

**Реферат**

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУР ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ВИЧ-АССОЦИИРОВАННОЙ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Аношина Т.М.

Ключевые слова: ВИЧ, герпесвирусная инфекция, плацента, CD 31, фактор Виллебранда

Инфекционная патология плаценты является составляющей общего инфекционного процесса, который возникает при беременности у инфицированной женщины. Как ВИЧ, так герпесвирусная инфекция (ГВИ) сопровождаются высокой частотой плацентарной дисфункции. Исследовано 10 плацент от женщин с ВИЧ и ГВИ (1 группа) и 10 - от женщин с физиологическим течением беременности (2 группа - контроль). Методы исследования: органомерический, макроскопический, общегистологический, иммуногистохимический - косвенный стрептавидин-пероксидазный метод выявления уровня экспрессии CD 31 и фактора Виллебранда. Анализ данных проводили с помощью лицензионного пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics и Portable Statistica 8.0. В большинстве плацент от женщин с ВИЧ и ГВИ отмечаются проявления субкомпенсированной плацентарной дисфункции с выраженными в разной степени неспецифическими инволютивно-дистрофическими изменениями и острыми циркуляторными расстройствами. Выявленные изменения в синцитиотрофобласте, клетках стромы и децидуальных клетках, васкулопатии с образованием тромбов указывает на повреждение эндотелия сосудов, подтверждено установленной иммуногистохимически положительной экспрессией CD31 и фактора Виллебранда.

**Summary**

MORPHOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF PLACENTA STRUCTURE IN HIV-ASSOCIATED HERPES VIRAL INFECTION

Anoshina T.M.

Key words: HIV, herpes virus infection, placenta, CD 31, von Willebrand factor

Infectious pathology of the placenta is a component of the common infection that occurs during pregnancy in infected women. Like HIV, herpes virus infection (HVI) often results in placental dysfunction. This study involved 10 placentas of HIV- and HVI-infected women (group I) and 10 placentas taken from women with physiological pregnancy (group II - control). The methods included organometry, macroscopy, histological techniques, immunohistochemistry (indirect streptavidin-peroxidase method of detecting the level of CD 31 and vWF). Data processing was performed by the license package IBM SPSS Statistics and the Portable Statistica 8.0 applications. Most placentas taken from HIV- and GVI-positive women show f subcompensated placental dysfunction expressed in varying degrees of involution-nonspecific degenerative changes and acute circulatory disorders. The changes observed in syncytiotrophoblast, stromal cells and decidual cells, vasculopathy with the formation of blood clots indicates the damage to the vascular endothelium, confirmed by immunohistochemally positive expression of vWF and SD31.

УДК 616.314.17-092.9:615.916'16/.175

**Богданов О.В., Костенко В.О.**

**ВПЛИВ ІНГІБІТОРІВ ТА СУБСТРАТУ NO-СИНТАЗ  
НА ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНІ ПРОЦЕСИ В ТКАНИНАХ ПАРОДОНТА ЩУРІВ  
ЗА УМОВ ПОЄДНАНОГО НАДЛИШКОВОГО НАДХОДЖЕННЯ НІТРАТУ  
ТА ФТОРИДУ НАТРІЮ**

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

У експерименті на 50 білих щурах досліджено роль різних ізоформ NO-синтази (NOS) на генерацію активних форм оксигену та нітрогену, пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) та антиоксидантний захист у м'яких тканинах пародонта за умов поєднаного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію. Виявлено, що індукбельна NOS за умов експерименту сприяє продукції у м'яких тканинах пародонта супероксидного аніон-радикала НАДФН-залежними (мікросомальним і NOS) та НАДФН-залежним (мітохондріальним) електронно-транспортними ланцюгами (ЕТЛ), а також НАДФН-оксидазою лейкоцитів, викликає декомпенсоване ПОЛ та зниження антиоксидантного потенціалу. Введення L-аргініну знижує у м'яких тканинах пародонта вироблення супероксидного аніон-радикала мітохондріальним ЕТЛ та НАДФН-оксидазою лейкоцитів, обмежує ПОЛ, підвищує активність каталази, але істотно не впливає на генерацію цього радикала НАДФН-залежними ЕТЛ.

Ключові слова: нітрати, фториди, NO-синтаза, супероксидний аніон-радикал, пероксидне окиснення ліпідів, антиоксидантна система, оксид азоту, пародонт.

На території України, зокрема в Полтавській області, залишається актуальною проблема комбінованого впливу на здоров'я населення та-

ких екологічно небезпечних чинників хімічної природи як неорганічні нітросполуки та фториди [9, 10].

Надходження в організм нітратів і нітритів супроводжується утворенням надмірної кількості оксиду азоту (NO) та порушенням авторегуляції рівня останнього за механізмом негативного зворотного зв'язку («цикл NO») [5,7]. Цьому може сприяти підвищення у тканинах фторид-йонів, здатних пригнічувати конкурентний щодо NO-синтазного аргіназний шлях метаболізму L-аргініну [2, 15], збільшувати активність індукцибельної NO-синтази (iNOS) [8,11].

Нами показано, що поєднана дія нітрату та фториду натрію протягом 30 діб істотно впливає на окисний метаболізм у тканинах пародонта щурів, потенціює в них продукцію супероксидного аніон-радикала НАДФН- і НАДН-залежними електронно-транспортними ланцюгами (ЕТЛ), а також НАДФН-оксидазою лейкоцитів, збільшує утворення високотоксичного пероксинітриту, знижує активність каталази [1].

Проте роль різних ізоформ NO-синтази (NOS) у дизрегуляції окисного обміну в тканинах пародонта за умов поєднаної дії надмірних концентрацій нітратів і фторидів залишається нез'ясованою.

#### **Мета роботи**

Вивчення ролі різних ізоформ NOS на генерацію активних форм кисню та нітрогену, пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) та антиоксидантний захист у м'яких тканинах пародонта щурів за умов поєднаного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію.

#### **Матеріали та методи**

Дослідження були проведені на 50 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 вводили відповідно селективний інгібітор нейрональної NO-синтази (nNOS) – 7-нітроіндазол ("Sigma-Aldrich, Inc.", США) у дозі 30 мг/кг [13], селективний інгібітор iNOS – аміногуанідин ("Sigma-Aldrich, Inc.", США) - 20 мг/кг [14], субстрат NOS і аргінази – L-аргінін ("Kyowa Hakko Kogyo Co LTD", Японія) - 500 мг/кг [3]. Усі сполуки вводили внутрішньоочеревинно 2 рази на тиждень протягом періоду відтворення 30-денної поєднаної інтоксикації нітратом і фторидом натрію. Евтаназію тварин виконували методом дислокації шийних хребців під ефірним наркозом.

Продукцію супероксидного аніон-радикала (CAP) у гомогенаті м'яких тканин пародонта досліджували спектрофотометрично при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм з індукторами у вигляді НАДН, НАДФН та бактеріальних ліпополісахаридів (пірогенал): оцінювали гене-

рацію CAP відповідно НАДФН-залежними (мікросомальним і NO-синтазним) електронно-транспортними ланцюгами (ЕТЛ), НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ і НАДФН-оксидазою лейкоцитів [6].

Рівень ПОЛ у тканинах оцінювали по утворенню в реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними сполуками забарвленого триметінового комплексу до і після 1,5-годинної інкубації [4]. Активність антиоксидантної системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час 1,5-годинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю каталази [4].

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".

#### **Результати дослідження та їх обговорення**

Введення селективного інгібітора nNOS 7-нітроіндазолу за умов відтворення поєднаної 30-денної інтоксикації нітратом і фторидом натрію суттєво не позначається на продукції у м'яких тканинах пародонта супероксидного аніон-радикала НАДФН-залежними ЕТЛ (мікросомальним і NOS), НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ і НАДФН-оксидазою лейкоцитів (див. табл.).

Внесення селективного інгібітора iNOS аміногуанідину за умов експерименту зменшує у м'яких тканинах пародонта вироблення супероксидного аніон-радикала НАДФН-залежними ЕТЛ (мікросомальним і NOS) – до  $26,99 \pm 1,46$  нмоль/г·с (на 29,4%,  $p < 0,001$ ), НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ – до  $25,37 \pm 0,98$  нмоль/г·с (на 34,9%,  $p < 0,001$ ), НАДФН-оксидазою лейкоцитів – до  $1,35 \pm 0,11$  нмоль/г·с (на 31,8%,  $p < 0,01$ ) у порівнянні з даними другої серії.

Це свідчить про те, що надлишкова активація продукції супероксидного аніон-радикала наведеними ЕТЛ при поєднаній дії нітрату та фториду, у певній мірі, пов'язана з утворенням у м'яких тканинах пародонта додаткової кількості NO внаслідок активації iNOS. Це також вказує на дизрегуляцію реакцій циклу оксиду азоту, що створює передумови для підвищення у тканинах концентрації цієї сполуки та реалізації її негативних ефектів.

Таблиця

Вплив інгібіторів та субстрату NOS на показники вільнорадикального окиснення та антиоксидантного захисту у тканинах пародонта за умов надлишкового надходження нітрату та фториду натрію (M±m, n=50)

| Показники                                | Серії дослідів   |   |                   |                  |                 |
|--|------------------|---|-------------------|------------------|-----------------|
|  | Інтактні тварини | Поєднане введення нітрату та фториду натрію |                   |                  |                 |
|  |                  | Контроль                                    | + 7-нітроін-дазол | + аміно-гуанідин | + L-аргінін     |
| Продукція САР, нмоль/г·с                 |                  |   |                   |                  |                 |
| НАДФН-залежний ЕТЛ (мікосомальний і NOS) | 20.11±1.02       | 38.22±1.21 *                                | 39.15±1.4 *       | 26.99±1.46 */**  | 35.82±1.44 *    |
| НАДН-залежний ЕТЛ (мітохондріальний)     | 22.52±1.01       | 38.99±1.01 *                                | 36.9±1.14 *       | 25.37±0.98 **    | 32.07±0.94 ***  |
| НАДФН-оксидаза лейкоцитів                | 1.08±0.16        | 1.98±0.07 *                                 | 1.76±0.15 *       | 1.35±0.11 **     | 1.42±0.22 **    |
| Концентрація ТБК-реактивних до інкубації | 18.89±3.49       | 45.87±2.10 *                                | 42.4±2.6 *        | 24.66±4.06 **    | 29.62±4.20 **   |
| після інкубації                          | 36.35±2.75       | 76.15±1.06 *                                | 72.88±4.52 *      | 39.66±2.70 **    | 59.90±3.77*/ ** |
| приріст                                  | 17.45±1.74       | 30.29±2.74 *                                | 30.48±6.03        | 15.00±2.64 **    | 30.29±7.16      |
| Каталаза, мкат/г                         | 0.28±0.02        | 0.15±0.02 *                                 | 0.26±0.03 **      | 0.27±0.03 **     | 0.26±0.04 **    |

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

Застосування L-аргінину за умов відтворення поєднаної 30-денної інтоксикації нітратом і фторидом натрію знижує у м'яких тканинах пародонта вироблення супероксидного аніон-радикала мітохондріальним ЕТЛ – до 32,07±0,94 нмоль/г·с (на 17,7%, p<0,01) та НАДФН-оксидазою лейкоцитів – до 1,42±0,22 нмоль/г·с (на 28,3%, p<0,05), але істотно не впливає на генерацію цього радикала НАДФН-залежними ЕТЛ (мікосомальним і NOS) у порівнянні з даними другої серії.

Введення селективного інгібітора nNOS 7-нітроіндазолу за умов експерименту суттєво не змінює концентрацію ТБК-активних сполук та їхній приріст за час 1,5-годинної інкубації гомогенату м'яких тканин пародонта у залізоаскорбатному буферному розчині у порівнянні з даними другої серії.

Введення селективного інгібітора iNOS аміногуанідину за умов відтворення бінарної інтоксикації зменшує у м'яких тканинах пародонта концентрацію ТБК-активних сполук до та після 1,5-годинної інкубації гомогенату м'яких тканин пародонта у залізоаскорбатному буферному розчині - відповідно до 24,66±4,06 мкмоль/кг (на 46,2%, p<0,01) та 39,66±2,70 мкмоль/кг (на 47,9%, p<0,001) у порівнянні з даними другої серії. Приріст концентрації ТБК-активних речовин за час інкубації також зменшується - до 15,00±2,64 мкмоль/кг (на 50,5%, p<0,01) у порівнянні з даними другої серії. Це вказує на здатність iNOS за умов бінарної інтоксикації нітратом та фторидом натрію сприяти активації ПОЛ та зниженню антиоксидантного потенціалу в м'яких тканинах пародонта з умов поєднаної дії нітрату та фториду.

Застосування L-аргінину за умов відтворення поєднаної 30-денної інтоксикації нітратом і фторидом натрію знижує у м'яких тканинах пародонта концентрацію ТБК-активних сполук до та після 1,5-годинної інкубації гомогенату м'яких тканин пародонта у залізоаскорбатному буферному розчині - відповідно до 29,62±4,20 мкмоль/кг (на 35,4%, p<0,01) та 59,90±3,77 мкмоль/кг (на 21,3%, p<0,01) у порівнянні з даними другої серії. Проте приріст концентрації ТБК-активних речовин за час інкубації за цих умов істотно не

змінюється у порівнянні з даними другої серії.

Примітно, що введення 7-нітроіндазолу та аміногуанідину за умов експерименту супроводжується збільшенням активності каталази у м'яких тканинах пародонта – відповідно до 0,26±0,03 мкат/г та 0,27±0,03 мкат/г, тобто на 73,3% (p<0,02) та 80,0% (p<0,02) у порівнянні з даними другої серії.

Такі зміни вказують, що функціонування як iNOS, так і nNOS, може супроводжуватися зменшенням активності каталази. Відомою є здатність оксиду азоту взаємодіяти із залізом активного центру ферменту з утворенням менш активної ферікаталази-NO [12].

Застосування L-аргінину за умов відтворення поєднаної 30-денної інтоксикації нітратом і фторидом натрію підвищує активність каталази у м'яких тканинах пародонта – до 0,26±0,04 мкат/г (на 73,3%, p<0,05) у порівнянні з даними другої серії.

### Висновки

1. Функціональна активність nNOS за умов бінарної інтоксикації нітратом та фторидом натрію суттєво не впливає на генерацію у м'яких тканинах пародонта супероксидного аніон-радикала, процес пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантний потенціал у м'яких тканинах пародонта.

2. Функціональна активність iNOS за умов бінарної інтоксикації нітратом та фторидом натрію сприяє продукції у м'яких тканинах пародонта супероксидного аніон-радикала НАДФН-залежними ЕТЛ (мікосомальним і NOS), НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ і НАДФН-оксидазою лейкоцитів, викликає декомпенсоване пероксидне окиснення ліпідів та зниження антиоксидантного потенціалу в м'яких тканинах пародонта.

3. Введення L-аргінину за умов відтворення поєднаної 30-денної інтоксикації нітратом і фторидом натрію знижує у м'яких тканинах пародонта вироблення супероксидного аніон-радикала мітохондріальним ЕТЛ та НАДФН-оксидазою лейкоцитів, обмежує пероксидне окиснення ліпідів, підвищує активність каталази, але істотно не впливає на генерацію цього радикала НАДФН-

залежними ЕТЛ (мікосомальним і NOS).

4. Функціональна активність nNOS та iNOS за умов відтворення поєднаної 30-денної інтоксикації нітратом і фторидом натрію супроводжується зменшенням активності каталази у м'яких тканинах пародонта.

### Література

1. Богданов О.В. Вільнорадикальні процеси в тканинах пародонта щурів за умов поєднаного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію / О.В. Богданов О.В., В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2016. – Т. 16, № 2. – С. 210-213.
2. Геворкян М.Л. Стрoение активного центра печеночной аргиназы млекопитающих. II. Субстраты и ингибиторы / М.Л. Геворкян, М.А. Давтян // Биолог. журн. Армении. - 2008. - №4. - С. 16-26.
3. 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.
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. Костенко В.О. Механізми ауторегуляції утворення оксиду азоту в організмі ссавців та їх порушення при розвитку патологічних процесів / В.О. Костенко, Н.В. Соловійова, О.В. Коваленко [та ін.] // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2011. – Т. 11, № 3. – С. 150-154.
6. 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.
7. Реутов В.П. Цикл оксида азота как механизм стабилизации содержания NO и продуктов его превращения в организме млекопитающих / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, А.И. Гоженко [и др.] // Актуал. пробл. трансп. мед. – 2008. – № 1 (11). – С. 22-28.
8. 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.
9. Тригуб В.І. Закономірності поширення фтору у навколишньому середовищі / В.І. Тригуб // Геополітика і екогеодинаміка регіонів. – 2014. – Т. 10, №1. – С. 231-238.
10. 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.
11. Barbier O. Molecular mechanisms of fluoride toxicity / O. Barbier, L. Argeola-Mendoza, L.M. Del Razo // Chem. Biol. Interact. – 2010. – V. 188. – P. 319-333.
12. Kim Y.S. Superoxide reactivates nitric oxide-inhibited catalase / Y.S. Kim, S. Han // Biol. Chem. – 2000. – V. 381, № 12. – P.1269-1271.
13. 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.
14. 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.
15. Tormanen C.D. Substrate inhibition of rat liver and kidney arginase with fluoride / C.D. Tormanen // J. Inorg. Biochem. – 2003. – V. 93, №3-4. – P. 243-246.

### Реферат

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ И СУБСТРАТА NO-СИНТАЗЫ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ТКАНЯХ ПАРОДОНТА КРЫС В УСЛОВИЯХ СОЧЕТАННОГО ИЗБЫТОЧНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ НИТРАТА И ФТОРИДА НАТРИЯ

Богданов А.В., Костенко В.А.

Ключевые слова: нитраты, фториды, NO-синтаза, супероксидный анион-радикал, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, оксид азота, пародонт.

В эксперименте на 50 белых крысах исследована роль различных изоформ NO-синтазы (NOS) на генерацию активных форм кислорода и азота, перекисное окисление липидов (ПОЛ) и антиоксидантную защиту в мягких тканях пародонта в условиях сочетанного избыточного поступления нитрата и фторида натрия. Выявлено, что индуцибельная NOS в условиях эксперимента способствует продукции в мягких тканях пародонта супероксидного анион-радикала НАДФН-зависимыми (микросомальной и NOS) и НАДФН-зависимой (митохондриальной) электронно-транспортными цепями (ЭТЦ), а также НАДФН-оксидазой лейкоцитов, вызывает декомпенсированное ПОЛ и снижение антиоксидантного потенциала. Введение L-аргинина снижает в мягких тканях пародонта выработку супероксидного анион-радикала митохондриальной ЭТЦ и НАДФН-оксидазой лейкоцитов, ограничивает ПОЛ, повышает активность каталазы, но существенно не влияет на генерацию этого радикала НАДФН-зависимыми ЭТЦ.

### Summary

EFFECT OF NO-SYNTASE INHIBITORS AND SUBSTRATE ON FREE RADICAL PROCESSES IN RATS' PERIODONTAL TISSUES UNDER SODIUM NITRATE AND FLUORIDE COMBINED EXCESSIVE INTAKE

Bogdanov A.V., Kostenko V.A.

Key words: nitrates, fluorides, NO-synthase, superoxide anion radical, lipid peroxidation, antioxidant system, nitric oxide, periodontal.

This research aimed to study the role of different isoforms of NO-synthase (NOS) in producing reactive oxygen and nitrogen forms, lipid peroxidation (LPO) and antioxidant protection in the periodontal soft tissues under sodium nitrate and fluoride combined excessive intake involved 50 white rats. We have found out inducible NOS under experimental conditions promotes the products of superoxide anion radical by NADPH-dependent (microsomal and NOS) and NADH-dependent (mitochondrial) electron transport chains (ETC) as well as by leukocytes NADPH oxidase in the soft tissues of parodontium, and results in decompensated LPO and reduced antioxidant capacity. The administration of L-arginine decreases production of superoxide anion radical by mitochondrial ETC and NADPH oxidase of leukocytes in soft tissues of parodontium, limits LPO, increases the activity of catalase, but does not significantly affect the production of this radical by NADPH-dependent ETC.