

## ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРА ІНДУЦИБЕЛЬНОЇ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ N-(3-(АМІНОМЕТИЛ)БЕНЗИЛ)АЦЕТАМІДИНУ ПРИ ЛІПОПОЛІСАХАРИДНОМУ ЗАПАЛЕННІ ТКАНИН ПАРОДОНТА

*Метою роботи було дослідити вплив селективного інгібітора iNOS N-(3-(амінометил)бензил)ацетамідину (1400W) на перебіг ліпополісахаридного (ЛПС) запалення тканин пародонта. Дослідження проведено на білих щурах, у яких моделювали пародонтит шляхом введення в тканини ясен бактеріального ЛПС. Паралельне з ЛПС застосування 1400W суттєво попереджувало підвищення в крові й пародонті вмісту нітритів і нітратів, ТБК-активних продуктів, окисномодифікованих білків, запобігало зниженню активності супероксиддисмутази і зменшенню вмісту відновленого глутатіону. Зроблено висновок, що в патогенезі пародонтиту, викликаного ендотоксинами грамнегативної мікрофлори, важлива роль належить гіперактивації індукцибельної NO-синтази.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** пародонтит, ліпополісахарид, оксидативний та нітрооксидативний стреси, N-(3-(амінометил)бензил)ацетамідин.

ВСТУП. Однією з найважливіших проблем сучасної стоматології є запальні захворювання тканин пародонта [16]. Основну пародонтопатогенну роль відіграють анаеробні грамнегативні мікроорганізми. Механізми, що лежать в основі впливу токсинів грамнегативної флори на патогенез пародонтиту, можливості корекції порушень метаболізму за такої патології на сьогодні все ще потребують детальнішого вивчення. Відомо, що при пародонтиті у тканинах ясен спостерігається підвищений вміст високоактивної індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS) [9, 14, 15]. Експресія iNOS при пародонтиті відбувається під впливом бактеріальних ліпополісахаридів, ендотоксинів, цитокінів та інших факторів. Надмірне утворення NO, що має місце при стимуляції iNOS ендотоксинами мікрофлори, призводить до надмірного утворення пероксинітриду і, як наслідок, до нітрооксидативного стресу. Як відомо, у патогенезі генералізованого пародонтиту беруть участь порушення процесів ліпопероксидації в ясенних тканинах, що тісно пов'язано з продукуванням NO і цитокіновим профілем. Встановлено також, що при пародонтиті відбуваються виражені зміни системи антиоксидного захисту в біологічних рідинах ротової порожнини і тканинах ясен [4, 7, 8]. Виходячи з розуміння важливості NO у механізмах запалення пародонта, повинна будуватися стратегія корекції

метаболічних порушень, що виникають при пародонтиті. В цьому відношенні варті уваги дослідження можливості використання при даній патології селективних інгібіторів індукцибельної форми синтази оксиду азоту.

Метою даної роботи було дослідити в експерименті захисну роль високоселективного інгібітора iNOS N-(3-(амінометил)бензил)ацетамідину (1400W) у перебізі пародонтиту, викликаного ендотоксином грамнегативної мікрофлори.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліди виконано на 30 безпородних щурах-самцях масою 150–180 г, яких утримували на стандартній дієті. Всіх тварин поділили на 3 групи: 1-ша – контроль (інтактні щури); 2-га – щури, в яких викликали запалення пародонта (протягом 2-х тижнів через день вводили в тканини ясен по 40 мікролітрів (1 мг/мл) ліпополісахариду E. Coli (ЛПС)); 3-тя – щури, яким паралельно з ЛПС протягом 2-х тижнів через день вводили внутрішньочеревно 1400W у дозі 1,5 мг/кг [3]. Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом. У гомогенаті тканин пародонта та в крові визначали рівень нітратів і нітритів (NO<sub>x</sub>) [11], ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) [1], окисномодифікованих білків (ОМБ) [6], активність супероксиддисмутази (СОД) [10], каталази (КТ) [5] та вміст відновленого глутатіону (GSH) [13]. В плазмі крові

© В. В. Щерба, М. М. Корда, 2012.

також визначали вміст церулоплазміну (ЦП) [2] і загальну антиоксидантну активність (ЗАА) [12].

Результати виражали як середнє±SEM з 10 експериментів. Зміни  $p < 0,05$  розглядали як статистично достовірні. Статистичний аналіз виконували, використовуючи стандартні статистичні програми і t-критерій Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Як видно з результатів, наведених у таблиці, нітрооксидативний і оксидативний стреси є тими фундаментальними механізмами, що відіграють важливу роль у патогенезі запалення ясен, викликаного токсинами грамнегативної мікрофлори. Про це свідчить достовірне зростання вмісту в плазмі крові й пародонті щурів, яким вводили ЛПС, нітритів і нітратів, ТБК-АП та ОМБ, а також зниження активності СОД і рівня GSH у тканинах ясен.

Паралельне з ЛПС введення тваринам 1400W протягом 2-х тижнів практично нормалізувало показники концентрації  $NO_x$  в тканинах. Так, у плазмі крові вміст нітритів і нітратів після застосування високоселективного інгібітора iNOS знизився, порівняно з нелікованими щурами, на 25 %, а в пародонті – на 31 %. Це ще раз підтверджує, що під впливом ЛПС відбувається гіперекспресія саме індукцибельної форми NO-синтази в тканинах ясен, у результаті чого синтезується надмірна кількість оксиду азоту. Оскільки NO є радикалом, його посилене продукування призводить до активації вільнорадикальних реакцій у тканинах та роз-

витку запального процесу. З іншого боку, відомо, що при захворюваннях інфекційного генезу NO також може відігравати позитивну роль, оскільки здатний виступати неспецифічним фактором захисту від бактерій. Зокрема, посилене продукування NO макрофагами стимулює реакції фагоцитозу, що сприяє елімінації інфекційного збудника з тканин. Разом із тим, дефіцит NO призводить до хронізації патологічного процесу.

Очевидно, саме попередженням вироблення надмірної кількості NO у тканинах ясен щурів з пародонтитом за допомогою 1400W і, як наслідок, пригніченням запальних реакцій можна пояснити отримані нами дані, що свідчать про достовірне зниження інтенсивності процесів ліпопероксидації в досліджуваних тканинах. Так, вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові щурів, які піддавалися корекції, зменшувався на 23 % ( $p < 0,05$ ), а в пародонті – на 20 % ( $p < 0,05$ ).

Застосування інгібітора iNOS позитивно позначилося також на параметрах, що відображають ступінь окисної модифікації нейтральних і лужних амінокислот. У тканинах пародонта щурів, яким проводили корекцію, вміст 2,4-динітрофенілгідразонів, що визначалися при 310 нм (відображає концентрацію альдегідо- і кетонпохідних нейтрального характеру), і таких, що визначалися при 430 нм (альдегідо- і кетонпохідні основного характеру), зменшився в 1,3 раза порівняно з некоригованими тваринами. У плазмі крові дані показники під-

Таблиця – Вплив N-(3-(амінометил)бензил)ацетамідину на показники інтенсивності оксидативного і нітрооксидативного стресів у плазмі крові й тканині пародонта щурів з ліпополісахаридним пародонтитом

Показник	Група тварин		
	контроль	ЛПС	ЛПС+1400W
Плазма крові			
$NO_x$ , ммоль/л	2,75±0,15	3,85±0,18*	2,92±0,22#
ТБК-АП, мкмоль/л	42,60±3,04	58,60±3,40*	45,35±3,20#
ОМБ <sub>310</sub> , мкмоль/мг білка	0,94±0,07	1,28±0,08*	1,15±0,10
ОМБ <sub>430</sub> , мкмоль/мг білка	0,50±0,02	0,85±0,06*	0,62±0,05
КТ, мкат/л	0,44±0,03	0,55±0,04	0,52±0,04
ЦП, г/л	0,26±0,01	0,22±0,02	0,23±0,02
GSH, ммоль/л	3,20±0,18	2,70±0,20	2,95±0,25
ЗАА, % гальмування утворення ТБК-АП	58,30±4,10	47,34±3,12	50,98±6,20
Тканини пародонта			
$NO_x$ , ммоль/кг	0,96±0,05	1,64±0,12*	1,14±0,10#
ТБК-АП, мкмоль/кг	2,75±0,20	3,95±0,22*	3,15±0,16#
ОМБ <sub>310</sub> , мкмоль/мг білка	3,62±0,25	5,95±0,40*	4,55±0,25#
ОМБ <sub>430</sub> , мкмоль/мг білка	2,65±0,22	5,36±0,40*	4,05±0,20#
СОД, од.	0,26±0,02	0,15±0,01*	0,22±0,02#
КТ, мкат/мг білка	1,25±0,10	1,05±0,09	1,15±0,02
GSH, ммоль/кг	184,4±10,40	118,5±7,20*	150,6±6,80#

Примітка. \* – зміни достовірні порівняно з контролем; # – зміни достовірні порівняно з показниками тварин з пародонтитом.

впливом 1400W показали лише тенденцію до зниження, проте зміни виявилися недовірними.

Як відомо, активність процесів ліпопероксидації та окисної модифікації білків залежить не тільки від інтенсивності утворення вільних радикалів, але і від функціонального стану антиоксидантної системи. У разі тривалої посиленої генерації вільних радикалів може настати виснаження захисних антиоксидантних систем, що, у свою чергу, призведе до інтенсифікації вільнорадикальних реакцій ще більшою мірою. Очевидно, запобігання під впливом 1400W надмірному продукуванню NO індукційною

NO-синтазою і, як наслідок, зменшення інтенсивності вільнорадикальних процесів у пародонті щурів, яким вводили ЛПС, були причиною отриманих нами результатів, що свідчать про позитивний ефект інгібітора iNOS на активність СОД і вміст GSH у тканинах ясен.

**ВИСНОВОК.** У патогенезі пародонтиту, викликаного ендотоксинами грамнегативної мікрофлори, важлива роль належить гіперактивації індукційної NO-синтази. Високоселективний інгібітор iNOS N-(3-(амінометил)бензил)ацетамідин позитивно впливає на перебіг ліпополісахаридного пародонтиту.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
2. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 1982. – 311 с.
3. Корда М. М. Вплив інгібітора індукційної синтази оксиду азоту N-(3-(Амінометил)бензил)ацетамідину на гепатотоксичність алілового спирту / М. М. Корда, Т. Я. Ярошенко // Мед. хім. – 2004. – 6, № 3. – С. 114–116.
4. Косенко К. Н. Показатели свободнорадикального окисления липидов и антиоксидантной защиты в ротовой жидкости больных генерализованным пародонтитом разных возрастных групп / К. Н. Косенко, Б. Б. Седлецкая, Т. П. Терешина // Вісн. стоматол. – 2004. – № 4. – С. 27–30.
5. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
6. Мещишен І. Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові / І. Ф. Мещишен // Буковин. мед. вісн. – 1998. – 2, № 1. – С. 156–158.
7. Мороз К. А. Стан пероксидної оксидації ліпідів і системи антиоксидантного захисту у хворих на генералізований пародонтит в умовах цукрового виробництва // Експерим. клін. фізіол. біох. – 2004. – № 3. – С. 87–90.
8. Пожарицкая М. М. Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в смешанной слюне у летчиков сверхзвуковой авиации при пародонтите / М. М. Пожарицкая, Т. П. Ваилова, Т. Г. Симакова // Рос. стоматол. журн. – 2005. – № 2. – С. 39–45.
9. Чайковська І. В. Роль порушень метаболізму оксиду азоту в патогенезі генералізованого пародонтиту / І. В. Чайковська // Арх. клін. експерим. мед. – 2008. – 17, № 2. – С. 226–228.
10. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологическом материале / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.
11. A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate in cell culture media / L. Ridnour, J. E. Sim, M. Hayward [et al.] // Anal. Biochem. – 2000. – 281. – P. 223–229.
12. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids / J. Stock, J. M. Gutteridge, R. J. Sharp, I. L. Dormandy // Clin. Sci. and Mol. Med. – 1974. – 47. – P. 215–222.
13. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Arch. of Bioch. and Biophys. – 1959. – 82. – P. 70–77.
14. Gingival endothelial and inducible nitric oxide synthase levels during orthodontic treatment: a cross-sectional study / M. D'Attilio, F. Di Maio, C. D'Arcangela [et al.] // Angle. Orthod. – 2004. – 74, № 6. – P. 851–858.
15. Lipid A-associated proteins from Porphyromonas gingivalis stimulate release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase / E. Y. Choi, Y. M. Hwang, J. Y. Lee [et al.] // J. Periodontal. Res. – 2007. – 42, № 4. – P. 350–360.
16. Noack B. Metabolic diseases and periodontitis / B. Noack, S. Fischer // Dtsch. Med. Wochenschr. – 2012. – 137, № 22. – P. 1155–1157.

## ПРИМЕНЕНИЕ ИНГИБИТОРА ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА N-(3-(АМИНОМЕТИЛ)БЕНЗИЛ)АЦЕТАМИДИНА ПРИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДНОМ ВОСПАЛЕНИИ ТКАНЕЙ ПАРОДОНТА

### Резюме

Целью работы было исследовать влияние селективного ингибитора iNOS N-(3-(аминометил)бензил)ацетамидина (1400W) на течение липополисахаридного (ЛПС) воспаления тканей пародонта. Исследование проведено на белых крысах, у которых моделировали пародонтит путем введения в ткани десен бактериального ЛПС. Параллельное с ЛПС применение 1400W существенно предупреждало повышение в крови и пародонте содержания нитритов и нитратов, ТБК-активных продуктов, окислительно-модифицированных белков, предотвращало снижение активности супероксиддисмутазы и уменьшение содержания восстановленного глутатиона. Сделан вывод, что в патогенезе пародонтита, вызванного эндотоксинами грамотрицательной микрофлоры, важная роль принадлежит гиперактивации индуцибельной NO-синтазы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пародонтит, липополисахарид, оксидативный и нитрооксидативный стрессы, N-(3-(аминометил)бензил)ацетамидин.

V. V. Shcherba, M. M. Korda  
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

## APPLICATION OF INOS INHIBITOR N-(3-(AMINOMETHYL)BENZYL)ACETAMIDINE AT LIPOPOLYSACCHARIDE INFLAMMATION OF PARODONTIUM TISSUE

### Summary

The aim of the study was to investigate the effect of a selective iNOS inhibitor N-(3-(aminomethyl)benzyl)acetamide (1400W) on the lipopolysaccharide (LPS) inflammation of parodontium tissues. Parodontitis was modeled by the injection of bacterial LPS into gum tissue of white rats for 2 weeks. Concurrent with LPS application of 1400W significantly prevented the increase of nitrites and nitrates, TBA-active products, oxidative modified proteins, as well as prevented the decrease of SOD activity and reduced glutathione content in blood plasma and parodontium tissue. It was concluded that hyperactivation of inducible NO synthase plays an important role in the parodontitis pathogenesis caused by endotoxins of gram-negative microflora.

KEY WORDS: parodontitis, lipopolysaccharide, oxidative and nitrooxidative stress, N-(3-(aminomethyl)benzyl)acetamide.

Отримано 16.07.12

Адреса для листування: М. М. Корда, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.