

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© Должкова К.П., Костенко В.О  
УДК 616.716.4-001.5:616.916'175

### ВПЛИВ ПРИГНІЧЕННЯ ТА ІНДУКЦІЇ NO-СИНТАЗ НА БІОХІМІЧНИЙ СКЛАД КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ ПРИ ВІДТВОРЕННІ ЇЇ ПЕРЕЛОМУ НА ТЛІ ХРОНІЧНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ НІТРАТОМ НАТРІЮ.

Должкова К.П., Костенко В.О.

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м.Полтава.

*Активність NO-синтаз в умовах хронічної 60-денної нітратної інтоксикації впливає на репаративний остеогенез при моделюванні перелому нижньої щелепи у крыс. При дослідженні біохімічних показателів костної тканини нижньої щелепи встановлено, що рівень хондроїтинсульфатів не залежить від ступеня активності NO-синтаз при моделюванні перелому на фоні хронічної інтоксикації нітратом натрію. Після введення неселективного (L-NAME) і селективного iNOS (аміногуанідину) інгібіторів достовірно знижується рівень фукози, не пов'язаної з білками, і N-ацетилнейрамінової кислоти в костній тканині нижньої щелепи на фоні хронічної нітратної інтоксикації на 14 днів після моделювання її перелому. В той же час, при експериментальному переломі в умовах надмірного надходження в організм нітрату натрію характерно збільшення вмісту гексуронової кислоти в костній тканині нижньої щелепи при введенні неселективного блокувача NO-синтаз (L-NAME) на 14 днів і його зменшення при введенні селективного інгібітора iNOS (аміногуанідину) і субстрату NOS (L-аргініну) на 14 і 28 днів після перелому.*

Ключевые слова: репаративная регенерация, нитрат натрия, нижняя челюсть, биохимические исследования, активность NO-синтаз.

Однією із поширених проблем сучасного світу є травматизм, як побутовий так і виробничий. Висока частота уражень нижньої щелепи (від 85 до 90 % усіх переломів кісток лицевого скелету) обумовлена її особливостями, більш висунутим положенням відносно інших кісток лицевого скелету. Переломи нижньої щелепи можуть виникати внаслідок надмірного її переїдання, зтискання, рідше обриву [1].

Оксид азоту має неоднозначну дію на функціонування клітин кісток. Високий рівень NO інгібує кісткову резорбцію, а також може призвести до пригнічення обміну речовин у кістковій тканині при запаленні. Тоді, як низькі концентрації NO потенціюють цитокін-індуковану резорбцію та мають важливий вплив на функціонування остеобластів. Ріст та диференціювання остеобластів пригнічуються високими концентраціями NO, який частково призупиняє дію прозапальних цитокінів на формування кісток [2, 3]. Також відомо, що фармакологічні донатори оксиду азоту збільшують кісткову масу в експериментальних тваринах [4].

Мета роботи – встановити вплив активності NO-синтаз на репаративний остеогенез при переломі нижньої щелепи на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію.

#### Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводилося на 60 щурах лінії Віс-тар, які були розподілені на 7 груп: I (інтактні), II (після

60-денної інтоксикації нітратом натрію) та III (відтворення експериментального перелому нижньої щелепи без інтоксикації) – контрольні, IV (відтворення експериментального перелому нижньої щелепи на фоні 60-денної інтоксикації нітратом натрію) і V, VI та VII дослідні групи (тваринам перед моделюванням перелому нижньої щелепи на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію вводили відповідно неселективний інгібітор NO-синтаз – метиловий ефір нітро-L-аргінін (L-NAME), селективний інгібітор індукційної NO-синтази – аміногуанідин та субстрат NO-синтази – реакції – L-аргінін).

Хронічну інтоксикацію нітратом натрію відтворювали шляхом введення нітрату натрію у дозі 200 мг/кг маси тіла у вигляді водного розчину інтрагастрально за допомогою спеціального зонду щоденно протягом 60 днів [5]. L-NAME вводили в дозі 20 мг/кг, аміногуанідин – в дозі 25 мг/кг за 24 та 48 годин, L-аргінін – у дозі 100 мг/кг маси інтрагастрально за три дні до моделювання перелому нижньої щелепи.

Взяття матеріалу проводили на 14 та 28 добу після операції відтворення перелому нижньої щелепи. Евтаназію тварин здійснювали шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом.

Визначення хондроїтинсульфатів у кістковій тканині проводилось методом Nemeth-Csoka у модифікації Л.І. Слущького, вміст фукози досліджували за методом Dishe і Shettles, N-ацетилнейрамінової кислоти – за методом Гесса, гексуронової кислоти – методом

Dishe в модифікації Bitter і Muir [6, 7]. Статистична обробка результатів проводилася методом математичної статистики.

### Результати та їх обговорення

При дослідженні показників таких вуглеводних похідних глікопротеїнів неколагенових груп білків кісткової тканини, як фукоза, незв'язана з білками, та N-ацетилнейрамінова кислота у нижній щелепі щурів виявлено, що вміст даних показників у другій групі тварин на 60 добу інтоксикації нітратом натрію був підвищений на 19,4% та 13,8 % відповідно (таб. 1).

Таблиця 1.  
Вміст компонентів глікопротеїнів у кістках нижньої щелепи щурів за умов надлишкового надходження до організму нітрату натрію ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Показники	I група (інтактна)	II група (на 60 добу інтоксикації нітратом натрію)
Фукоза, незв'язана з білками, мкмоль/г	1.44 ± 0.08	1.72 ± 0.07 *
N-ацетилнейрамінова кислота, мкмоль/г	2.03 ± 0.06	2.32 ± 0.10 *

Примітка. В табл. 1. і наступних: \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з I (інтактною) групою тварин.

При дослідженні компонентів протеогліканів, виявлено, що вміст у кістковій тканині нижньої щелепи хондроїтинсульфатів не зазнав вірогідних змін, а показ-

ник гексуронової кислоти достовірно збільшився у другій групі тварин порівняно з інтактною групою на 41,7% (таб. 2).

Таблиця 2.  
Вміст компонентів протеогліканів у кістках нижньої щелепи щурів за умов надлишкового надходження до організму нітрату натрію ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Показники	I група (інтактна)	II група (на 60 добу інтоксикації нітратом натрію)
Хондроїтин-4- та хондроїтин-6-сульфати, г/100 г сухої тканини	0,172 ± 0,08	0,183 ± 0,011
Гексуронової кислоти, мкмоль/г	1.32 ± 0.07	1.87 ± 0.11 *

Дані показники свідчать про чутливість кісткової тканини нижньої щелепи до хронічної інтоксикації нітратом натрію. Такі зміни в органічній складовій кістки свідчать про дезорганізацію сполучної тканини за умов нітратної інтоксикації, про що повідомлялося раніше [8].

При дослідженні впливу пригнічення та індукції NO-синтаз на вміст хондроїтинсульфатів у кістковій тканині нижньої щелепи встановлено вірогідне збільшення даного показника при введенні L-NAME за умов 60-денної інтоксикації нітратом натрію на 14 добу після відтворення перелому на 30,2% та 45,5% відносно першої та третьої груп (таб. 3).

Таблиця 3.  
Вплив пригнічення та індукції NO-синтаз на вміст хондроїтинсульфатів у кістках нижньої щелепи щурів у динаміці репаративного остеогенезу за умов надлишкового надходження до організму нітрату натрію, г/100 г сухої тканини ( $M \pm m$ ,  $n=40$ )

Термін після відтворення перелому кісток нижньої щелепи	III група (перелом без нітратної інтоксикації)	IV група (перелом + нітрат (60 діб))	V група (перелом + нітрат + L-NAME)	VI група (перелом + нітрат + аміногуанідин)	VII група (перелом + нітрат + L-аргінін)
Через 14 діб	0.154 ± 0.008	0.213 ± 0.008 ***/****	0.224 ± 0.017 ***	0.189 ± 0.020	0.204 ± 0.013 **
Через 28 діб	0.168 ± 0.010	0.194 ± 0.012	0.202 ± 0.020	0.178 ± 0.019	0.186 ± 0.016

Примітка. В табл. 3 і наступних: \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з інтактною групою тварин; \*\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем (такий же термін репаративного остеогенезу після відтворення перелому кісток нижньої щелепи без введення нітрату); \*\*\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем (60-добове введення нітрату без моделювання перелому) \*\*\*\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з IV групою (такий самий термін репаративного остеогенезу після відтворення перелому на тлі 60-денної нітратної інтоксикації).

При введенні тваринам L-аргінину на фоні хронічної нітратної інтоксикації на 14 добу після операції спостерігалось збільшення вмісту хондроїтинсульфатів відносно групи тварин без попередньої інтоксикації нітратом натрію на 32,5%. На 28 добу експерименту жодних достовірних змін даного показника не спостерігалось. Відносно дослідної групи тварин з моделюванням перелому на фоні 60-денної нітратної інтоксикації вірогідних різниць показників не спостерігалось при введенні інгібіторів та субстрату NO-синтаз на обидва терміни після моделювання перелому.

Тобто, можна відмітити, що зміни функціональної активності NO-синтаз за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію при моделюванні перелому нижньої щелепи не впливають на рівень хондроїтинсульфатів у кістковій тканині.

Вміст фукози, незв'язаної з білками, вірогідно зменшився при введенні L-NAME та аміногуанідину відносно четвертої групи тварин (на 14 добу після відтворення перелому після попередньої 60-денної нітратної інтоксикації) на 14,6% та 15,7% відповідно. При введенні L-аргінину на 28,5% збільшувався даний показник відносно інтактної групи тварин (таб. 4).

Таблиця 4.

Вплив пригнічення та індукції NO-синтаз на вміст фукози, незв'язаної з білками, у кістках нижньої щелепи щурів у динаміці репаративного остеогенезу за умов надлишкового надходження до організму нітрату натрію, мкмоль/г ( $M \pm t$ ,  $n=50$ )

Термін після відтворення перелому кісток нижньої щелепи	III група (перелом без нітратної інтоксикації)	IV група (перелом + нітрат (60 діб))	V група (перелом + нітрат + L-NAME)	VI група (перелом + нітрат + аміногуанідин)	VII група (перелом + нітрат + L-аргінін)
Через 14 діб	1.56 ± 0.12	1.98 ± 0.08 */**/*	1.69 ± 0.1****	1.67 ± 0.07****	1.85 ± 0.14*
Через 28 діб	1.12 ± 0.07 *	1.56 ± 0.15 ***	1.46 ± 0.12**	1.28 ± 0.14***	1.29 ± 0.08***

На 28 добу після моделювання перелому нижньої щелепи на тлі хронічної нітратної інтоксикації при введенні інгібіторів та субстрату NOS не спостерігалося вірогідних змін досліджуваного показника відносно четвертої дослідної групи. При введенні L-NAME рівень фукози, не зв'язаної з білками, у кістці достовірно збільшувався на 30,4% відносно даного показника на той же термін після операції без попередньої інтоксикації. При введенні аміногуанідину та L-аргінину цей показник вірогідно зменшився відповідно на 25,6% та 25,0% відносно другої контрольної групи тварин (після 60-денної нітратної інтоксикації).

Отже, на 14 добу після відтворення експериментального перелому нижньої щелепи за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію відбувалося вірогідне зниження рівня фукози, незв'язаної з білками, у кістковій тканині при введенні селективного (L-NAME) та неселективного інгібітора індукції NOS (аміно-

гуанідину). Такі дані можуть свідчити про те, що у процесі впливу хронічної нітратної інтоксикації на кісткову тканину нижньої щелепи щурів на ранніх строках репаративного остеогенезу значну роль відіграє NO-синтазний шлях утворення оксиду азоту в організмі.

При дослідженні впливу пригнічення та індукції NO-синтаз на вміст N-ацетилнейрамінової кислоти у кістках нижньої щелепи щурів за умов 60-денної інтоксикації нітратом натрію у процесі репаративної регенерації встановлено достовірне зменшення її вмісту на 14 добу відносно четвертої дослідної групи при введенні L-NAME та аміногуанідину на 14,8% та 20,9%, і збільшення відносно третьої групи тварин на 32,5% та 23,1% відповідно. Після введення L-аргінину спостерігалося вірогідне підвищення даного показника на 23,2% та 47,9% відносно першої та третьої контрольних груп відповідно (таб. 5).

Таблиця 5.

Вплив пригнічення та індукції NO-синтаз на вміст N-ацетилнейрамінової кислоти у кістках нижньої щелепи щурів у динаміці репаративного остеогенезу за умов надлишкового надходження до організму нітрату натрію, мкмоль/г ( $M \pm t$ ,  $n=50$ )

Термін після відтворення перелому кісток нижньої щелепи	III група (перелом без нітратної інтоксикації)	IV група (перелом + нітрат (60 діб))	V група (перелом + нітрат + L-NAME)	VI група (перелом + нітрат + аміногуанідин)	VII група (перелом + нітрат + L-аргінін)
Через 14 діб	1.69 ± 0.13 *	2.63 ± 0.10 */**/*	2.24 ± 0.12 **/*	2.08 ± 0.07 **/*	2.5 ± 0.18 */**
Через 28 діб	1.55 ± 0.08 *	1.89 ± 0.12 **/*	2.06 ± 0.14 **	1.79 ± 0.11 ***	2.12 ± 0.15 **

На 28 добу після моделювання перелому нижньої щелепи не відбувалося вірогідних змін вмісту N-ацетилнейрамінової кислоти при введенні даних препаратів відносно четвертої групи на той же строк остеогенезу. Але при введенні L-NAME та L-аргінину відбувалося вірогідне збільшення показника відносно групи тварин на той же термін після операції без попередньої інтоксикації на 32,9% та 36,8% відповідно. При додаванні аміногуанідину цей показник вірогідно збільшувався на 22,8% відносно показника при 60-денній нітратній інтоксикації.

Отже, на 14 добу після моделювання перелому на фоні 60-денної нітратної інтоксикації мало місце вірогідне зменшення рівня N-ацетилнейрамінової кислоти у кістковій тканині нижньої щелепи при введенні селективного (L-NAME) та неселективного інгібітора індукції NOS (аміногуанідину). Такі дані корелюють із показниками рівня фукози, незв'язаної з

білками, та можуть вказувати на активізацію процесу перебудови кісткової тканини.

При дослідженні вмісту гексуронової кислоти у кістці нижньої щелепи на 14 добу після моделювання перелому на фоні хронічної інтоксикації нітратом натрію при додаванні L-NAME вірогідне збільшення спостерігалося відносно першої, другої і третьої груп на 93,9%, 36,9% та 68,4% відповідно. При дії аміногуанідину було характерно вірогідне зменшення показника відносно другої контрольної групи на 18,2%. А для L-аргінину – збільшення на 27,3% відносно першої контрольної групи тварин. Відносно четвертої дослідної групи (моделювання перелому на тлі хронічної нітратної інтоксикації) при введенні L-NAME спостерігалося достовірне збільшення показника на 14,3%, а при введенні аміногуанідину та L-аргінину – зменшення на 31,7% та 25,0% відповідно.

Таблиця 6.

Вплив пригнічення та індукції NO-синтаз на вміст гексуронової кислоти у кістках нижньої щелепи щурів у динаміці репаративного остеогенезу за умов надлишкового надходження до організму нітрату натрію, мкмоль/г ( $M \pm t$ ,  $n=50$ )

Термін після відтворення перелому кісток нижньої щелепи	III група (перелом без нітратної інтоксикації)	IV група (перелом + нітрат (60 діб))	V група (перелом + нітрат + L-NAME)	VI група (перелом + нітрат + аміногуанідин)	VII група (перелом + нітрат + L-аргінін)
Через 14 діб	1.52 ± 0.14	2.24 ± 0.11 */**/*	2.56 ± 0.08 */**/*	± 0.08 **/*	± 0.14 */**
Через 28 діб	0.93 ± 0.08 *	1.99 ± 0.08 */**	± 0.15 */**	± 0.12 **/*	1.62 ± 0.13 **/*

Вірогідне збільшення рівня досліджуваного показника у кістковій тканині при введенні неселективного

інгібітору NOS (L-NAME) на 14 добу після операції може вказувати на протективну роль конституціона-

льної NOS на вміст гексуранових кислот за умов хронічної нітратної інтоксикації. Причому, введення селективного пригнічення iNOS аміногуанідином має зворотній вплив на вміст даного показника.

На 28 добу після відтворення перелому спостерігалось збільшення даного показника відносно інтактної групи на 63,6% при введенні L-NAME за умов хронічної нітратної інтоксикації. Відносно другої групи тварин було характерне зменшення цього показника на 34,8% після використання аміногуанідину. При введенні L-NAME та L-аргініну відбувалося збільшення рівня гексуранових кислот відносно третьої групи шурів (моделювання перелому без попередньої інтоксикації) на 132,3% та 74,2% відповідно. Відносно четвертої дослідної групи вірогідне зменшення досліджуваного показника спостерігалось при використанні аміногуанідину та L-аргініну на 38,7% та 18,6% відповідно. Протективна роль L-аргініну в репаративному процесі за умов нітратної інтоксикації може пояснюватися його позитивним впливом на утворення такого компоненту сполучної тканини, як проліну (попереднику гідроксипроліну) [9], та стимуляцією продукції соматотропного гормону [10].

Отже, вплив селективного інгібітора iNOS та субстрату NOS на рівень гексуранових кислот 28 добу після моделювання перелому є аналогічним, як і на більш ранній строк репаративного процесу в кістковій тканині нижньої щелепи.

#### Висновки

1. Зміни рівня хондроїтинсульфату в кістковій тканині нижньої щелепи при моделюванні її перелому на фоні хронічної нітратної інтоксикації не залежать від активності NO-синтаз.

2. Ведення неселективного (L-NAME) та селективного інгібітору iNOS (аміногуанідину) викликає вірогідне зниження на 14 добу після відтворення перелому нижньої щелепи вмісту фукози, незв'язаної з білками, та N-ацетилнейрамінової кислоти, що може свідчити про активізацію процесу перебудови кісткової тканини та про вплив NO-синтазного шляху утворення оксиду азоту на біохімічний склад кісткової тканини при репаративній регенерації за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію.

3. Вміст гексуранових кислот у кістковій тканині нижньої щелепи при моделюванні її перелому на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію залежить від активності NO-синтаз, причому збільшення даного показника при неселективному блокуванні NOS вказує на протективний вплив конституціональної NOS на ранніх строках репаративної регенерації за умов 60-денної інтоксикації нітратом натрію на рівень даного показника. А введення селективного інгібітора iNOS-синтази та субстрату NOS викликає вірогідне зменшення даного показника при хронічній нітратній інтоксикації на обох строках репаративного процесу, що вказує на активізацію процесу перебудови у кістковій тканині нижньої щелепи.

#### Література

1. Тимофеев А.А. Руководство по челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии / Тимофеев А.А. (4-е изд. перераб. и доп). – К. – СОО «Красная Рута –Турск». – 2004. – 1062 с.
2. de Albuquerque RF Jr. Trigeminal nitric oxide synthase expression correlates with new bone formation during distraction osteogenesis / de Albuquerque RF Jr, Aparecida Del Bel E, Brentegani LG, Moura de Oliveira MT, Mardegan Issa JP. // *Calcif Tissue Int.* – 2008. – V.82, N4. – P. 309-15.
3. Diwan A.D. Nitric Oxide Modulates Fracture Healing. / A.D. Diwan, M.X. Wang, D. Jang, Wei Zhu G.A. Murrell // *J. of Bone and Mineral Research.* – 2000. – Vol.15, N2. – P. 342-351.
4. van't Hof R.J. Nitric oxide and bone / R.J. van't Hof, S.H. Ralston // *Immunology.* – 2001. – Vol.103, N3. – P.255-261.
5. Костенко В.О. Механізми порушення окисних процесів у тканинах при надлишковому утворенні оксиду азоту з екзогенних попередників / В.О. Костенко, А.Г. Костенко, С.В. Денисенко та ін. // *Клін. та експ. патол.* – 2004. – Т.3, № 2 (Ч.1). – С.202-204.
6. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии / В.С. Асатиани. – М. – 1965. – 272 с.
7. Камышников В.С. Клиническая биохимия / В.С. Камышников. – Минск, «Беларусь». – 2000. – Т.2. – 463 с.
8. Костенко В.А. Не только концентрация, но и происхождение оксида азота определяет его патогенетическую или саногенетическую роль / В.А. Костенко, И.В. Батухина, А.А. Левков [и др.] // *Патология.* – 2008. – Т.5, №2. – С.58.
9. Barbul A. Proline precursors to sustain Mammalian collagen synthesis / A. Barbul // *J. Nutr.* – 2008. – V. 138, №10. – P. 2021S-2024S.
10. 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.

#### Summary

THE INFLUENCE OF NO-SINTASES INHIBITION AND INDUCTION ON MANDIBLE'S BONE TISSUE BIOCHEMICAL STRUCTURE IN A CASE OF FRACTURE MODULATION AND CHRONIC SODIUM NITRITUM INTOXICATION.

Dolzhkovaya E.P., Kostenko V.O.

Key words: reparative regeneration, sodium nitritum, mandible, biochemical research, NO-sintases activity.

An activity of NO-sintases affects the reparative osteogenesis during the mandible's fracture modulation at rats in the conditions of 60-days long nitric intoxication. It was established in the research of biochemical indicators of mandible's bone tissue that the level of chondroitin-sulfate doesn't depend on NO-sintases activity in the condition of fracture modulation and chronic sodium nitritum intoxication. The levels of non-united with proteins fucose and N-acetylneiraminic acid in the mandible's bone tissue authentically decreased after nonselective (L-NAME) and selective iNOS (amynoguanidyne) inhibitors introduction at the 14th day after fracture modulation. In a case of experimental mandible's fracture, excessive entering of sodium nitritum and introduction of nonselective (L-NAME) NO-sintases inhibitor the increasing of hexurone acid was registered on the 14th day. The level of hexurone acid deceased on the 14th and 28th day after the experimental fracture and introduction of selective iNOS (amynoguanidyne) inhibitor and NOS substrate (L-arginin).

Higher State Educational Establishment of Ukraine «Ukrainian Medical Stomatological Academy», Poltava

*Матеріал надійшов до редакції 21.05.2010 р.*