. – 2012. – Т.16, №3-4. – С. 48-51.
122. Фартушна А. М. NO-залежні зміни сполучнотканинних структур ясен білих щурів за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / А. М. Фартушна, В. О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2012. – Т.12, №1-2. – С. 215-218.
123. Цебржинский О.И. Дифференцированное спектрофотометрическое определение продукции супероксида в тканях НСТ-тестом / Цебржинский О.И. // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2002. – Т.2, №1. – С.96-97.
124. Цебржинский О. И. Источники супероксида при остром стрессе / О.И. Цебржинский, К.С. Непорада, С.В. Денисенко, Т.И. Пурденко и др. // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. - 2002. - Т. 2, Вип. 2 (4). - С. 42-44.
125. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих / [В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, В.Е. Охотин, Н.С. Косицын]. – М. : Наука, 1998. – 159 с.
126. Шанин В.Ю. Патопфизиология критических состояний / Шанин В.Ю. – СПб. : Элби-СПб, 2003. – 436 с.
127. Шараев П.Н. Метод определения гликозаминогликанов в биологических жидкостях / П.Н. Шараев, В.Н. Пишков, Н.И. Соловьева [и др.] // Лаб. дело. – 1987. – №5.- С.330-332.

128. Шараев П.Н. Метод определения фукозы, не связанной с белками / П.Н. Шараев, Н.С. Стрелков, Р.Р. Кильдиярова [и др.] // Клини. лаб. диагностика. – 1997. – №4. – С. 17-18.
129. Шаталин Б.О. Влияние мелатонина на окислительный метаболизм семенников на фоне действия нитратной интоксикации и рентгеновского облучения / Б.О. Шаталин, В.А. Костенко // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2014. – №3 (47). – С. 42-44.
130. Шаталин Б.О. Состояние окислительного метаболизма семенников на фоне действия нитратной интоксикации и рентгеновского облучения/Б.О. Шаталин, В.А. Костенко // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2014. - № 3 (37). – С. 56-61.
131. Шумаев К.Б. Взаимодействие динитрозильных комплексов железа с интермедиатами окислительного стресса / К.Б. Шумаев, А.А. Губкин, С.А. Губкина [и др.] // Биофизика. – 2006. – Т.51, №3. – С.472-477.
132. Atkinson D.E. The energy charge of the adenylate pools as a regulatory parameter: Interaction with feedback modifiers / D.E. Atkinson // Biochemistry. – 1968. – V.7, №11. – P.4030-4034.
133. Barbul A. Proline precursors to sustain Mammalian collagen synthesis / A. Barbul // J Nutr. – 2008. – V. 138, №10. – P. 2021S-2024S.
134. Barbul A. Use of exogenous arginine in multiple organ dysfunction syndrome and sepsis / A. Barbul, A. Uliyargoli // Crit Care Med. – 2007. – V.35, № 9. – Suppl. – P. S564-S567.
135. Beutler E. Methods of enzymatic analysis / ed. E. Beutler – N.Y., 1975. – V.1. – 565 p.
136. Debats I.B. Role of arginine in superficial wound healing in man / I.B. Debats, T.G. Wolfs, T. Gotoh [et al.] // Nitric Oxide. – 2009. – V. 21, №3-4. – P. 175-183.
137. Cal C. Decrease in salivary secretion by radiation mediated by nitric oxide and prostaglandins / C. de la Cal, A. Lomniczi, C.E. Mohn [et al.] // Neuroimmunomodulation. – 2006. – V.13, №1. – P. 19-27.
138. Catalan M.A. The salivary gland fluid secretion mechanism / M.A. Catalan, T. Nakamoto, J.E. Melvin // J. Med. Invest. – 2009. - V. 56, Suppl. – P. 192-196.
139. Hon W.M. Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby? / W.M. Hon, K.H. Lee, H.E. Khoo // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2002. – V. 962. – P. 275-295.
140. Jaworeck D. Adenosin-5'-diphosphat und adenosin-5'-monophosphat / D. Jaworeck, W. Gruber, H.V. Bermeyer // Methoden der enzymatischen analyse. – Bd.II. – Weinheim : Verlag – Chemie, 1974. – S.2147-2151.
141. Kim S.H. Abrogation of cisplatin-induced hepatotoxicity in mice by xanthorrhizol is related to its effect on the regulation of gene transcription / S.H. Kim, K.O. Hong, W.Y. Chung [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2004. – V. 196, №3. – P. 346-355.
142. Kathy K. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease / K. Kathy // Circ. Res. – 2000. – V.86. – P.494-502.
143. Kdolsky R.K. The influence of oral L-arginine on fracture healing: an animal study / R.K. Kdolsky, W. Mohr, H. Savidis-Dacho [et al.] // Wien Klin Wochenschr. – 2005. – Bd.117, №19-20. – S. 693-701.
144. Kim Y.S. Superoxide reactivates nitric oxide-inhibited catalase / Y.S. Kim, S. Han // Biol. Chem. – 2000. – V.381, №12. – P.1269-1271.
145. Kwiecien S. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions / S. Kwiecien, T. Brzozowski, P.C. Konturek, S.J. Konturek // J Phys Pharm. – 2002. – V.53, №4. – P. 761-773.
146. Kwiecien S. Gastroprotection by pentoxifylline against stress-induced gastric damage: Role of lipid peroxidation, antioxidizing enzymes and proinflammatory cytokines / S. Kwiecien, T. Brzozowski, P.C. Konturek [et al.] // J Physiol Pharmacol. – 2004. – V.55, №2. – P.337-355.
147. Kwiecien S. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions / S. Kwiecien, T. Brzozowski, P.Ch. Konturek, S.J. Konturek // J Physiol Pharmacol. – 2002. – V.53, №4 (Pt 2). – P.761-773.
148. Laude K. NO produced by endothelial NO synthase is a mediator of delayed preconditioning-induced endothelial protection / K. Laude, J. Favre, C. Thuillez [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2003. – V.284, №6. – P. H2053-H2060.
149. Liu P.T. Role of tissue glutathione in prevention of surgical trauma / P.T. Liu, C. Ioannides, A.M. Symons, D.V. Parke // Xenobiotica. – 1993. – V. 23, №8. – P. 899-911.
150. Liu P.T. Studies in surgical trauma: oxidative stress in ischaemia-reperfusion of rat liver / P.T. Liu, A.M. Symons [et al.] // Clin Sci (Lond). – 1994. – V.86, №4. – P. 453-460.
151. Monzani E. Binding of nitrite and its reductive activation to nitric oxide at biomimetic copper centers / E. Monzani, G.J. Anthony, A. Koolhaas [et al.] // J. Biol. Inorg. Chem. – 2000. – V.5, №2. – P.251-261.
152. Ohta Y. L-arginine protects against stress-induced gastric mucosal lesions by preserving gastric mucus / Y. Ohta, K. Nishida // Clin Exp Pharmacol Physiol. – 2002. – V.29, №1-2. – P.32-38.
153. Menger M.D. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? / M.D. Menger, B. Vollmar // Langenbecks Arch Surg. – 2004. – V.389, №6. – P. 475-484.
154. Morris S.M. Jr. Arginine: beyond protein / S.M. Jr. Morris // Am J Clin Nutr. – 2006. – V.83, №2. – P. 508S-512S.
155. Morris S.M. Jr. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge / S.M. Jr. Morris // J Nutr. – 2007. – V. 137, №6. – Suppl 2. – P. 1602S-1609S.
156. Morris S.M. Jr. Enzymes of arginine metabolism / S.M. Jr. Morris // J Nutr. – 2004. – V. 134, №10 Suppl. – P. 2743S-2747S

157. Murphy M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species / M.P. Murphy // *Biochem. J.* – 2009. – V. 417. – P. 1–13.
158. Ponrdenz E. Alteration of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide / E. Ponrdenz, R. Kahl // *Free Radical. Biol. Med.* – 1998. – V.24, №1. – P.27-38.
159. Pou S. Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase / S. Pou, L. Keaton, W. Surichamorn, G.M. Rosen // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274, №14. – P. 9573-9580.
160. Soinila J. Nitric oxide synthase in human salivary glands / J. Soinila, K. Nuorva, S. Soinila // *Histochem. Cell Biol.* – 2006. – V. 125, №6. – P. 717-723.
161. Szabó S. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics / C. Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi // *Nature Rev.* – 2007. – V. 6. – P. 662-680.
162. Takeuchi K. Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats / K. Takeuchi, R. Hatazawa, M. Tanigami [et al.] // *Life Sci.* – 2007. – V. 80, №4. – P. 329-336.
163. Uğar-Cankal D. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases / D. Uğar-Cankal, N. Ozmeric // *Clin. Chim. Acta.* – 2006. – V.366, №1-2. – P. 90-100.
164. Wu G. 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.