

УДК 616.316-001-092.9:547.271

О. В. Богданов, В. О. Костенко

ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

### ВПЛИВ СКЕВЕНДЖЕРІВ ПЕРОКСИНИТРИТУ НА ОКИСНИЙ МЕТАБОЛІЗМ У ТКАНИНАХ ПАРОДОНТА ЩУРІВ ЗА УМОВ ПОЄДНАНОГО НАДЛИШКОВОГО НАДХОДЖЕННЯ НІТРАТУ ТА ФТОРИДУ НАТРІЮ

У експерименті на 50 білих щурах досліджено вплив скевенджерів пероксинітритру (L-селенометіоніну та сечової кислоти) на стан окисного (NO-синтазного) шляху метаболізму L-аргініну, рівень продукції супероксидного аніон-радикала, пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ), антиоксидантний (АО) захист у м'яких тканинах пародонта за умов поєднаної токсичної дії нітрату та фториду натрію. Виявлено, що застосування L-селенометіоніну за умов експерименту знижує в тканинах пародонта сумарну активність NO-синтази, продукцію супероксидного аніон-радикала НАДФН- і НАДН-залежними електронно-транспортними ланцюгами та НАДФН-оксидазою лейкоцитів, обмежує ПОЛ, підвищує АО потенціал. Введення сечової кислоти за умов експерименту знижує у тканинах пародонта сумарну активність NO-синтази, генерацію супероксидного аніон-радикала дихальним ланцюгом мітохондрій, обмежує ПОЛ, збільшує активність каталази.

**Ключові слова:** скевенджери пероксинітритру, NO-синтаза, супероксидний аніон-радикал, пероксидне окиснення ліпідів, антиоксидантна система, пародонт.

*Робота є фрагментом НДР «Роль активних форм кисню, системи оксиду азоту та транскрипційних факторів у механізмах патологічного системогенезу», № держреєстрації 0114U004941.*

На території України, зокрема в Полтавській області, залишається актуальною проблема комбінованого впливу на здоров'я населення таких екологічно небезпечних чинників хімічної природи як неорганічні нітросполуки та фториди [4, 6]. Нами показано, що поєднана дія нітрату та фториду натрію протягом 30 діб потенціює в тканинах пародонта щурів продукцію супероксидного аніон-радикала НАДФН- і НАДН-залежними електронно-транспортними ланцюгами (ЕТЛ), а також НАДФН-оксидазою лейкоцитів. При цьому збільшується утворення високотоксичного пероксинітритру [2]. Останній генерується в реакції оксиду азоту (NO) з супероксидним аніон-радикалом і далі розкладається з утворенням інших високоактивних сполук – діоксиду азоту (NO<sub>2</sub>) і ОН-радикала [12, 13].

Пероксинітрит вважається важливим патогенетичним фактором розвитку інфекційних, токсичних, ішемічних та метаболічних ушкоджень пародонта [5]. Для дослідження ефектів пероксинітритру *in vivo* застосовуються скевенджери цієї речовини, зокрема L-селенометіонін та сечова кислота [8, 13]. Показано, що сполуки селену з низькою молекулярною масою ефективно реагують з пероксинітритом та захищають модельні речовини від окиснення та нітрування, а плазмідну ДНК від пероксинітрит-індукованих одониткових розривів [10]. Проте, дія скевенджерів пероксинітритру на окисні процеси в тканинах пародонта щурів за умов поєднаного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію залишається нез'ясованою.

**Метою** роботи було вивчення впливу скевенджерів пероксинітритру (L-селенометіоніну та сечової кислоти) на стан окисного (NO-синтазного) шляху метаболізму L-аргініну, рівень продукції супероксидного аніон-радикала, пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ), антиоксидантний (АО) захист у м'яких тканинах пародонта щурів за умов поєднаної токсичної дії нітрату та фториду натрію.

**Матеріал та методи дослідження.** Дослідження були проведені на 40 білих щурах лінії Вістар масою 180-200 г у таких серіях дослідів: у першій – необхідні показники вивчали у інтактних тварин (контрольна серія), у другій – після поєднаного введення нітрату натрію (200 мг/кг маси тіла) та фториду натрію (10 мг/кг маси тіла) протягом 30 діб, у наступних – протягом періоду 30-денної поєднаної дії нітрату та фториду натрію тваринам внутрішньоочередово вводили відповідно L-селенометіонін ("Sigma-Aldrich, Inc.", США) у дозі 3 мг/кг [11] 2 рази на тиждень, а також сечову кислоту ("Sigma-Aldrich, Inc.", США) у дозі 250 мг/кг [8] 3 рази на тиждень. Евтаназію тварин виконували методом дислокації шийних хребців під ефірним наркозом.

Активність NOS визначали за різницею концентрації нітрит-йонів (NO<sup>2-</sup>) до та після інкубації гомогенату м'яких тканин пародонта у середовищі, що містить L-аргінін та НАДФН.

Концентрацію  $\text{NO}^2$  визначали шляхом утворення діазосполук у реакції з сульфаниловою кислотою, а потім проводили реакцію з  $\alpha$ -нафтилетилендіаміном, у результаті якої утворюються похідні червоного кольору [9]. Вміст пероксинітрид-йонів проводили з використанням реакції з йодидом калію в буферизованому середовищі при  $\text{pH}=7,0$  спектрофотометрично за поглинанням на довжині хвилі 355 нм [7]. Утворення супероксидного аніон-радикала (САР) у гомогенаті тканин пародонта оцінювали при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм з індукторами у вигляді НАДН, НАДФН і бактеріальними ліпополісахаридами (пірогенал) [3]. Рівень ПОЛ у тканинах оцінювали по утворенню в реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними сполуками забарвленого триметінового комплексу [2]. Активність АО системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час 1,5-годинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю каталази [2]. Отримані дані обробляли варіаційно-статистичним методом з використанням критерію Ст'юдента.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Введення щурам L-селенометіоніну та сечової кислоти за умов відтворення поєднаної інтоксикації нітратом і фторидом натрію суттєво позначається на показниках системи NO у тканинах пародонта (див. табл.). Так, сумарна активність NOS знижується – відповідно на 36,0% ( $p<0,001$ ) та 15,2% ( $p<0,05$ ) у порівнянні з даними другої серії. Концентрація пероксинітриду за цих умов знижується: при застосуванні L-селенометіоніну – на 32,8% ( $p<0,01$ ), сечової кислоти – на 29,8%,  $p<0,05$  у порівнянні з даними другої серії. Вміст нітритів суттєво не відрізняється від даних першої та другої серій.

Таблиця

**Вплив скевенджерів пероксинітриду на окисний метаболізм у тканинах пародонта за умов поєднаного надходження нітрату та фториду натрію**

Показники	Серії дослідів (M+m, n=40)			
	Інтактні тварини	Поєднане введення нітрату та фториду натрію		
		Контроль	+ L-селенометіонін	+ сечова кислота
NOS, мкмоль $\text{NO}^2$ /г·хв.	4.59±0.09	7.31±0.28 *	4.68±0.16 **	6.20±0.32 */**
Вміст $\text{NO}^2$ , мкмоль/г	0.08±0.01	0.13±0.01 *	0.11±0.01	0.11±0.01
Пероксинітрид, мкмоль/г	0.95±0.04	1.31±0.1 *	0.88±0.08 **	0.92±0.10 **
Продукція САР, нмоль/г·с				
НАДФН-залежні ЕТЛ	20.11±1.02	38.22±1.21 *	25.17±1.08 */**	36.22±1.39 *
НАДН-залежний ЕТЛ	22.52±1.01	38.99±1.01 *	27.27±0.63 */**	29.27±0.62 */**
НАДФН-оксидаза лейкоцитів	1.08±0.16	1.98±0.07 *	1.37±0.13 **	1.54±0.20
Концентрація ТБК-реактивів до інкубації	18.89±3.49	45.87±2.10 *	26.25±1.72 **	29.81±3.57 **
після інкубації	36.35±2.75	76.15±1.06 *	42.31±3.23 **	50.17±2.31 */**
приріст	17.45±1.74	30.29±2.74 *	16.00±2.91 **	20.37±5.08
Каталаза, мкат/г	0.28±0.02	0.15±0.02 *	0.28±0.03 **	0.26±0.03 **

Примітка: \* –  $p<0,05$  у порівнянні з даними інтактних щурів; \*\* –  $p<0,05$  у порівнянні з даними другої серії.

Введення щурам L-селенометіоніну за умов експерименту зменшує у тканинах пародонта вироблення САР НАДФН-залежними ЕТЛ (мікросомальним і NOS) – на 34,1% ( $p<0,001$ ), НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ – на 30,1% ( $p<0,001$ ), НАДФН-оксидазою лейкоцитів – на 30,8% ( $p<0,01$ ) у порівнянні з даними другої серії. Застосування сечової кислоти – знижує вироблення САР НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ – на 24,9% ( $p<0,001$ ) у порівнянні з даними другої серії, проте суттєво не позначається на генерації цього радикала НАДФН-залежними ЕТЛ (мікросомальним і NOS) та НАДФН-оксидазою лейкоцитів.

Такі зміни відображають, перш за все, здатність пероксинітриду порушувати у клітинах функціонування дихального ланцюга мітохондрій. Пероксинітрид нітрозилує та нітрує компоненти дихального ланцюга, окиснює цистеїнові та метіонінові залишки білків, пригнічує мітохондріальні ферментні комплекси I та II, аконітазу, АТФ-азу, супероксиддисмутазу, креатинкіназу та глутатіонпероксидазу, порушує FeS-білки, знижує рівень відновленого глутатіону [13]. Наслідком цього є збільшення одноелектронного відновлення кисню з утворенням САР, АО недостатність, що зумовлює розвиток окисного стресу.

Введення L-селенометіоніну та сечової кислоти за умов експерименту зменшує у тканинах пародонта концентрацію ТБК-активних сполук: до інкубації – відповідно на 42,8% ( $p<0,001$ ) та 35,0% ( $p<0,01$ ); після інкубації – на 44,4% ( $p<0,001$ ) та 34,1% ( $p<0,001$ ) у порівнянні з даними другої серії.

Застосування L-селенометіоніну за наведених умов супроводжується зниженням приросту концентрації ТБК-активних речовин за час інкубації – на 47,2% ( $p < 0,01$ ) у порівнянні з даними другої серії, що вказує на підвищення АО потенціалу в тканинах пародонта. Введення сечової кислоти за умов експерименту достовірно не впливає на величину приросту концентрації ТБК-активних речовин. Введення L-селенометіоніну та сечової кислоти за умов відтворення поєднаної інтоксикації підвищує у тканинах пародонта активність каталази – відповідно на 86,7% ( $p < 0,01$ ) та 73,3% ( $p < 0,02$ ) у порівнянні з даними другої серії.

### Висновки

1. Застосування L-селенометіоніну за умов експерименту знижує у м'яких тканинах пародонта сумарну активність NO-синтази, продукцію супероксидного аніон-радикала НАДФН- і НАДН-залежними електронно-транспортними ланцюгами та НАДФН-оксидазою лейкоцитів, обмежує пероксидне окиснення ліпідів, підвищує антиоксидантний потенціал.
2. Введення сечової кислоти за умов експерименту знижує у м'яких тканинах пародонта сумарну активність NO-синтази, генерацію супероксидного аніон-радикала дихальним ланцюгом мітохондрій, обмежує пероксидне окиснення ліпідів, збільшує активність каталази.

### Список літератури

1. Беркало Л. В. 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.
2. Богданов О.В. Вільнорадикальні процеси в тканинах пародонта щурів за умов поєданого надлишкового надходження нітрату та фториду натрію / О.В. Богданов, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2016. – Т. 16, № 2. – С. 210-213.
3. Костенко В. О. Продукція супероксидного аніон-радикала та оксиду азоту у тканині нирок після хірургічного втручання / В. О. Костенко, О.І. Цебржинський // Фізіол. журн. – 2000. – Т.46, №5. – С.56-62.
4. Тригуб В. І. Закономірності поширення фтору у навколишньому середовищі / В. І. Тригуб // Геополітика і екогеодинаміка регіонів. – 2014. – Т. 10, №1. – С. 231-238.
5. Фартушна А. М. Вплив сквенджеру пероксинітриду 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.
6. Фесенко О. Г. Характеристика нітратного забруднення поверхневих і підземних вод Полтавського регіону / О. Г. Фесенко // Вісн. Полтавської державної аграрної академії. – 2014. – № 1. – С. 121-124.
7. Шрайбман Г. Н. Спектрофотометрические методики определения пероксинитрита и нитрита / Г. Н. Шрайбман, Е.П. Дягилева, А. В. Скибина // Вестн. КемГУ. – 2011. – №1. – С. 200-206.
8. Durante P. Effect of uric acid on nephrotoxicity induced by mercuric chloride in rats // P. Durante, F. Romero, M. Pérez [et al.] // Toxicol. Ind. Health. – 2010. – Vol.26, №3. – P. 163-174.
9. Hevel J.M. Purification of the inducible murene macrophage nitric oxide synthase / J.M. Hevel // J. Biol. Chem. – 1991. – Vol. 266, № 34. – P. 22789-22791.
10. Hrabarova E. Pro-oxidative effect of peroxyntirite regarding biological systems: a special focus on high-molar-mass hyaluronan degradation / E. Hrabarova, I. Juranek, L. Soltes // Gen. Physiol. Biophys. – 2011. – Vol.30, №3. – P. 223-238.
11. 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. – Vol.284, №6. – P. H2053-H2060.
12. Radi R. Peroxynitrite, a Stealthy Biological Oxidant / R. Radi // J. Biol. Chem. – 2013. – Vol.288, №37. – P. 26464-26472.
13. Szabó C. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics / C. Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi // Nature Reviews. – 2007. – Vol. 6. – P. 662-680.

### Реферати

#### ВЛИЯНИЕ СКАВЕНДЖЕРОВ ПЕРОКСИНИТРИТА НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ В ТКАНЯХ ПАРОДОНТА КРЫС ПРИ СОЧЕТАННОМ ИЗБЫТОЧНОМ ПОСТУПЛЕНИИ НИТРАТА И ФТОРИДА НАТРИЯ

Богданов А. В., Костенко В. А.

В эксперименте на 50 белых крысах исследовано влияние сквенджеров пероксинитрита (L-селенометионина и мочево́й кислоты) на состояние окислительного (NO-синтазного) пути метаболизма L-аргинина, уровень продукции супероксидного анион-радикала, пероксидное окисление липидов (ПОЛ) и антиоксидантную (АО) защиту в мягких тканях пародонта при сочетанном токсическом действии нитрата и фторида натрия. Выявлено, что применение L-селенометионина в условиях эксперимента снижает в тканях пародонта суммарную активность NO-синтазы, продукцию супероксидного анион-радикала НАДФН- и НАДН-зависимыми электронно-транспортными цепями и НАДФН-оксидазой лейкоцитов, ограничивает ПОЛ

#### EFFECTS OF PEROXYNITRITE SCAVENGERS ON OXIDATIVE METABOLISM IN PERIODONTAL TISSUES OF RATS UNDER EXCESSIVE COMBINED SODIUM NITRATE AND FLUORIDE INTAKE

Bogdanov A.V., Kostenko V.A.

This research aimed to study the effects of peroxyntirite scavengers (L-selenomethionine and uric acid) on oxidative (NO-synthase) pathway of L-arginine metabolism, the level of superoxide anion radical production, lipid peroxidation (LPO) and antioxidant (AO) protection in the soft tissues of periodontium under excessive combined sodium nitrate and fluoride intake in 50 white rats. It has been found out the use of L-selenomethionine in experimental conditions reduces the total NO-synthase activity, production of superoxide anion radical by NADPH- and NADH-dependent electron transport chains as well as by leukocyte NADPH oxidase in the periodontal tissues; limits the LPO and increases the

и повышает АО потенциал. Введение мочевой кислоты в условиях эксперимента снижает в тканях пародонта суммарную активность NO-синтазы, генерацию супероксидного анион-радикала дыхательной цепью митохондрий, ПОЛ, повышает активность каталазы.

**Ключевые слова:** скавенджер пероксинитрита, NO-синтаза, супероксидный анион-радикал, пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система, пародонт.

Стаття надійшла 5.06.2016 р.

antioxidant potential. Introduction of uric acid decreases the total NO-synthase activity, production of superoxide anion radical by mitochondrial respiratory chain and lipid peroxidation, and increases the catalase activity in the periodontal tissues.

**Key words:** peroxynitrite scavengers, NO-synthase, superoxide anion radical, lipid peroxidation, antioxidant system, periodontium.

Рецензент Єрошенко Г.А.

УДК 577.125.33:616.36-018.1-092.9.-099:543.395

А. В. Бондарева, С. О. Стеценко  
Харківський національний медичний університет, Харків

## АКТИВНІСТЬ ПРОЦЕСІВ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ У МІКРОСОМАЛЬНІЙ ФРАКЦІЇ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ПРИ ДІЇ ОЛІГОЕФІРІВ БАГАТОАТОМНИХ СПИРТІВ

Значне підвищення інтенсивності впливу ксенобіотиків на організм людини та тварин визначає актуальність проведення досліджень з пошуку нових підходів щодо компенсації порушених функцій. До широко розповсюджених ксенобіотиків відносяться олігоєфіри багатоатомних спиртів, які характеризуються значними об'ємами синтезу, широким використанням та впливом на здоров'я людини. Доведено, що більшість ксенобіотиків піддається окислювальному метаболізму у мікросомах гепатоцитів, побічним ефектом якого може бути генерація активних форм кисню. Стан цього питання за умов тривалого впливу нових представників ОЕФ-ЛП вивчено недостатньо, а саме його урахування є необхідним для розкриття механізмів біологічної дії та розроблення засобів їх корекції. У роботі використано зразки ОЕФ-ЛП марок 502 (поліоксипропіленгліколь) і 503 (поліоксипропілентріол) з регламентованими фізико-хімічними характеристиками. Слід зазначити, що альдегіди та спирти, як продукти деструкції досліджуваних ОЕФ, є більш токсичними, здатними негативно впливати на організм. Можна передбачати, що в основі біологічної дії ОЕФ можливо лежить не тільки їх безпосередній вплив на органи та системи організму, а також опосередкований через продукти деструкції та трансформації.

**Ключові слова:** ліпопероксидація, олігоєфіри багатоатомних спиртів, мікросомальна фракція, ксенобіотики, мікросоми гепатоцитів.

*Робота є фрагментом НДР «Біохімічні механізми розвитку дисметаболических процесів за умов впливу хімічних чинників навколишнього середовища», номер державної реєстрації 0115U000240.*

Значне підвищення інтенсивності впливу ксенобіотиків (КБ) на організм людини та тварин визначає актуальність проведення досліджень з розкриття механізмів розвитку можливих патологічних процесів, пошуку нових підходів щодо компенсації порушених функцій [1-3].

До широко розповсюджених КБ відносяться олігоєфіри багатоатомних спиртів технічної назви «Лапроли» (ОЕФ-ЛП), які характеризуються значними об'ємами синтезу, широким використанням (як основа промислового випуску пластмас, поліуретанів, лакофарбних матеріалів, миючих засобів тощо), надходженням до джерел питного водопостачання населення та завдяки цьому впливом на здоров'я людини [4, 5]. Доведено, що більшість КБ піддається окислювальному метаболізму у мікросомах гепатоцитів, побічним ефектом якого може бути генерація активних форм кисню (АФК), здатних ініціювати процес ліпопероксидації з наступною деструкцією мембранних структур, порушенням функціональної активності локалізованих у них ферментних систем знешкодження КБ [2, 6, 7]. Стан цього питання за умов тривалого впливу нових представників ОЕФ-ЛП вивчено недостатньо, а саме його урахування є необхідним для розкриття механізмів біологічної дії та розроблення засобів їх корекції.

**Метою** роботи було оцінити інтенсивність аскорбат-Fe<sup>2+</sup>- і NADPH-індукованої ліпопероксидації у мікросомальній фракції печінки щурів при впливі ОЕФ-ЛП марок 502 і 503 у дозах 1/10 і 1/100 LD<sub>50</sub>.

**Матеріал та методи дослідження.** У роботі використано зразки ОЕФ-ЛП марок 502 (поліоксипропіленгліколь) і 503 (поліоксипропілентріол) з регламентованими фізико-хімічними характеристиками. Експерименти проведено на статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar вагою 180-220 г. Утримання та маніпуляції над тваринами виконувались відповідно до основних принципів біоетики. Тварин піддавали пероральній затравці за допомогою зонда водними розчинами речовин щоденно одноразово протягом 45 днів у дозах 1/10 і 1/100 LD<sub>50</sub>. Середньолетальні дози (LD<sub>50</sub>) становлять для ОЕФ-ЛП-502 - 1,83 г/кг; ОЕФ-ЛП-503 - 21,3 г/кг маси. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми питної води. Дослідження показників проводили у динаміці спостереження: на 15, 30, 45, 60-ту добу після початку