

© Стасюк О.А., Костенко В.О.  
УДК 616.316-092.9 : 615.916'175

## ВПЛИВ СКЕВЕНДЖЕРІВ ПЕРОКСИНИТРИТУ НА ОКИСНЮВАЛЬНІ ПРОЦЕСИ У ТКАНИНАХ СЛИННИХ ЗАЛОЗ БІЛИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ СПІЛЬНОГО НАДЛИШКОВОГО НАДХОДЖЕННЯ НІТРАТУ ТА ФТОРИДУ НАТРІЮ

Стасюк О.А., Костенко В.О.

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

*В эксперименте на 20 белых крысах массой 180-200 г исследована роль скэвенджеров пероксинитрита на уровень продукции супероксидного анион-радикала, состояние пероксидного окисления липидов, антиоксидантной защиты в тканях поднижнечелюстных слюнных желез крыс и их белоксинтезирующей функции в условиях сочетанного токсического действия нитрата и фторида натрия. Исследования проведены в таких сериях опытов: в первой - интактные животные (контрольная серия), во второй - после сочетанного введения нитрата натрия (200 мг/кг массы тела) и фторида натрия (10 мг/кг) в течение 30 суток, в третьей и четвертой - в период 30-дневной совокупной токсического действия нитрата и фторида натрия вводили скэвенджеры пероксинитрита - L-селенометионин (3 мг/кг 1 раз в неделю) и мочевиная кислота (250 мг/кг 3 раза в неделю). Выявлено, что введение крысам L-селенометионина и мочевиной кислоты в этих условиях снижает продукцию супероксидного анион-радикала (микросомальной и митохондриальной электронно-транспортными цепями) и активность пероксидного окисления липидов, улучшает состояние антиоксидантной защиты и белоксинтезирующей функции слюнных желез. Сделан вывод, что нарушение свободнорадикальных процессов в тканях поднижнечелюстных слюнных желез на фоне бинарной хронической интоксикации нитратом и фторидом натрия являются пероксинитрит-зависимыми.*

Ключевые слова: интоксикация нитратом натрия, интоксикация фторидом натрия, оксид азота, пероксинитрит, слюнные железы, супероксидный анион-радикал, пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система.

За оцінками науковців, у аграрно-промислових регіонах України значною проблемою є комбінована дія на організм людини та тварин неорганічних азотовмісних сполук та фторидів, що супроводжується випадками гострих та хронічних нітратно-нітритних інтоксикацій та ендемічного флюорозу [1,4].

В останні роки слинні залози (СЗ) розглядаються як важливий орган регуляції утворення оксиду азоту (NO) у кількості, необхідній для нормального функціонування протективних систем слизової оболонки органів шлунково-кишкового тракту, підтримання її цілісності [9]. Кількість NO, що надходить у організм із слиною, контролюється механізмом ауторегуляції, відомим як цикл оксиду азоту [6]. Поряд з NO-синтазом шляхом в СЗ NO утворюється через нітрат- та нітритредуктазні реакції [9]. Вважається, що саме ця складова циклу NO є фізіологічно необхідною за умов зниження активності NO-синтаз, наприклад, за умов гіпоксії [6].

У попередніх роботах нами показано, що при введенні фториду натрію на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію у тканинах СЗ порушуються механізми ауторегуляції рівня NO в організмі: типове для ізольованого призначення нітрату натрію пригнічення активності сумарних NOS змінюється на збільшення їх активності [7]. Такі зміни можуть бути пов'язані зі здатністю фторид-іонів пригнічувати аргінази – ферменти конкурентного (щодо NO-синтазного) неокисного шляху метаболізму L-аргініну [2].

Завдяки можливості продукції надлишкової кількості NO як з екзогенних, так і ендогенних попередників, виникає можливість утворення в реакції з супероксид-

ним аніон-радикалом ( $O_2^-$ ) високоактивного пероксинітриту ( $.ONOO^-$ ). Ця взаємодія є найшвидшою з усіх відомих біохімічних реакцій (константа швидкості до-

рівнює  $3,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Пероксинітрит легко проникає через ліпідний бішар мембрани і має значно більше хімічних мішеней, ніж NO [14].

Проте у низьких концентраціях  $.ONOO^-$  виявляє регуляторні та протекторні властивості щодо функцій ферментних систем і виживання клітин, забезпечує процес сигнальної трансдукції. Тому утворення  $.ONOO^-$  може частково нейтралізувати пряму токсич-

ну дію NO або  $O_2^-$ . Високі концентрації  $.ONOO^-$  є дуже токсичними, пригнічують митохондриальні ферментні комплекси, викликають фрагментування білків через нітрування амінокислот і ліпопротеїнів [10,14]. Відома здатність  $.ONOO^-$  позитивно впливати на утво-

рення  $O_2^-$ , підтримуючи тим самим своєрідне «порочне» коло.

Метою роботи було вивчення впливу скэвенджерів пероксинітриту (L-селенометионіну та сечової кислоти)

на рівень продукції  $O_2^-$ , стан пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), антиоксидантного (АО) захисту в тканинах піднижньощелепних СЗ щурів та їх білоксинтезуючої функції за умов сукупної токсичної дії нітрату та фториду натрію.

### Матеріали та методи дослідження

Дослідження були проведені на 20 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 сукупного введення нітрату натрію (200 мг/кг маси тіла) та фториду натрію (10 мг/кг маси тіла) протягом 30 днів, у третій та четвертій – протягом періоду 30-денної сукупної токсичної дії нітрату та фториду натрію вводилися

скевенджери пероксинітриту – відповідно L-селенометіонін і сечова кислота.

L-селенометіонін (виробництва "Sigma-Aldrich, Inc.", США) вводили внутрішньоочередово в дозі 3 мг/кг [12] 2 рази на тиждень, сечову кислоту (виробництва "Sigma Chemical Co", США) вводили внутрішньоочередово в дозі 250 мг/кг [11] 3 рази на тиждень протягом періоду 30-денної сукупної токсичної дії нітрату та фториду натрію. Евтаназію тварин виконували методом дислокації шийних хребців під ефірним наркозом.

Утворення  $O_2^-$  у гомогенаті СЗ оцінювали при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм з індукторами у вигляді НАДН і НАДФН [8]. Рівень ПОЛ у тканинах оцінювали по утворенню в реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними продуктами забарвленого триметінового комплексу до і після 1,5-годинної інкубації [5]. Активність АО системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час півторогодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю АО ферментів – супероксиддисмутази (СОД) та каталази [5].

Активність у тканинах СЗ  $\alpha$ -амілази визначали за методикою Каравея за допомогою набору реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна, м. Дніпропетровськ) [3].

Отримані дані піддавали статистичній обробці. Для перевірки розподілу на нормальність було застосовано розрахунок критерію Шапіро-Вілка. 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 та їх обговорення

Введення білим щурам L-селенометіоніну за умов бінарної 30-денної інтоксикації нітратом і фторидом натрію достовірно знижує вироблення у тканинах СЗ

$O_2^-$  мікросомальним та мітохондріальним ЕТЛ (див. табл) – відповідно на 23.9% ( $p < 0,001$ ) та 14.9% ( $p < 0,01$ ) у порівнянні з даними другої серії. При введенні сечової кислоти також достовірно знижується продукція у тканинах СЗ  $O_2^-$  мікросомальним та мітохондріальним ЕТЛ – відповідно на 11.9% ( $p < 0,01$ ) та 19.7% ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з даними другої серії.

Таблиця

Вплив скевенджерів пероксинітриту на зміни показників вільнорадикального окиснення, антиоксидантного захисту у тканинах піднижньощелепних слинних залоз щурів та їх секреторну функцію за умов надлишкового надходження нітрату та фториду натрію ( $M \pm m$ ,  $n=20$ )

Показники	Серії дослідів			
	Інтактні тварини	Сукупне введення нітрату та фториду натрію		
		Контроль	+ L-селенометіонін	+ сечова кислота
Продукція $O_2^-$ , нмоль/г × с				
мікросомальним ЕТЛ	15.86 ± 0.53	21.12 ± 0.34 *	16.07 ± 0.69 **	18.61 ± 0.55 */**
мітохондріальним ЕТЛ	14.08 ± 0.41	18.94 ± 0.32 *	16.12 ± 0.59 */**	15.21 ± 0.51**
Концентрація ТБК-реактивів, мкмоль/г				
до інкубації	22.7 ± 0.4	35.8 ± 1.2 *	27.9 ± 1.4 */**	28.5 ± 1.3 */**
після інкубації	30.0 ± 1.2	50.1 ± 1.4 *	39.4 ± 2.08 */**	39.8 ± 1.77 */**
Приріст	7.3 ± 0.3	14.3 ± 0.4 *	11.5 ± 0.6 */**	11.3 ± 0.5 */**
СОД, од. акт.	0.22 ± 0.01	0.15 ± 0.01 *	0.20 ± 0.01 **	0.22 ± 0.01 **
Каталаза, мкат/г	2.89 ± 0.10	2.34 ± 0.07 *	2.72 ± 0.11 **	2.74 ± 0.13 **
$\alpha$ -Амілаза, мг/год × г	70.32 ± 1.97	60.11 ± 1.89 *	68.14 ± 2.00 **	68.74 ± 1.95 **

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

Обмеження генерації  $O_2^-$  мікросомальним та мітохондріальним ЕТЛ при дії скевенджерів пероксинітриту, вочевидь, відбиває здатність  $ONOO^-$  порушувати у клітинах функціонування цих ланцюгів (інактивувати НАДН- та НАДФН-залежні оксидоредуктази, руйнувати FeS-кластери) [14]. У мітохондріях пероксинітрит окиснює цистеїнові та метіонінові залишки білків, інгібує комплекси I та II, аконітазу, АТФ-азу, Mn-СОД, креатинкіназу та глутатіонпероксидазу, знижує рівень відновленого глутатіону. Дисфункція мітохондріального ЕТЛ вважається провідним чинником гіперпродукції  $O_2^-$  внутрішньою мембраною мітохондрій [13].

Введення тваринам L-селенометіоніну на тлі хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію досто-

вірно зменшує концентрацію ТБК-реактивів до інкубації – на 22.1% ( $p < 0,01$ ), після інкубації – на 21.4% ( $p < 0,01$ ). Величина приросту концентрації ТБК-активних сполук за час півторогодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині – знижується на 19.6% ( $p < 0,01$ ) у порівнянні з даними другої серії.

Введення щурам сечової кислоти на тлі хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію також достовірно зменшує концентрацію ТБК-реактивів до інкубації – на 20.4% ( $p < 0,01$ ), після інкубації – на 20.6% ( $p < 0,001$ ). Величина приросту концентрації ТБК-активних сполук за час півторогодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині – знижується на 21.0% ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з даними другої серії.

Достовірно зменшення приросту концентрації ТБК-активних сполук за час інкубації при введенні скевенджерів пероксинітриту вказує на їхню здатність обме-

жувати зниження АО потенціалу в тканинах СЗ при дії токсикантів, що також підтверджується достовірним підвищенням у тканинах активності АО ферментів. Так, при введенні тваринам L-селенометіоніну на тлі хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію активність СОД і каталази збільшується – відповідно на 33.3% ( $p < 0,01$ ) та 16.2% ( $p < 0,02$ ) у порівнянні з даними другої серії. При введенні сечової кислоти активність зазначених ферментів – збільшується відповідно на 46.7% ( $p < 0,001$ ) та 17.1% ( $p < 0,02$ ) у порівнянні з даними другої серії.

Отримані результати вказують на той факт, що зростання у тканинах СЗ активності ПОЛ та зниження АО потенціалу на тлі бінарної хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію є пероксинітрид-залежними процесами. 'ONOO' окиснює NH- і SH-групи білків, ДНК, призводить до інактивації ферментів ( $\alpha_1$ -інгібітора протеїназ, тканинного інгібітора металопроїназ тощо), пригнічує активність Cu-Zn-СОД і Mn-СОД шляхом нітрування її тирозинового залишку, а також через зв'язування з міддю і зміною її валентності [14,15]. У присутності 'ONOO' утворюються тілні радикали глутатіону, в результаті чого останній перетворюється з антиоксиданту в прооксидант, який ініціює процеси ПОЛ.

Введення тваринам L-селенометіоніну та сечової кислоти на тлі бінарної хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію підвищує у тканинах піднижньощелепних СЗ активність  $\alpha$ -амілази – відповідно на 13.4% ( $p < 0,02$ ) та 14.4% ( $p < 0,01$ ) у порівнянні з даними другої серії.

З урахуванням результатів власних досліджень та даних літератури [10,14,15] можна відмітити такі основні механізми патогенної дії 'ONOO': 1) порушення фосфорилування тирозину; 2) ініціація вільнорадикальних реакцій; 3) зниження антиоксидантного потенціалу; 4) порушення функції важливих білкових молекул; 5) посилення протеолізу білків.

### Висновки

1. Порушення вільнорадикальних процесів у тканинах піднижньощелепних слинних залоз на тлі бінарної хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію є пероксинітрид-залежними.

2. Введення щурам скевенджерів пероксинітриду (L-селенометіоніну та сечової кислоти) за цих умов знижує продукцію супероксидного аніон-радикала (мікросомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами) та активність пероксидного окиснення ліпідів, покращує стан антиоксидантного захисту та секреторної функції слинних залоз.

### Література

1. Белікова І.В. Стан питної води та її вплив на виникнення захворювань порожнини рота у населення Полтавської області / І.В. Белікова // Вісн. соц. гіг. та орг. охор. здор. – 2004. – №4. – С. 33-36.
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. Лабораторные методы исследования в клинике / [Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотиницкая Р.П. и др.] – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
4. Лаврушенко Л.Ф. Довкілля, токсиканти у харчових продуктах та стан окисних процесів в організмі / Л.Ф. Лаврушенко // Експрес – новини: наука, техніка, виробництво. – 1998. – № 9-10. – С. 13 -14.
5. 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.
6. 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.
7. 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.197-171.
8. Цебржинский О.И. Дифференцированное спектрофотометрическое определение продукции 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. Björne H.H. Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness / H.H. Björne, J. Petersson, M. Phillipson [et al.] // J Clin Invest. – 2004. – V.113, №1. – P. 106-114.
10. Calcerrada P. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications / P. Calcerrada, G. Peluffo, R. Radi // Curr Pharm Des. – 2011. – V.17, №35. – P. 3905-3932.
11. Durante P. Effect of uric acid on nephrotoxicity induced by mercuric chloride in rats // P. Durante, F. Romero, M. Pérez [et al.] // Toxicol Ind Health. – 2010. – V.26, №3. – P. 163-174.
12. 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.
13. Murphy M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species / M.P. Murphy // Biochem J. – 2009. – V. 417. – P. 1-13.
14. Szabó S. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics / C. Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi // Nature Reviews. – 2007. – V. 6. – P. 662-680.
15. Zhang X. Peroxynitrite mediated oxidation damage and cytotoxicity in biological systems / X. Zhang, D. Li // Life Sci J. – 2006. – V.3, № 3. – P. 41-44.

### Summary

EFFECT OF PEROXYNITRITE SCAVENGERS ON OXIDATIVE PROCESSES IN SALIVARY GLAND TISSUES OF WHITE RATS UNDER SODIUM NITRATE AND FLUORIDE COMBINED EXCESSIVE INTAKE

O.A. Stasiuk, V.O. Kostenko

Key words: sodium nitrate intoxication, sodium fluoride intoxication, nitric oxide, peroxynitrite, salivary glands, superoxide anion radical, lipid peroxidation, antioxidant system.

The role of peroxynitrite scavenger on the level of production of superoxide anion radical, the state of lipid peroxidation, antioxidant defense in submandibular salivary gland tissue under combined sodium nitrate and fluoride excessive intake have been studied in the experiment on 20 white rats.

The study was performed in the series of experiments: the first - intact animals (control series), the second - after combined administration of sodium nitrite (200 mg/kg body weight) and sodium fluoride (10 mg/kg) for 30 days, in the third and fourth – introduction of peroxynitrite scavenger - L-selenomethionine (3 mg/kg, 1 time per week), and uric acid (250 mg/kg 3 times per week) during the 30-day cumulative toxic effect of sodium nitrate and sodium fluoride. We have

found that L-selenomethionine and uric acid introduction in these conditions results in the decrease of superoxide anion radical production (by microsomal and mitochondrial electron transport chain) and lipid peroxidation activity, improving the antioxidant defence and protein synthesis in salivary glands. It has been concluded that free-radical processes disturbances in submandibular salivary gland tissues under binary chronic intoxication with sodium nitrate and sodium fluoride are peroxynitrite-dependent.

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

*Матеріал надійшов до редакції 15.11.2012 р.*