

УДК 616.316-001-092.9:547.271

Нагорняк І.В., Костенко В.О.

РОЛЬ АРГІНАЗИ У МЕХАНІЗМАХ ПОРУШЕНЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ФУНКЦІЇ СЛИННИХ ЗАЛОЗ ЩУРІВ ЗА УМОВ ДІЇ МЕТИЛОВОГО ЕФІРУ МЕТАКРИЛОВОЇ КИСЛОТИ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

У експерименті на 30 білих щурах досліджено вплив неселективного інгібітора аргіназ L-норваліну на стан вільнорадикальних процесів і білоксинтезуючу функцію піднижньощелепних слинних залоз (СЗ) за умов 30-денної аплікації 1 % розчину метилового ефіру метакрилової кислоти на слизову оболонку порожнини рота. Показано, що введення L-норваліну (через день протягом експерименту, у дозі 10 мг/кг) супроводжується реципрокним підвищенням сумарної активності NO-синтаз та концентрації нітрит-йонів, порушенням білоксинтезуючої функції піднижньощелепних слинних залоз, гіперпродукцією у тканинах супероксидного аніон-радикала НАДН-залежним (мітохондріальним) електронно-транспортним ланцюгом, активацією пероксидного окиснення ліпідів, пригніченням активності супероксиддисмутази та каталази, що вказує на протективну роль аргінази у механізмі метакрилат-залежної дисфункції слинних залоз.

Ключові слова: метиловий ефір метакрилової кислоти, аргіназа, L-норвалін, NO-синтаза, супероксидний аніон-радикал, пероксидне окиснення ліпідів, слинні залози.

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

Метиловий ефір метакрилової кислоти використовується як мономер у процесі виготовлення знімних конструкцій зубних протезів. Кількість цієї речовини у пластмасі у вільному стані становить 5-8 %. Виявлена багатофакторна негативна дія метакрилату на метаболізм і функції слинних залоз (СЗ), що супроводжується стійкими порушеннями їхньої секреції [1,6].

Нами показано, що у патогенезі дисфункції СЗ за умов 30-денної аплікації 1 % розчину метилового ефіру метакрилової кислоти на слизову оболонку порожнини рота важлива роль належить дисбалансу індукцибельної та нейрональної NO-синтаз (NOS), яка супроводжується надлишковою продукцією оксиду азоту (NO), що виявляє цитотоксичну дію [5].

Проте відомо, що порушення окисного (NO-синтазного) шляху метаболізму L-аргініну нерідко поширюється і на неокисний (аргіназний) механізм. Останній у свою чергу конкурує з NOS, особливо у мітохондріальному компартменті, де локалізована високоактивна індукцибельна ізоформа аргінази – аргіназа II [3]. Нещодавно аргінази I та II типів були виявлені у СЗ щурів [13].

Проте роль аргінази у механізмах порушень окиснювальних процесів і функцій великих СЗ при вивільненні метакрилату із ортопедичних конструкцій залишається нез'ясованою.

Метою роботи було вивчення впливу неселективного інгібітора аргіназ L-норваліну на стан вільнорадикальних процесів і білоксинтезуючу функцію піднижньощелепних СЗ щурів за умов тривалої аплікації 1 % розчину метилового ефіру метакрилової кислоти на слизову оболонку порожнини рота.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження були проведені на 30 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-220 г у 3-х серіях дослідів: у першій необхідні показники вивчали у інтактних тварин (контрольна серія), у другій – після 30-денної аплікації 1% розчину метилового ефіру метакрилової кислоти на слизову оболонку порожнини рота, у третій – поряд з аплікацією 1% розчину метилового ефіру метакрилової кислоти на слизову оболонку порожнини рота (протягом 30 діб) тваринам вводили неселективний інгібітор аргіназ – L-норвалін (через день, у дозі 10 мг/кг [2]).

Для дослідження під ефірним наркозом вилучали піднижньощелепні СЗ у комплексі з великими під'язиковими. Останні відсепарували, після чого, не виводячи тварин з наркозу, проводили евтаназію тварин методом дислокації шийних хребців.

Активність ферменту окисного шляху метаболізму L-аргініну – NOS – визначали за

різницею концентрації нітрит-йонів (NO_2^-) до та після інкубації гомогенату піднижньощелепних СЗ у середовищі, що містить L-аргінін та НАДФН [9]. Активність ферменту неокисного (аргіназного) шляху метаболізму L-аргініну – орнітиндекарбоксилази (ОДК) – визначали за зниженням вмісту орнітину в інкубаційному середовищі [7].

Утворення супероксидного аніон-радикала (O_2^-) у тканинах піднижньощелепних СЗ оцінювали при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм з такими індукторами: НАДН – для оцінки продукції O_2^- мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом (ЕТЛ);

НАДФН – для оцінки продукції O_2 мікосомальним ЕТЛ та NOS [8]. Рівень пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканинах оцінювали за утворенням у реакції тиобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними продуктами забарвленого триметинового комплексу [4]. Стан антиоксидантної системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час інкубації, а також за активністю ферментів – супероксиддисмутази (СОД) та каталази [4]. Активність α -амілази визначали за методикою Каравея за допомогою набору реактивів фірми «Філісіт-Діагностика».

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

Результати дослідження та їх обговорення

При внесенні неселективного інгібітора аргіназ L-норваліну за умов тривалої аплікації 1% розчину метилового ефіру метакрилової кислоти на слизову оболонку порожнини рота активність NOS і концентрація NO_2 у тканинах СЗ збільшуються – відповідно на 31,7% ($p < 0,001$) та 16,9% ($p < 0,05$) у порівнянні з даними другої серії (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив неселективного інгібітора аргіназ L-норваліну на показники системи NO та білоксинтезуючої функції СЗ за умов 30-денної аплікації 1% розчину метилового ефіру метакрилової кислоти на слизову оболонку порожнини рота ($M \pm m$, $n=15$)

Показники	Інтактні тварини	Аплікація 1% розчину метилового ефіру метакрилової кислоти	
		Контроль	+ L-норвалін
NOS, мкмоль NO_2 /г·хв.	4,25±0,24	9,02±0,42 *	11,88±0,28 */**
Вміст NO_2 , мкмоль/г	0,119±0,011	0,160±0,006 *	0,187±0,008 */**
ОДК, нмоль/г·хв.	264,9±14,5	200,0±12,8 *	147,4±8,0 */**
α -Амілаза, мг/ч × г	75,8±1,8	58,6±1,5 *	47,0±2,3 */**

Примітка (у табл. 1-2): * – $p < 0,05$ у порівнянні з даними інтактних щурів, ** – $p < 0,05$ у порівнянні з даними другої серії.

Активність ОДК за цих умов істотно зменшується – на 26,3% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними другої серії.

ОДК є ферментом конкурентного щодо NO-синтаз неокисного (аргіназного) шляху метаболізму L-аргініну. Показано, що пригнічення ОДК супроводжується утворенням цитотоксичної кількості NO [12]. Окрім того, через низьку активність ОДК порушується синтез поліамінів, які регулюють процеси реплікації та транскрипції ДНК, біосинтезу білків і проліферації клітин [10].

При застосуванні за умов експерименту L-

норваліну активність α -амілази знижується - на 19,8% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними другої серії.

Введення щурам L-норваліну за умов аплікації 1% розчину метилового ефіру метакрилової кислоти на слизову оболонку порожнини рота істотно не впливає на генерацію

O_2 НАДФН-залежними ЕТЛ, але підвищує його вироблення НАДФН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ – на 15,8% ($p < 0,001$) у порівнянні з даними другої серії.

Таблиця 2

Вплив неселективного інгібітора аргіназ L-норваліну на показники ПОЛ та антиоксидантного захисту за умов 30-денної аплікації 1% розчину метилового ефіру метакрилової кислоти на слизову оболонку порожнини рота ($M \pm m$, $n=15$)

Показники	Інтактні тварини	Аплікація 1% розчину метилового ефіру метакрилової кислоти	
		Контроль	+ L-норвалін
Продукція O_2 , нмоль/г·с			
НАДФН-залежними ЕТЛ	14,8±0,44	23,07±1,26 *	22,8±1,24 *
НАДФН-залежним ЕТЛ	16,13±0,39	28,8±0,68 *	33,34±0,42 */**
Концентрація ТБК-реактивів, мкмоль/кг	25,96±0,90	40,38±0,90 *	44,23±1,23 */**
Приріст концентрації ТБК-реактивів, мкмоль/кг	9,62±1,52	19,23±2,01 *	17,31±0,90 *
СОД, од. акт.	0,29±0,03	0,14±0,02 *	0,08±0,01 */**
Каталаза, мккатал/кг	2,79±0,18	1,8±0,16 *	1,56±0,16 *

Збільшення продукції O_2 НАДФН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ при дії L-норваліну може бути пов'язаним з підвищенням утворення оксиду азоту у конкурентному (NO-синтазному) шляху метаболізму L-аргініну. Відомою є здатність цитотоксичної кількості NO інактивувати НАДФН-залежні оксидоредуктази, руйнувати FeS-кластери [11].

Застосування L-норваліну за умов аплікації

1% розчину метилового ефіру метакрилової кислоти на слизову оболонку порожнини рота підвищує концентрацію ТБК-активних продуктів – на 9,5% ($p < 0,05$), що вказує на активацію ПОЛ у тканинах СЗ. Однак приріст концентрації цих сполук за час 1,5-годинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині суттєво не змінюється.

У той же час відмічається зменшення активності СОД і каталази – відповідно на

42.9% ($p < 0,05$) та 44,1% ($p < 0,001$) у порівнянні з даними другої серії.

Відомо, що NO, вироблення якого підвищується за умов введення L-норваліну, здатний взаємодіяти з йонами міді активного центру СОД та блокувати йони заліза в активному центрі каталази [11].

Таким чином, пригнічення аргіназ за умов тривалої аплікації 1% розчину метилового ефіру метакрилової кислоти на слизову оболонку порожнини рота супроводжується рецепрним підвищенням активності NOS та концентрації нітрит-йонів, порушенням білоконтинуючої функції піднижньощелепних слинних залоз, гіперпродукцією у тканинах супероксидного аніон-радикала НАДН-залежним (мітохондріальним) електронно-транспортним ланцюгом, активацією пероксидного окиснення ліпідів, пригніченням активності супероксиддисмутази та каталази.

Література

1. Дорошенко О.М. Цитотоксична дія метилового ефіру метакрилової кислоти зі зшивагентом / О.М.Дорошенко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2009. – №1. – С. 13-14.
2. Корокин М.В. Кардио- и эндотелиопротективные эффекты ингибитора аргиназы L-норвалина при моделировании L-NAME индуцированного дефицита оксида азота / М.В. Корокин, С.А. Цепелева, М.В. Покровский [и др.] // Кубан. науч. мед. вест. – 2011. – № 4. – С. 185-188.
3. Коцюруба А.В. Вікові особливості змін аргіназо-NO-синтазної системи в серці щурів в умовах адаптації до тривалих фізичних навантажень плаванням / А.В. Коцюруба, Ю.П. Коркач, С.О. Таланов [та ін.] // Фізіол. журн. – 2012. – Т.58, №1. – С. 27-35.
4. 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.
5. Нагорняк І.В. Роль NO-синтаз та їх субстрату у механізмах порушень вільнорадикальних процесів та функцій слинних залоз щурів за умов дії метилового ефіру метакрилової кислоти / І.В. Нагорняк, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2015. – Т. 15, №1. – С. 180-184.
6. Сенчакович Ю.В. Вплив метакрилату на функцію слинних залоз / Ю.В. Сенчакович, Г.А. Єрошенко, К.С. Казакова, С.М. Білаш // Світ мед. та біол. – 2014. – № 1. – С. 181-185.
7. Храмов В.А. Простой метод определения активности орнитиндекарбоксилазы в смешанной слюне человека / В.А. Храмов. // Клин. лаб. диагностика. – 1997. – №4. – С. 14-15.
8. Цебржинский О.И. Дифференцированное спектрофотометрическое определение супероксида в тканях НСТ-тестом / О.И. Цебржинский // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2002. – Т. 2, №1. – С. 96-97.

9. Hevel J.M. Purification of the inducible murene macrophage nitric oxide synthase / J.M. Hevel // J. Biol. Chem. – 1991. – V. 266, №34. – P. 22789-22791.
10. Moinard C. Polyamines: metabolism and implications in human diseases / C. Moinard, L. Cynober, J.P. de Bandt // Clin. Nutr. – 2005. – V. 24, № 2. – P. 184-197.
11. Nitric Oxide, Second Edition: Biology and Pathobiology / L.J. Ignarro ed. – [2nd ed.]. – N.Y. : Science Press, 2009. – 845 p.
12. 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.
13. Yasuda N. Distribution and properties of arginase in the salivary glands of four species of laboratory mammals / N. Yasuda, K. Moriwaki, S. Furuyama // J. Comp. Physiol. B. – 2004. – V. 174, № 3. – P. 237-242.

References

1. Doroshenko O.M. Tsytotoksychna diya metylovoho efiru metakrylovyi kysloty zi zshyvahentom / O.M.Doroshenko // Farmakolohiya ta likars'ka toksykolohiya. – 2009. – №1. – S. 13-14.
2. Korokin M.V. Kardio- i endotelioprotektivnyye efekty ingibitora arginazy L-norvalina pri modelirowanii L-NAME indutsirovannogo defitsita oksida azota / M.V. Korokin, S.A. Tsepeleva, M.V. Pokrovskiy [i dr.] // Kuban. nauch. vest. – 2011. – № 4. – S. 185-188.
3. Kotsyuruba A.B. Vikovi osoblyvosti zmin arhinazo-NO-syntaznoyi systemy v sertsii shchuriv v umovakh adaptatsiyi do tryvallykh fizychnykh navantazhen' plavanniam / A.B. Kotsyuruba, Yu.P. Korkach, S.O. Talanov [ta in.] // Fiziol. zhurn. – 2012. – T.58, №1. – S. 27-35.
4. Metody klinichnykh ta eksperymental'nykh doslidzhen' v medytsyni / [L.V. Berkalo, O.V. Bobovych, N.O. Bobrova ta in.] ; za red. I.P.Kaydashewa. – Poltava, 2003. – 320 s.
5. Nahornyak I.V. Rol' NO-syntaz ta yikh substratu u mekhanizmkah porushen' vil'noradykal'nykh protsesiv ta funktsiy slynnykh zaloz shchuriv za umov diyi metylovoho efiru metakrylovyi kysloty / I.V. Nahornyak, V.O. Kostenko // Aktual'ni problemy suchasnoyi medytsyny: Visn. Ukrainys'koyi med. stomatol. akademiyi. – 2015. – T. 15, №1. – С. 180-184.
6. Senchakovych Yu.V. Vplyv metakrylatu na funktsiyu slynnykh zaloz / Yu.V. Senchakovych, H.A. Yeroshenko, K.S. Kazakova, S.M. Bilash // Svit med. ta biol. – 2014. – № 1. – S. 181-185.
7. Khramov V.A. Prostoy metod opredelenyya aktyvnosti ornityndekarboksylyazy v smeshannoy slyune cheloveka / V.A. Khramov. // Klyn. lab. dyahnostyka. – 1997. – №4. – S. 14-15.
8. Tsebrzhinskiy O.I. Differentsirovannoye spektrofotometricheskoye opredeleniye produktsii superoksida v tkanyakh NST-testom / O.I. Tsebrzhinskiy // Aktual'ni problemy suchasnoyi medytsyny: Visn. Ukrainys'koyi med. stomatol. akademiyi. – 2002. – T. 2, №1. – С. 96-97.
9. Hevel J.M. Purification of the inducible murene macrophage nitric oxide synthase / J.M. Hevel // J. Biol. Chem. – 1991. – V. 266, №34. – P. 22789-22791.
10. Moinard C. Polyamines: metabolism and implications in human diseases / C. Moinard, L. Cynober, J.P. de Bandt // Clin. Nutr. – 2005. – V. 24, № 2. – P. 184-197.
11. Nitric Oxide, Second Edition: Biology and Pathobiology / L.J. Ignarro ed. – [2nd ed.]. – N.Y. : Science Press, 2009. – 845 p.
12. 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.
13. Yasuda N. Distribution and properties of arginase in the salivary glands of four species of laboratory mammals / N. Yasuda, K. Moriwaki, S. Furuyama // J. Comp. Physiol. B. – 2004. – V. 174, № 3. – P. 237-242.

Реферат

РОЛЬ АРГИНАЗЫ В МЕХАНИЗМЕ НАРУШЕНИЙ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И ФУНКЦИИ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИЯ МЕТИЛОВОГО ЭФИРА МЕТАКРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Нагорняк И.В., Костенко В.А.

Ключевые слова: метиловый эфир метакрилоевой кислоты, аргиназа, L-норвалин, NO-синтаза, супероксидный анион-радикал, перекисное окисление липидов, слюнные железы.

В эксперименте на 30 белых крысах исследовано влияние неселективного ингибитора аргиназы L-норвалина на состояние свободнорадикальных процессов и белоксинтезирующей функции поднижнечелюстных слюнных желез при 30-дневной аплікації 1% раствора метилового эфіра метакрилової кислоти на слизистую оболочку полости рта. Показано, что введение L-норвалина (через день в течение эксперимента, в дозе 10 мг/кг) сопровождается рецепрным повышением суммарной активности NO-синтазы и концентрации нітрит-ионов, нарушением белоксинтетической функции поднижнечелюстных слюнных желез, гиперпродукцией в тканях супероксидного анион-радикала НАДН-зависимой (мітохондріальної) електронно-транспортной цепью, активацией пероксидного окисления липидов, угнетением активности супероксиддисмутази и каталазы, что указывает на протективную роль

аргиназы в механизме метакрилат-зависимой дисфункции слюнных желез.

Summary

ROLE OF ARGINASE IN THE MECHANISMS OF IMPAIRMENT OF FREE RADICAL PROCESSES AND SALIVARY GLAND FUNCTIONING IN RATS UNDER METHACRYLIC ACID METHYL ESTER APPLICATION

Nagornjak I.V., Kostenko V.A.

Key words: methacrylic acid methyl ester, arginase, L-norvaline, NO-synthase, superoxide anion radical, lipid peroxidation, salivary gland.

This research was aimed to study the effect of nonselective arginase inhibitor L-norvaline on the state of free radical processes and protein-synthesizing function of submandibular salivary glands in 30 white rats for 30-day applications of 1% solution of methacrylic acid methyl ester onto the oral mucosa. It has been found out the L-norvaline administration (every other day during the experiment, in a dose of 10 mg/kg) is accompanied by reciprocal increase in total activity of NO-synthase and nitrite ions concentration, by the impairment of protein synthesizing function in submandibular salivary glands, by overproduction of superoxide anion radical in the tissues by NADH-dependent (mitochondrial) electron transport chain, by the activation of lipid peroxidation, inhibition of superoxide dismutase and catalase that indicates the protective role of arginase in the mechanism of methacrylate-dependent dysfunction of salivary glands.

Higher State Educational Institution of Ukraine

"Ukrainian Medical Stomatological Academy", Ukraine, Poltava

УДК 612.017.1:616.831-005

**Николаенко Т.В., Гарманчук Л.В., Макаренко А.Н., Сараева И.В.,
Петрук Н.А., Джус Е.И., Никулина В.В., Ступак Ю.А.**

КОРРЕКЦИЯ УРОВНЯ БИЛИРУБИНА И ГЛЮКОЗЫ АНТИИНСУЛЬТНЫМИ СРЕДСТВАМИ КАК МЕХАНИЗМ НОРМАЛИЗАЦИИ СОСУДИСТОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ГЕМОРАГИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

Учебно-научный центр "Институт биологии" Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, г. Киев

Выявлено позитивное коррегирующее влияние антиинсульных препаратов кортексина ("Герофарм", Россия), церебролизина ("Еbewe", Австрия), церебрала (новое средство — трофинотропин, Россия) на уровень биохимических показателей в сыворотке крови крыс с индуцированным геморагическим инсультом. Было зафиксировано двукратное снижение общего билирубина у животных с индуцированным ГИ относительно группы интактных животных, в то время как препараты нормализуют этот показатель (наиболее эффективным был кортексин). Также показано, что кортексин и церебролизин увеличивали уровень глюкозы в сыворотке крови в 2 раза, тогда как церебрал лишь в 1,2 раза в сравнении с группой без терапии.

Ключевые слова: билирубин, глюкоза, сосудистая дисфункция, геморагический инсульт.

Острый геморагический инсульт является второй основной причиной смертности населения экономически развитых стран и варьирует в пределах от 38% до 80% [1]. На ранних этапах развития геморагического инсульта в кровь выделяется большое количество билирубина, который является маркером окислительного стресса [2]. Повышение билирубина провоцирует выделение окислителей, вызывающих образование значительного количества продуктов окисления билирубина [3]. Поэтому билирубин в настоящее время признан в качестве важного антиоксиданта, эндогенного защитного фактора, обладающего противовоспалительным и нейротекторным свойствами [4, 5]. При экспериментальном атеросклерозе билирубин тормозит развитие заболевания, предотвращая образо-

вание артериальных тромбозов, а также тормозит развитие атеросклеротических бляшек в стенках сонных артерий [6, 7]. Кроме того, на животных моделях показано, что сверхэкспрессия гемоксигеназы-1 (НО-1) ингибирует образование атеросклеротических бляшек, а также исследовано влияние НО-1 на продукцию провоспалительных цитокинов, экспрессию эндотелиальной синтазы (eNOS) и эндотелий-зависимой релаксации сосудов. Эти результаты позволяют предположить, что антиатерогенные свойства НО-1 могут быть опосредованы преимущественно через действие билирубина путем ингибирования активации эндотелия сосудов и дисфункции в ответ на провоспалительный стресс [8].

Кроме того, одним из важных факторов риска