

УДК 616.314.18-002.4-031.81-036.12-036

**В.В. Щерба, М.М. Корда**

*Тернопільський державний медичний університет  
ім. І.Я. Горбачевського*

## **МОДУЛЮВАННЯ NO-СИНТАЗ ПРИ ПАРОДОНТИТІ НА ФОНІ СУПУТНЬОГО ХРОНІЧНОГО ГЕПАТИТУ**

Досліджували вплив неселективного інгібітора NOS N-нітро-L-аргініну і селективного інгібітора iNOS 1400W на інтенсивність оксидативного й нітрооксидативного стресу при пародонтиті на фоні супутнього гепатиту. Дослідження проведено на білих щурах, у яких пародонтит викликали шляхом введення в тканини пародонта бактеріального ліпополісахариду. Гепатит викликали введенням тваринам алілового спирту протягом двох тижнів. Ліпополісахаридне запалення пародонта на фоні гепатиту супроводжувалося вираженим оксидативним і нітрооксидативним стресом (в тканинах пародонта і в крові зростав вміст ТБК-активних продуктів і окиснено-модифікованих білків, знижувалася активність супероксиддисмутази, зменшувався вміст церулоплазміну і відновленого глутатіону, мала виражену тенденцію до зниження загальна антиоксидна активність крові, зростали активність NO-синтази і вміст  $\text{NO}_x$ ). Корекція пародонтиту на тлі гепатиту обома модуляторами призводила до різкого пригнічення синтезу оксиду азоту. У разі застосування N-нітро-L-аргініну функціональна активність загальної NO-синтази в пародонті і вміст  $\text{NO}_x$  у сироватці зменшувалися навіть нижче контрольних значень. N-нітро-L-аргінін не впливав на показники інтенсивності оксидативного стресу або навіть погіршував їх. Застосування 1400W ефективно запобігало гіперактивності окислювальних процесів у пародонті і сироватці тварин з пародонтитом на фоні гепатиту і поліпшувало функціональний стан системи антиоксидного захисту. Зроблено висновок, що селективне інгібування індукцибельної форми NO-синтази при запаленні пародонта, що розвивається на фоні гепатиту, може бути перспективним методом лікування хворих з такою поєднаною патологією.

**Ключові слова:** пародонтит, хронічний гепатит, оксидативний і нітрооксидативний стрес.

За даними епідеміологічних досліджень, в різних країнах світу від 50 до 90 % населення страждає від пародонтиту різного ступеня тяжкості [1]. Серед етіологічних факторів запальних процесів у пародонті основним вважається ліпополісахарид грамнегативних анаеробних мікроорганізмів. Доказані взаємозв'язки між захворюваннями пародонта і хворобами печінки [2, 3]. Хронічні гепатити за своїм соціальним і медичним значенням займають одне з провідних місць у загальній структурі захворюваності і характеризуються важкістю лікування і серйозним прогнозом.

В роботі [4] нами було продемонстровано, що в патогенезі ліпополісахаридного пародонтиту, поєданого з хронічним гепатитом, важливу роль відіграють оксидативний стрес і гіперпродукція оксиду азоту. Очевидно, що, з одного боку, сам ліпополісахарид і медіатори запалення, що утворюються під його впливом в тканинах пародонта, а з іншого – прозапальні фактори, які в надмірній кількості продукуються в печінці при її ураженні, виражено активують індукцибельну форму NO-синтази (iNOS), у результаті чого утворюється надмірна кількість оксиду азоту. З цієї точки зору

© В.В. Щерба, М.М. Корда, 2013

доцільним вважається використання при пародонтиті на фоні гепатиту інгібіторів NO-синтази з метою пригнічення швидкості утворення NO і запобігання його негативних ефектів.

Метою даної роботи було дослідити вплив неселективного інгібітора NO-синтаз N-нітро-L-аргініну та селективного інгібітора iNOS 1400W на інтенсивність оксидативного й нітрооксидативного стресу при пародонтиті на фоні супутнього гепатиту.

**Матеріал і методи.** Досліди виконані на 40 безпородних щурах-самцях масою 150–180 г, яких утримували на стандартній дієті. Всіх тварин розподілили на чотири групи: 1-ша – контроль (інтактні щури); 2-га – щури з пародонтитом на фоні хронічного гепатиту, який викликали шляхом внутрішньочеревного введення алілового спирту у дозі 10 мг/кг протягом двох тижнів через день, починаючи з 15-ї доби експерименту щурам вводили в тканини ясен ліпополісахарид *E. Coli* протягом двох тижнів через день по 40 мкл (1 мг/мл); 3-тя – щури з пародонтитом на фоні гепатиту, яким починаючи з 15-ї доби експерименту паралельно з ліпополісахаридом щоденно протягом 14 діб вводили внутрішньочеревно неселективний інгібітор NO-синтази N-нітро-L-аргінін (L-NNA) (Sigma-Aldrich, США) у дозі 50 мг/кг; 4-та – щури з пародонтитом на фоні гепатиту, яким починаючи з 15-ї доби експерименту паралельно з ліпополісахаридом щоденно протягом 14 діб вводили внутрішньочеревно високоселективний інгібітор індукційної NO-синтази N-(3-(Амінометил)бензил) ацетамідин (1400W) у дозі 1,5 мг/кг (Sigma-Aldrich, США). Для підтвердження гепатиту на 15-й день експерименту в сироватці крові щурів 2-ї групи визначали активність АлАТ і АсАТ за загальноприйнятою методикою, використовуючи комерційний комплект реактивів. Тварин виводили з експерименту декапітацією під ефірним наркозом. В тканинах пародонта визначали сумарну активність NO-синтази [5]. В гомогенаті тканин пародонта і сироватці визначали рівень нітратів і нітритів ( $\text{NO}_x$ ) [6], ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) [7], окиснено-модифікованих білків (ОМБ) [8], активність супероксиддисмутази (СОД) [9], каталази (КТ) [10] та вміст відновленого глутатіону (ГSH) [11]. В плазмі крові також

визначали вміст церулоплазміну (ЦП) [12] і загальну антиоксидну активність (ЗАА) [13].

Статистичний аналіз виконували з використанням стандартних статистичних програм і критерію t Стьюдента. Зміни  $p < 0,05$  розглядалися як статистично достовірні.

**Результати та їх обговорення.** Оскільки N-нітро-L-аргінін і 1400W є інгібіторами синтази оксиду азоту, а функціонування як ендотеліальної, так і, особливо, індукційної форм NO-синтаз безпосередньо визначає перебіг запальних реакцій, було важливо вивчити, як дані препарати впливають на стан системи оксиду азоту при пародонтиті на фоні гепатиту. З даних, наведених у таблиці, видно, що загальна активність NO-синтази різко (в 4,3 раза) знижувалася порівняно з такою некоригованих тварин при введенні N-нітро-L-аргініну. В цьому випадку активність ферменту була зниженою достовірно (в 1,3 раза) навіть порівняно з контролем. При застосуванні 1400W активність NO-синтази знижувалася хоча і не так виражено, як у попередньому випадку (в 2,7 раза), проте достовірно порівняно з нелікованими тваринами. Варто відмітити, що при використанні 1400W активність NO-синтази в сироватці крові уражених тварин практично не відрізнялася від такої в контролі.

Подібно до змін активності NO-синтази змінювався вміст нітратів і нітритів у сироватці і пародонті уражених щурів, яким проводили корекцію (таблиця). При застосуванні N-нітро-L-аргініну вміст  $\text{NO}_x$  в сироватці був нижчим, ніж у некоригованих тварин в 3,1 раза. При введенні щурам специфічного інгібітора NO-синтази рівень  $\text{NO}_x$  знизився в 2,2 раза і достовірно не відрізнявся від норми. В тканинах пародонта тварин, яким вводили N-нітро-L-аргінін, як і в сироватці, вміст  $\text{NO}_x$  також суттєво (в 2,9 раза) знижувався. Під впливом 1400W даний показник в пародонті знижувався в 2,6 раза. В обох випадках вміст  $\text{NO}_x$  в пародонті достовірно не відрізнявся від контрольного рівня.

Отже, корекція пародонтиту на фоні гепатиту неспецифічним інгібітором NO-синтази N-нітро-L-аргініном і специфічним інгібітором iNOS 1400W призводить до різкого пригнічення синтезу оксиду азоту, причому у випадку застосування N-нітро-L-аргініну функціональна активність загальної NO-син-

Вплив N-нітро-L-аргініну і 1400W на показники інтенсивності оксидативного і нітрооксидативного стресу в сироватці крові і тканині пародонта щурів з ліпополісахаридним пародонтитом на фоні гепатиту

Показник	Групи тварин			
	контроль	ЛПС+АС	ЛПС+АС+L-NNA	ЛПС+АС+1400W
<i>Сироватка крові</i>				
NO <sub>x</sub> , ммоль/л	2,75±0,15	6,30±0,46*	2,05±0,11*#	2,84±0,18#
ТБК-АП, мкмоль/л	42,60±3,04	98,30±5,45*	105,4±7,05*	68,32±4,50*#
ОМБ <sub>310</sub> , мкмоль/мг білка	0,94±0,07	2,60±0,22*	2,75±0,20*	1,50±0,08*#
ОМБ <sub>430</sub> , мкмоль/мг білка	0,50±0,02	1,68±0,14*	1,78±0,13*	0,95±0,04*#
КТ, мкат/л	0,44±0,03	0,65±0,06*	0,78±0,05*	0,56±0,04
ЦП, г/л	0,26±0,01	0,38±0,03*	0,42±0,03*	0,29±0,01#
ГSH, ммоль/л	3,20±0,18	0,70±0,07*	0,65±0,04*	1,95±0,16*#
ЗАА, % інгібування утворення ТБК-АП	58,30±4,10	25,30±2,50*	26,40±2,30*	38,45±2,50*#
<i>Тканини пародонта</i>				
NO-синтаза, нмоль/мг білка·хв	0,35±0,02	1,18±0,10*	0,27±0,01*#	0,43±0,03#
NO <sub>x</sub> , ммоль/кг	0,96±0,05	2,54±0,20*	0,85±0,06#	0,98±0,08#
ТБК-АП, мкмоль/кг	2,75±0,20	4,85±0,22*	6,90±0,32*#	3,80±0,12*#
ОМБ <sub>310</sub> , мкмоль/мг білка	3,62±0,25	9,86±0,65*	11,06±0,70*	6,26±0,45*#
ОМБ <sub>430</sub> , мкмоль/мг білка	2,65±0,22	7,44±0,52*	8,94±0,65*	4,05±0,25*#
СОД, од.	0,26±0,02	0,09±0,01*	0,08±0,009*	0,17±0,01*#
КТ, мкат/мг білка	1,25±0,10	0,72±0,03*	0,75±0,05*	1,20±0,11#
ГSH, ммоль/кг	184,4±10,40	85,60±5,30*	64,62±4,80*#	145,0±9,50*#

*Примітка.* Зміни достовірні: \*порівняно з показниками інтактних тварин; # порівняно з показниками тварин з пародонтитом на фоні гепатиту.

тази і вміст NO<sub>x</sub> в сироватці зменшуються навіть нижче контрольних значень.

У той же час на інтенсивність окислювальних процесів в крові застосування N-нітро-L-аргініну достовірного ефекту не справило (вміст ТБК-активних продуктів і окиснено-модифікованих білків у сироватці лікованих щурів практично не відрізнявся від аналогічних показників у уражених тварин, яким корекція не проводилася). Корекція N-нітро-L-аргініном призвела до достовірного (в 1,4 раза) підвищення інтенсивності процесів ліпопероксидації в тканинах ясен тварин з пародонтитом на фоні гепатиту.

На відміну від N-нітро-L-аргініну використання з лікувальною метою селективного інгібітора iNOS призвело до достовірного зниження вмісту ТБК-активних продуктів як в сироватці крові (в 1,4 раза), так і в пародонті (в 1,3 раза), хоча в обох випадках даний показник все ще залишався достовірно підви-

щеним порівняно з контролем. Використання 1400W також призводило до достовірного пригнічення інтенсивності процесів окиснювальної модифікації білків у крові і тканинах ясен тварин з пародонтитом на фоні гепатиту (таблиця).

Досліджено також вплив модуляторів NO-синтази на функціональний стан системи антиоксидного захисту тварин з поєднаною патологією. N-нітро-L-аргінін не впливав достовірно на вміст церулоплазміну, відновленого глутатіону, активність каталази та загальну антиоксидну активність плазми крові, а також на активність супероксиддисмутази і каталази в тканинах пародонта. При цьому рівень відновленого глутатіону в пародонті уражених тварин, яким вводили неспецифічний інгібітор NO-синтази, навіть знижувався порівняно з таким у некоригованих щурів. Специфічне інгібування iNOS за допомогою 1400W, навпаки, приводило до

суттєвого поліпшення показників функціонального стану антиоксидантної системи у щурів з пародонтитом на фоні гепатиту. Зокрема, рівень церулоплазміну в сироватці тварин 4-ї групи знижувався в 1,3 раза порівняно з нелікованими щурами, вміст відновленого глутатіону підвищувався в 2,8 раза, загальна антиоксидантна активність плазми зростала в 1,5 раза. В тканинах пародонта тварин, яким проводили специфічне інгібування iNOS, активність супероксиддисмутази підвищувалася в 1,9 раза, каталази – в 1,7 раза, вміст відновленого глутатіону зростав в 1,6 раза.

Таким чином, застосування при ліпополісахаридному пародонтиті на фоні гепатиту специфічного інгібітора iNOS 1400W частково попереджує розвиток оксидативного стресу в тканинах пародонта і сироватці крові. При використанні з метою корекції неспецифічного інгібітора NO-синтази N-нітро-L-аргініну показники, що характеризують оксидативний стрес, або не змінюються, або навіть погіршуються. Виходячи з отриманих нами результатів, можна стверджувати, що порушення обміну NO, а саме його гіперпродукція індукційною NO-синтазою, є однією з ключових ланок патогенезу пародонтиту, поєднаного з гепатитом, що детермінує ряд інших патобіохімічних механізмів розвитку запалення в пародонті, зокрема інтенсивність окислювальних процесів. Очевидно, що під впливом ліпополісахаридів відбувається гіперекспресія iNOS в пародонті, в результаті чого і синтезується надмірна кількість оксиду азоту, NO, будучи радикалом, здатний започатковувати вільнорадикальні реакції. Крім того, NO здатний негайно взаємодіяти із супероксиданіонрадикалом з утворенням пероксинітриду (ONOO<sup>-</sup>), який при високих концентраціях піддається гомолітичному чи гетеролітичному розпаду, що супроводжується генерацією каскаду високотоксичних окислювальних чинників (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>, NO<sub>2</sub><sup>+</sup>, OH<sup>•</sup>). Ці реактивні сполуки можуть окислювати ліпіди, пошкоджувати клітинні мембрани, окислювати тіолові групи білків, що призводить до руйнування клітин і білків і маніфестації запального процесу. Ймовірно, що саме надмірна продукція супероксиданіонрадикалів і, як наслідок, пероксинітриду стала причиною того, що під впливом N-ніт-

ро-L-аргініну, незважаючи на пригнічення NO-синтази і зниження вмісту NO<sub>x</sub> в тканинах, явища оксидативного стресу не тільки не зменшувалися, але і, навпаки, посилювалися. Неспецифічне інгібування NOS призводить до зниження продукції NO ендотеліальною NO-синтазою, що неминує призведе до порушень мікроциркуляції в тканинах і, як наслідок, до гіпоксії, а остання може бути причиною надмірної генерації супероксиданіонрадикалів через виток електронів у дихальному ланцюзі мітохондрій.

Необхідно вказати, що NO також може виконувати корисну функцію при пародонтиті, виступаючи неспецифічним фактором захисту від бактерій. Вироблення макрофагами NO при запаленні пародонта стимулює разом з іншими радикалами реакції фагоцитозу [14]. У той же час дефіцит NO сприяє розмноженню збудників у тканинах пародонта, що призводить до хронізації патологічного процесу.

Різка збільшення сумарної активності NO-синтази і рівня NO<sub>x</sub> в пародонті і сироватці при дії ліпополісахариду на фоні гепатиту можна пояснити сумацією ефектів бактеріального ендотоксину і алілового спирту. З одного боку, ліпополісахарид безпосередньо є потужним стимулятором синтезу прозапальних цитокінів, які викликають гіперекспресію iNOS, з іншого – аліловий спирт спричиняє деструкцію гепатоцитів, у результаті чого утворюється велика кількість ендотоксинів, що призводить до вироблення цитокінів, які знову ж таки здатні стимулювати iNOS, у тому числі і в пародонті.

## Висновки

Корекція ліпополісахаридного пародонтиту на фоні гепатиту неспецифічним інгібітором NO-синтази N-нітро-L-аргініном і специфічним інгібітором iNOS 1400W призводить до різкого пригнічення синтезу оксиду азоту, причому у випадку застосування N-нітро-L-аргініну функціональна активність загальної NO-синтази і вміст NO<sub>x</sub> в сироватці зменшуються навіть нижче контрольних значень. Застосування специфічного інгібітора iNOS частково попереджує розвиток оксидативного стресу в тканинах пародонта щурів з гепатитом. При використанні з метою

корекції неспецифічного інгібітора NO-синтази показники, що характеризують оксидативний стрес, або не змінюються, або погіршуються. Селективне інгібування індужи-

бельної форми NO-синтази при запаленні пародонта, що розвивається на тлі гепатиту, може бути перспективним методом лікування хворих з такою поєднаною патологією.

### Список літератури

1. *Noack B.* Metabolic diseases and periodontitis / B. Noack, S. Fischer // *Dtsch. Med. Wochenschrift.* – 2012. – Vol. 137, № 22. – P. 1155–1157.
2. *Dalgic B.* Pyogenic liver abscess and peritonitis due to *Rhizopus oryzae* in a child with Papillon-Lefevre syndrome / B. Dalgic, A. Bukulmez, S. Sari // *Eur. J. Pediatr.* – 2011. – Vol. 170, № 6. – P. 803–805.
3. Stage of hepatocellular carcinoma is associated with periodontitis / N. Tamaki, A. Takaki, T. Tomofuji [et al.] // *J. Clin. Periodontol.* – 2011. – Vol. 38, № 11. – P. 1015–1020.
4. Щерба В.В. Патогенетичні особливості перебігу пародонтиту на фоні хронічного гепатиту / В.В. Щерба, М.М. Корда // *Медична хімія.* – 2012. – Vol. 14, № 2. – С. 64–68.
5. N-Hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine / D. Stuehr, N.S. Kwon, C. Nathan, O. Griffiths // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266. – P. 6259–6263.
6. 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. – Vol. 281. – P. 223–229.
7. *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.
8. *Мецишен І.Ф.* Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові / І.Ф. Мецишен // *Буковинськ. мед. вісник.* – 1998. – Vol. 2, № 1. – С. 156–158.
9. *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.
10. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // *Лаб. дело.* – 1988. – № 1. – С. 16–19.
11. *Ellman G.L.* Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // *Arch. Bioch. and Biophys.* – 1959. – Vol. 82. – P. 70–77.
12. *Колб В.Г.* Справочник по клинической химии / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Минск: Беларусь, 1982. – 311 с.
13. 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. – Vol. 47. – P. 215–222.
14. Evaluation of the activity of leukocytes during experimental periodontitis in the monkey / G. Gagnot, J.F. Michel, E. Legall [et al.] // *J. Biol. Buccale.* – 1988. – Vol. 16 (1). – P. 25–30.

#### **В.В. Щерба, М.М. Корда**

#### **МОДУЛИРОВАНИЕ NO-СИНТАЗ ПРИ ПАРОДОНТИТЕ НА ФОНЕ СОПУТСТВУЮЩЕГО ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА**

Исследовали влияние неселективного ингибитора NOS N-нитро-L-аргинина и селективного ингибитора iNOS 1400W на интенсивность оксидативного и нитрооксидативного стресса при пародонтите на фоне сопутствующего гепатита. Исследование проведено на белых крысах. Пародонтит вызвали путём введения в ткани пародонта бактериального липополисахарида. Гепатит вызвали введением животным аллилового спирта в течение двух недель. Липополисахаридное воспаление пародонта на фоне гепатита сопровождалось выраженным оксидативным и нитрооксидативным стрессом (в тканях пародонта и в крови возрастало содержание ТБК-активных продуктов и окисленных модифицированных белков, снижалась активность супероксиддисмутазы, уменьшалось содержание церулоплазмينا и восстановленного глутатиона, имела выраженную тенденцию к снижению общая антиоксидантная активность плазмы крови, повышалась активность

NO-синтазы и содержание  $\text{NO}_x$ ). Коррекция пародонтита на фоне гепатита обоими модуляторами приводила к резкому угнетению синтеза оксида азота, причём в случае применения N-нитро-L-аргинина функциональная активность общей NO-синтазы в пародонте и содержание  $\text{NO}_x$  в сыворотке уменьшались даже ниже контрольных значений. N-нитро-L-аргинин не влиял на показатели интенсивности оксидативного стресса или даже ухудшал их. Применение 1400W эффективно предотвращало гиперактивацию окислительных процессов в пародонте и сыворотке животных с пародонтитом на фоне гепатита и улучшало функциональное состояние системы антиоксидантной защиты. Сделан вывод, что селективное ингибирование индуцибельной формы NO-синтазы при воспалении пародонта, развивающемся на фоне гепатита, может быть перспективным методом лечения больных с такой сочетанной патологией.

**Ключевые слова:** пародонтит, хронический гепатит, оксидативный и нитрооксидативный стресс.

*V.V. Shcherba, M.M. Korda*

#### MODULATION OF NO-SYNTASES IN PERIODONTITIS ON THE CHRONIC HEPATITIS BACKGROUND

The aim of this study was to investigate the effect of NOS non-selective inhibitor N-nitro-L-arginine and iNOS selective inhibitor 1400W on the oxidative and nitrooxidative stress intensity in periodontitis on the background of concomitant hepatitis. The study was conducted on white rats. Periodontitis was caused by the injection of bacterial lipopolysaccharide into periodontal tissues. Hepatitis was caused by allyl alcohol administered for 2 weeks. Lipopolysaccharide periodontal inflammation on the hepatitis background was characterized by severe oxidative and nitrooxidative stress (in periodontal tissues and blood the levels of TBA-active products and oxidized modified proteins were increased, the activity of superoxide dismutase, ceruloplasmin and reduced glutathione contents were decreased, total antioxidant activity of blood plasma had a distinct downward trend, the activity of NO-synthase and the content of  $\text{NO}_x$  were markedly increased). Correction of periodontitis on the hepatitis background by both modulators led to a dramatic inhibition of nitric oxide synthesis, and in the case of N-nitro-L-arginine using the functional activity of total NO-synthase in the periodontium and the  $\text{NO}_x$  content in the serum decreased even lower than the control values. N-nitro-L-arginine had no effect on the intensity of oxidative stress, or even worsen them. Application of 1400W effectively prevented hyperactivation of oxidative processes in periodontal tissues and serum of animals with periodontitis on hepatitis background and improved the functional status of antioxidant system. It has been concluded that the selective inhibition of the inducible form of NO-synthase in the inflammation of periodontal tissues on hepatitis background may be a promising treatment method for patients with such comorbidity.

**Key words:** periodontitis, chronic hepatitis, nitrooxidative and oxidative stress.

*Поступила 10.08.13*