

УДК 612.79-015-092.18-092.9:615.916'175

Хміль Д. О., Міщенко А. В., Костенко В. О.

## РОЛЬ NO-СИНТАЗИ І АРГІНАЗИ У МЕХАНІЗМАХ ОКИСНО-НІТРАТИВНОГО СТРЕСУ В ШКІРІ ЩУРІВ ЗА УМОВ НАДЛИШКОВОГО НАДХОДЖЕННЯ В ОРГАНІЗМ НІТРАТУ НАТРІЮ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

mededition@rambler.ru

У експерименті на 35 білих щурах досліджено вплив інгібіторів NO-синтази (NOS) і аргінази на стан окисних процесів у шкірі щурів за умов 30-денної інтоксикації нітратом натрію. Виявлено відмінності у дії селективних інгібіторів NOS. Пригнічення нейрональної ізоформи (nNOS) за умов експерименту збільшує у тканинах шкіри активність орнітиндекарбоксилази, підвищує у них генерацію супероксидного аніон-радикала (CAP) НАДН-залежним (мітохондріальним) і НАДФН-залежними (мікросомальним і NOS) електронно-транспортними ланцюгами (ЕТЛ), що підтверджує участь цієї ізоформи NOS у регуляції активності ферментів аргіназного шляху метаболізму L-аргініну та обмеженні окисного стресу. Пригнічення індукційної ізоформи (iNOS) за умов експерименту обмежує рівень утворення пероксинітриду в тканинах шкіри, підвищує у них активність ферментів аргіназного шляху метаболізму L-аргініну (аргінази, орнітиндекарбоксилази), зменшує продукцію CAP НАДФН- і НАДН-залежними ЕТЛ, обмежує пероксидне окиснення ліпідів, збільшує антиоксидантний потенціал, що вказує на роль активації iNOS як на найважливіший механізм індукції окисно-нітративного стресу в шкірі. Неселективне інгібування аргінази L-норваліном істотно збільшує активність NOS у тканинах шкіри, що підтверджує наявність реципрокних стосунків між аргіназним і NO-синтазним шляхами метаболізму L-аргініну. За цих умов збільшується генерація CAP НАДФН- і НАДН-залежними ЕТЛ, зменшується активність орнітиндекарбоксилази та супероксиддисмутази, що вказує на участь ферментів аргіназного шляху метаболізму L-аргініну у обмеженні розвитку окисно-нітративного стресу в шкірі.

**Ключові слова:** інтоксикація нітратами; NO-синтаза; аргіназа; окисно-нітративний стрес; шкіра.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота є фрагментом НДР «Роль активних форм кисню, системи оксиду азоту та транскрипційних факторів у механізмах патоло-

гічного системогенезу», № держ. реєстрації 0114U004941.

**Вступ.** Оксид азоту (NO) називають ключовим медіатором у фізіології шкіри, який бере участь у підтримці її бар'єрно-захисних функцій, опосередковує процес ацетилхолін-індукованої вазодилатації, забезпечує норадренергічну трансмісію і електричну провідність [10, 12].

Виявлення протективних ефектів NO щодо шкіри обумовлює створення різних NO-вмісних мазей, кремів, гелей та інших лікарських форм і косметичних засобів [10].

Проте накопичилася достатня кількість даних щодо неоднозначного дії цієї молекули на метаболізм і функції цього органа [3, 7]. Особливо важко прогнозувати ефекти NO на організм при дії на людину і тварин несприятливих екзогенних екологічних чинників.

Показано, що надлишкове утворення NO з екзогенних попередників (нітратів, нітритів) істотно змінює спрямованість фізіологічних ефектів цієї молекули, може призводити до негативних наслідків, що реалізуються через розвиток окисно-нітративного стресу [3, 8]. Так, у динаміці хронічної інтоксикації нітратом натрію в шкірі поряд зі збільшенням утворення NO відмічається гіперпродукція супероксидного аніон-радикала (CAP), що супроводжується активацією процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) і виснаженням антиоксидантного (АО) потенціалу вже на 30 добу експерименту [7].

Нещодавно виявлено, що розвиток окисно-нітративного стресу може бути пов'язаний з порушенням механізму авторегуляції рівня NO в тканинах («цикл оксиду азоту»), що призводить до надмірної активації індукційної NOS (iNOS) і дисфункції аргіназного метаболічного шляху, який конує з NO-синтазним за субстрат – L-аргінін [2, 11].

Проте механізми розвитку окисно-нітративного стресу у тканинах шкіри ссавців, залежні від функціональної активності NOS і аргінази, залишаються нез'ясованими.

**Метою роботи** було вивчення впливу інгібіторів NOS і аргінази на маркери окисно-нітративного стресу в шкірі щурів за умов 30-денної інтоксикації нітратом натрію.

**Матеріали та методи дослідження.** Дослідження були проведені на 35 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180–220 г у 5-ти серіях дослідів: у першій необхідні показники вивчали у інтактних тварин (контрольна серія), у другій – після відтворення 30-денної інтоксикації нітратом натрію, у третій, четвертій і п'ятій – тваринам поряд з призначенням нітрату натрію вводили відповідно селективний інгібітор нейрональної NOS (nNOS) – 7-нітроіндазол (7-NI), селективний інгібітор iNOS – аміногуанідин, та неселективний інгібітор аргінази – L-норвалін.

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Нітрат натрію призначали внутрішньошлунково за допомогою зонда в дозі 200 мг/кг маси тіла у вигляді водного розчину. Використання цієї методики дозволяє відтворити надмірне утворення і депонування NO в шкірі у вигляді парамагнітних комплексів з гемовим і негемовим залізом [3, 7]. Інгібітори NOS і аргінази (всі виробництва фірми «Sigma-Aldrich, Inc.», США) вводили, починаючи з 15-ї доби інтоксикації, у таких дозах: 7-NI – 30 мг/кг (2 рази на тиждень) [1], аміногуанідин – 20 мг/кг (2 рази на тиждень) [1], L-норвалін – 10 мг/кг (через день) [6]. Тварин декапітували під ефірним нарко-

зом. Стандартні зразки шкіри вирізали з області спини.

Оцінювали активність нітрат- та нітритредуктаз [11], а також ферментів окисного (NOS) та неокисного (аргіназа, орнітиндекарбоксилази – ОДК) шляхів метаболізму L-аргініну [9, 11]. Концентрацію пероксинітриту в гомогенаті визначали спектрофотометрично за поглинанням на довжині хвилі 355 нм [11].

Утворення CAP у гомогенаті шкіри оцінювали спектрофотометрично при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм з індукторами у вигляді НАДН і НАДФН для оцінки продукції CAP відповідно НАДН-залежним (мітохондріальним) і НАДФН-залежним (мікросомальним і NOS) електронно-транспортними ланцюгами (ЕТЛ) [4].

Рівень ПОЛ у тканинах оцінювали за утворенням у реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними продуктами забарвленого триметинового комплексу [5]. Стан антиоксидантної (АО) системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час інкубації, а також за активністю АО ферментів – супероксиддисмутази (СОД) та каталази [5].

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

**Результати дослідження та їх обговорення.** Призначення інгібіторів NOS та аргінази за умов надлишкового надходження нітрату натрію у організм щурів істотно не впливає на активність нітрат- і нітратредуктаз у тканинах шкіри (**табл. 1**).

При цьому закономірно зменшується сумарна активність NOS: при введенні 7-NI – на 45,9% ( $p < 0,001$ ), при введенні аміногуанідину – на 72,0% ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з даними другої серії. Вве-

**Таблиця 1** – Вплив інгібіторів NOS і аргінази на показники системи NO та аргіназного шляху метаболізму L-аргініну в тканинах шкіри за умов надлишкового надходження нітрату натрію у організм щурів ( $M \pm m$ ,  $n=35$ )

Показники	Серії дослідів				
	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію (30 діб)			
		Контроль	+ 7-NI	+ аміногуанідин	+ L-норвалін
Активність нітратредуктази, мкмоль /хв. х г білка	12,78±0,65	21,73±0,58*	21,26±0,38*	21,86±0,18 *	21,07±0,54*
Активність нітритредуктази, мкмоль /хв. х г білка	9,56±0,53	16,44±0,60*	16,25±0,30*	16,63±0,27 *	14,53±0,87*
Активність NOS, мкмоль NO <sub>2</sub> /г·хв.	4,67±0,16	9,38±0,54*	5,07±0,26**	2,63±0,73 */**	12,83±0,41 */**
Пероксинітрит, мкмоль/г	0,98±0,03	1,39±0,13*	1,49±0,10*	0,85±0,06 **	1,67±0,05*
Активність аргінази, мкмоль/г·білка	1,94±0,17	1,60±0,13	1,79±0,05	2,16±0,06 **	0,76±0,05 */**
Активність ОДК, нмоль/г·хв.	235,3±11,9	157,4±9,1*	246,2±8,0**	294,7±9,4 */**	102,8±10,1 */**

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

дення L-норваліну, навпаки, підвищує сумарну активність NOS – на 36,8% ( $p < 0,001$ ).

Відомо, що аргіназа конкурує з NOS за субстрат. Пригнічення аргінази закономірно збільшує активність NOS. Афіність останньої для L-аргініну приблизно у 1000 разів більше, ніж значення цього показника для аргінази [14].

Застосування 7-NI і L-норваліну за умов експерименту достовірно не позначається на величині концентрації пероксинітриту в тканинах шкіри, введення аміногуанідину – обмежує вміст цієї сполуки – на 38,8% ( $p < 0,01$ ) у порівнянні з даними другої серії.

При цьому введення 7-NI істотно не впливає на активність аргінази у тканинах шкіри щурів, проте збільшує активність ОДК – на 56,4% ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з даними другої серії. Застосування аміногуанідину підвищує активність аргінази та ОДК – відповідно на 35,0% ( $p < 0,01$ ) та 87,2% ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з даними другої серії.

Призначення L-норваліну за умов експерименту закономірно зменшує активність аргінази та ОДК у тканинах шкіри – відповідно на 52,5% ( $p < 0,001$ ) та 34,7% ( $p < 0,01$ ) у порівнянні з даними другої серії.

Пригнічення ОДК супроводжується порушеннями синтезу поліамінів, які регулюють процеси реплікації та транскрипції ДНК, біосинтезу білків і проліферації клітин [13].

Введення 7-NI за умов експерименту збільшує у тканинах шкіри генерацію САР НАДФН-залежними ЕТЛ – на 21,5% ( $p < 0,001$ ), а мітохондріальним ЕТЛ – на 18,6% ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з даними другої серії (табл. 2).

Застосування аміногуанідину, навпаки, зменшує у тканинах шкіри продукцію САР НАДФН-залежними ЕТЛ – на 14,2% ( $p < 0,01$ ) та мітохондріальним ЕТЛ – на 24,0% ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з даними другої серії.

Введення L-норваліну збільшує у тканинах шкіри генерацію САР НАДФН-залежними ЕТЛ – на 32,6% ( $p < 0,001$ ), мітохондріальним ЕТЛ – на 22,8% ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з даними другої серії.

Введення 7-NI та L-норваліну за умов експерименту не позначається на змінах концентрації ТБК-активних сполук та їхньому прирості за час 1,5-годинної інкубації гомогенату шкіри у прооксидантному буферному розчині у порівнянні з даними другої серії.

Застосування аміногуанідину зменшує у шкірі концентрацію ТБК-активних сполук – відповідно на 37,6% ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з даними другої серії. При цьому на 63,4% ( $p < 0,001$ ) зменшується приріст концентрації ТБК-реактивів за час інкубації, що підкреслює роль iNOS за умов 30-денної нітратної інтоксикації у активації ПОЛ та зниженні АО потенціалу.

Введення 7-NI за умов експерименту істотно не позначається на активності СОД і каталази у тканинах шкіри. Застосування аміногуанідину також істотно не впливає на величину активності СОД, але супроводжується збільшенням активності каталази у тканинах шкіри – у 2,14 рази ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з даними другої серії.

Введення L-норваліну супроводжується зменшенням активності СОД – на 35,7% ( $p < 0,01$ ) у порівнянні з даними другої серії. При цьому активність каталази достовірно не змінюється.

Отримані результати підтверджують конкурентні стосунки між ферментами NO-синтазного й аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну [14]. Проте спрямованість останнього пов'язана з обмеженням ознак окисно-нітративного стресу в тканинах шкіри.

**Таблиця 2** – Вплив інгібіторів NOS і аргінази на показники вільнорадикального окиснення у тканинах шкіри за умов надлишкового надходження нітрату натрію у організм щурів ( $M \pm m$ ,  $n=35$ )

Показники	Серії дослідів				
	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію (30 діб)			
		Контроль	+ 7-NI	+ аміногуанідин	+ L-норвалін
Продукція САР, нмоль/г·с					
НАДФН-залежними ЕТЛ	20,18±0,71	28,75±0,75*	34,92±0,54*/**	24,68±0,62 */**	38,11±1,24 */**
НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ	21,61±0,34	33,92±0,71*	40,23±0,37*/**	25,78±0,76 */**	41,66±0,19 */**
Концентрація ТБК-реактивів, мкмоль/кг	20,88±2,73	46,05±1,81*	48,56±4,07*	28,74±3,38 **	48,28±1,73*
Приріст концентрації ТБК-реактивів, мкмоль/кг	14,53±2,24	30,8±2,37*	23,76±5,80	11,26±2,41 **	34,24±2,11*
Активність СОД, од. акт.	0,28±0,03	0,14±0,01*	0,14±0,02*	0,10±0,01*	0,09±0,01 */**
Активність каталази, мккатал/г	0,14±0,01	0,07±0,01*	0,10±0,01*	0,15±0,01**	0,08±0,01*

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

**Висновки.**

1. Селективне пригнічення nNOS за умов надлишкового надходження нітрату натрію у організм щурів істотно збільшує активність ОДК у тканинах шкіри, підвищує у них генерацію CAP НАДФН- і НАДН-залежними ЕТЛ, що підтверджує участь цієї ізоформи NOS у регуляції активності ферментів аргіназного шляху метаболізму L-аргініну та обмеженні окисного стресу.
2. Селективне пригнічення iNOS за умов експерименту обмежує рівень утворення пероксинітриду в тканинах шкіри, підвищує у них активність ферментів аргіназного шляху метаболізму L-аргініну (аргінази, ОДК), зменшує у тканинах шкіри продукцію CAP НАДФН- і НАДН-залежними ЕТЛ, обмежує ПОЛ, збільшує АО потенціал, що вказує на роль активації цього ізоферменту NOS як на найважливіший механізм індукції окисно-нітративного стресу в шкірі.
3. Неселективне інгібування аргінази L-норваліном за умов надлишкового надходження нітрату на-

трію у організм щурів істотно збільшує активність NOS у тканинах шкіри, що підтверджує наявність реципрокних стосунків між аргіназним і NO-синтазним шляхами метаболізму L-аргініну. За цих умов збільшується генерація CAP НАДФН- і НАДН-залежними ЕТЛ, зменшується активність ОДК та СОД, що вказує на участь ферментів аргіназного шляху метаболізму L-аргініну у обмеженні розвитку окисно-нітративного стресу в шкірі.

**Перспективи подальших досліджень.** Отримані результати вказують на розвиток окисно-нітративного стресу при надлишковому надходженні в організм екзогенного джерела NO. Перспективним є дослідження ризику негативних наслідків при застосуванні NO-вмісних лікарських і косметичних засобів у осіб, що зазнають тривалої дії неорганічних нітросполук (через забруднення довкілля або професійну діяльність).

**Література**

1. Богданов А. В. Механизмы дизрегуляции нитроксидагичной системы в тканях пародонта крыс при избыточном поступлении нитрата и фторида натрия / А. В. Богданов, Ю. М. Гришко, В. А. Костенко // *Wiad Lek.* – 2016. – Vol. 69, № 3 (Pt. 2). – P. 457–461.
2. Костенко В. О. Механізми ауторегуляції утворення оксиду азоту в організмі ссавців та їх порушення при розвитку патологічних процесів / В. О. Костенко, Н. В. Соловйова, О. В. Коваленко [та ін.] // *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії.* – 2011. – Т. 11, № 3. – С. 150–154.
3. 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.
4. 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.
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. Нагорняк І. В. Роль аргінази у механізмах порушень вільнорадикальних процесів та функції 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, № 2. – С. 191–194.
7. Оренчук Е. П. Окислительные процессы в коже в условиях длительного поступления нитрата натрия в организм белых крыс / Е. П. Оренчук, В. А. Костенко // *Світ мед. та біол.* – 2008. – № 3. – С. 78–81.
8. Реутов В. П. Механизм антирадикальной защиты клеток и организма в целом заложен в циклической организации тех метаболических процессов, которые сопряжены с образованием свободных радикалов / В. П. Реутов // *Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції: тези доповідей VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю (5–7 жовтня 2016 р.).* – Харків: Вид-во НФаУ, 2016. – С. 191.
9. Храмов В. А. Простой метод определения активности орнитиндекарбоксилазы в смешанной слюне человека / В. А. Храмов // *Клин. лаборат. диагн.* – 1997. – № 4. – С. 14–15.
10. Adler B. L. Nitric oxide therapy for dermatologic disease / B. L. Adler, A. J. Friedman // *Future Sci OA.* – 2015. – Vol.1, № 1. – Publ. FSO37.
11. Akimov O. Ye. Functioning of nitric oxide cycle in gastric mucosa of rats under excessive combined intake of sodium nitrate and fluoride / O. Ye. Akimov, V. O. Kostenko // *Ukr. Biochem. J.* – 2016. – Vol. 88, № 6. – P. 70–75.
12. Del Rosso J. Q. Spotlight on the Use of Nitric Oxide in Dermatology: What Is It? What Does It Do? Can It Become an Important Addition to the Therapeutic Armamentarium for Skin Disease? / J. Q. Del Rosso, L. H. Kircik // *J. Drugs Dermatol.* – 2017. – Vol. 16, № 1. – P. S4-S10.
13. Moinard C. Polyamines: metabolism and implications in human diseases / C. Moinard, L. Cynober, J. P. de Bandt // *Clin. Nutr.* – 2005. – Vol. 24, № 2. – P. 184–197.
14. Wu G. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease / G. Wu, F. W. Bazer, T. A. Davis [et al.] // *Amino Acids.* – 2009. – Vol. 37, № 1. – P. 153–168.

## References

1. Bogdanov AV, Grishko YuM, Kostenko VA. Mekhanizmy dizregulyatsii nitroksidergichnoy sistemy v tkanyakh parodonta kryis pri izbytochnom postuplenii nitrata i florida natriya. *Wiad Lek.* 2016;69(3(Pt. 2)):457–61.
2. Kostenko VO, Solovyova NV, Kovalenko OV, et al. Mekhanizmy autorehulyatsiyi utvorenniya oksydu azotu v orhanizmi ssavtsiv ta yikh porushennya pry rozvytku patolohichnykh protsesiv. Aktual'ni problemy suchasnoyi medytsyny: *Visn. Ukrayins'koyi med stomatol akademiyi.* 2011;11(3):150–4.
3. Kostenko VO, Kostenko AH, Denysenko SV, et al. Mekhanizmy porushennya okysnykh protsesiv u tkanyakh pry nadlyshkovomu utvorenni oksydu azotu z ekzohennykh poperednykiv. *Klin ta eksp patol.* 2004;3(2(Ch.1)):202–4.
4. Kostenko VO, Tsebrzhyns'kyi OI. Produktsiya superoksydnoho anion-radikala ta oksydu azotu u tkanyani nyrok pislya khirurhichnoho vtruchannya. *Fiziol zhurn.* 2000;46(5):56–62.
5. Berkalo LV, Bobovych OV, Bobrova NO et al. Metody klinichnykh ta eksperymental'nykh doslidzhen' v medytsyni. Za red IP Kaydasheva. *Poltava;* 2003. 320 s.
6. Nahornyak IV, Kostenko VO. Rol' arhinazy u mekhanizmakh porushen' vil'noradykal'nykh protsesiv ta funktsiyi slynykh zaloz shchuriv za umov diyi metylovoho efiru metakrylovoyi kysloty. Aktual'ni problemy suchasnoyi medytsyny: *Visn. Ukrayins'koyi med. stomatol. akademiyi.* 2015;15(2):191–4.
7. Orenchuk YeP, Kostenko VO. Okislitel'nyye protsessy v kozhe v usloviyakh dlitel'nogo postupleniya nitrata natriya v organizm belykh kryis. *Svit med ta biol.* 2008;3:78–81.
8. Reutov VP. Mekhanizm antiradikal'noy zashchity kletok i organizma v tselom zalozhen v tsiklicheskoy organizatsii tekh metabolicheskikh protsessov, kotoryye sopryazheny s obrazovaniyem svobodnykh radikalov. *Patofiziologiya i farmatsiya: shlyakhy intehratsiyi* : tezy dopovidey VII Natsional'noho konhresu patofiziolohiv Ukrayiny z mizhnarodnoyu uchastyu (5–7 zhovtnya 2016 r). *Kharkiv: Vyd-vo NFaU;* 2016:191.
9. Khramov VA. Prostoy metod opredeleniya aktivnosti ornitindekarboksylazy v smeshannoy slyune cheloveka. *Klin laborat diagn.* 1997;4:14–5.
10. Adler BL, Friedman AJ. Nitric oxide therapy for dermatologic disease. *Future Sci OA.* 2015;1(1):Publ. FSO37.
11. Akimov OYe, Kostenko VO. Functioning of nitric oxide cycle in gastric mucosa of rats under excessive combined intake of sodium nitrate and fluoride. *Ukr Biochem J.* 2016;88(6):70–5.
12. Del Rosso JQ, Kircik LH. Spotlight on the Use of Nitric Oxide in Dermatology: What Is It? What Does It Do? Can It Become an Important Addition to the Therapeutic Armamentarium for Skin Disease? *J Drugs Dermatol.* 2017;16(1):S4-S10.
13. Moinard C, Cynober L, de Bandt JP. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr.* 2005;24(2):184–97.
14. Wu G, Bazer FW, Davis TA, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids.* 2009;37(1):153–68.

УДК 612.79-015-092.18-092.9:615.916'175

### РОЛЬ NO-СИНТАЗЫ И АРГИНАЗЫ В МЕХАНИЗМЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-НИТРАТИВНОГО СТРЕССА В КОЖЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ ИЗБЫТОЧНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ В ОРГАНИЗМ НИТРАТА НАТРИЯ

*Хміль Д. А., Мищенко А. В., Костенко В. А.*

**Резюме.** В эксперименте на 35 белых крысах исследовано влияние ингибиторов NO-синтазы (NOS) и аргиназы на маркёры окислительно-нитративного стресса в коже крыс в условиях 30-дневной интоксикации нитратом натрия. Выявлены различия в действии селективных ингибиторов NOS. Угнетение нейрональной изоформы (nNOS) в условиях эксперимента увеличивает в тканях кожи активность орнитиндекарбоксилазы, повышает в них генерацию супероксидного анион-радикала (CAP) НАДФН-зависимой (митохондриальной) и НАДФН-зависимыми (микросомальной и NOS) электронно-транспортными цепями (ЭТЦ), что подтверждает участие этой изоформы NOS в регуляции активности ферментов аргиназного пути метаболизма L-аргинина и ограничении окислительного стресса. Подавление индуцибельной изоформы (iNOS) в условиях эксперимента ограничивает уровень образования пероксинитрита в тканях кожи, повышает в них активность ферментов аргиназного пути метаболизма L-аргинина (аргиназы, орнитиндекарбоксилазы), уменьшает продукцию CAP НАДФН- и НАДФН-зависимыми ЭТЦ, ограничивает перекисное окисление липидов, увеличивает антиоксидантный потенциал, что указывает на роль активации iNOS как на важнейший механизм индукции окислительно-нитративного стресса в коже. Неселективное ингибирование аргиназы L-норвалином существенно увеличивает активность NOS в тканях кожи, что подтверждает наличие реципрокных отношений между аргиназным и NO-синтазным путями метаболизма L-аргинина. В этих условиях увеличивается генерация CAP НАДФН- и НАДФН-зависимыми ЭТЦ, уменьшается активность орнитиндекарбоксилазы и супероксиддисмутазы, что указывает на участие ферментов

аргиназного пути метаболизма L-аргинина в ограничении развития окислительно-нитративного стресса в коже.

**Ключевые слова:** интоксикация нитратами; NO-синтаза; аргиназа; окислительно-нитративный стресс; кожа.

UDC 612.79-015-092.18-092.9:615.916'175

**ROLE OF NO-SYNTASE AND ARGINASE IN MECHANISMS OF OXIDATIVE / NITRATIVE STRESS IN SKIN OF RATS UNDER EXCESSIVE SODIUM NITRATE INTAKE**

*Khmil' D. O., Mishchenko A. V., Kostenko V. O.*

**Abstract.** Nitric oxide (NO) is called a key mediator in the skin physiology. There have been much data on the controversial action of this molecule on metabolism and functioning of the skin. It has shown that excessive NO formation from exogenous precursor substantially changes direction physiological effects of this molecule may lead to negative consequences, including the development of oxidative / nitrate stress.

However, the mechanisms of oxidative / nitrate stress in the skin tissues of mammals, dependent on functional activity of NOS and arginase are still unclear.

This study was aimed at investigating the influence of arginase and NOS inhibitors on oxidative / nitrate stress in the skin of rats under 30-day sodium nitrate intoxication.

The study was conducted on 35 white male Wistar rats weighing 180–220 g in 5 series of experiments. The first series was designed to identify the necessary parameters in intact animals (control series), the second series was to obtain the parameters after 30-day modeling of sodium nitrate intoxication (200 mg / kg / daily); in the third, fourth and fifth series of the experiment test animals, starting with the 15th day of the intoxication, were administered 7-nitroindazole (7-NI, 30 mg / kg, twice a week), a selective inhibitor of neuronal NOS (nNOS), aminoguanidine (20 mg / kg, twice a week), a selective inhibitor of iNOS, and L-norvaline (10 mg / kg every other day), a nonselective arginase inhibitor. The animals were decapitated under ether anesthesia. Standard skin samples were taken from the back.

Spectrophotometry was used to assess the activity of nitrate and nitrite reductases, NOS, arginase, ornithine decarboxylase (ODC), peroxynitrite concentration, superoxide anion radical (SAR) production with inducers as NADH and NADPH, the formation of by-products (TBA-reactants) of lipid peroxidation, the activity of antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) and catalase in the skin homogenate.

There have been differences in the effects produced by NOS selective inhibitors. The inhibition of neuronal isoform (nNOS) under the experimental conditions increases the activity of ODC in skin tissues, enhances their production of superoxide anion radical (SAR) by NADH-dependent (mitochondrial) and NADPH-dependent (microsomal and NOS) electron transport chains (ETCs), confirming the involvement of NOS isoforms in the regulation of the enzyme activity of arginase pathway of L-arginine metabolism and limiting oxidative stress.

Inhibition of inducible isoform (iNOS) under the experimental conditions limits the formation of peroxynitrite in the skin tissues, increases their enzyme activity of arginase pathway of L-arginine metabolism (arginase, ODC), reduces the production of SAR by NADPH- and NADH-dependent ETCs, limits lipid peroxidation, enhances antioxidant capacity, that points out the role of iNOS activation as a key mechanism for the induction of oxidative / nitrate stress in the skin. Nonselective inhibition of arginase by L-norvaline significantly increases NOS activity in the tissues of the skin, demonstrating the reciprocal relationship between arginase and NO-synthase pathways of L-arginine metabolism. Under these conditions there is an increase in the generation of SAR by NADPH- and NADH-dependent ETCs, and the decrease in ODC and superoxide dismutase activity, that indicates role of the enzymes of arginase pathway of L-arginine metabolism in the restriction of oxidative / nitrate stress in the skin.

**Keywords:** nitrate intoxication; NO-synthase; arginase; oxidative / nitrate stress; skin.

Стаття надійшла 28.04.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування