

УДК: [616.33-092.9:615.916'16/.175]:615

О.Е.Акимов^{1}, А.В.Мищенко¹, В.А.Костенко¹*

Украинская медицинская стоматологическая академия,
г. Полтава, Украина

ГЕНЕРАЦИЯ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ И ПРОЦЕССЫ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА КРЫС В УСЛОВИЯХ СОЧЕТАННОЙ НИТРАТНОЙ И ФТОРИДНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

АННОТАЦИЯ

Исследование проведено на 52 половозрелых крысах линии Вистар в течение 30 дней с целью изучения влияния сочетанной нитратной и фторидной интоксикации на генерацию супероксидного анион-радикала ($\bullet\text{O}_2^-$), функционирование ферментативных антиоксидантных систем, интегральный показатель антиоксидантной защиты и показатели пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в слизистой оболочке желудка крыс. Анализ результатов позволил установить синергическое влияние фторидной и нитратной интоксикации на процессы ПОЛ. Влияние на генерацию $\bullet\text{O}_2^-$ и антиоксидантные системы имеет более сложное взаимодействие.

Ключевые слова: супероксидный анион-радикал, нанодисперсный кремнезем, нитрат натрия, фторид натрия, супероксиддисмутаза, каталаза, ТБК-реактанты.

Введение. В некоторых регионах Полтавской области существует проблема повышенного содержания фторидов в питьевой воде (Карловский, Машевский, Шишацкий районы) [3]. Схожая ситуация наблюдается в южных районах Республики Казахстан (г. Алматы и некоторые города Акмолинской области) [5]. В связи с повышенным использованием органических и неорганических нитратов в сельском хозяйстве их поступление в организм человека в последние годы также повысилось [6]. Это создает условия, при которых возможно одновременное действие на организм человека двух этих патогенов. Нитрат натрия способен ингибировать избыточную генерацию супероксидного анион-радикала путем угнетения экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS, E.C. 1.14.13.39) [8, 13]. Фторид натрия способен индуцировать выработку супероксида [9-12]. Фтор среди прочего способен ингибировать активность ферментативных антиоксидантных систем организма, тем самым усиливая оксидационный стресс [9, 11]. Также есть данные о том, что избыточное количество нитратов может вызывать усиление пероксидного окисления ли-

пидов (ПОЛ) и снижение ферментативных антиоксидантных систем [8]. Поскольку эти вещества в основном поступают в организм *per os* (с водой и продуктами питания), то система пищеварения первой испытывает их негативное влияние. Одновременное воздействие двух этих патогенов на слизистую оболочку желудка является недостаточно изученным.

Цель исследования – изучение влияния сочетанной нитратной и фторидной интоксикации на генерацию супероксидного анион-радикала ($\bullet\text{O}_2^-$), функционирование ферментативных антиоксидантных систем, интегральный показатель антиоксидантной защиты и показатели ПОЛ в слизистой оболочке желудка крыс.

Материалы и методы. Опыты проведены на 52 половозрелых крысах линии Wistar. Хроническое избыточное поступление нитратов и фторидов и их сочетанное поступление моделировали путем введения нитратов через желудочный зонд из расчета 500 мг/кг, фторидов – из расчета 10 мг/кг. Нитраты и фториды вводили в течение 30 дней. Все манипуляции проводили согласно «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для иссле-

Таблица 1

Генерация супероксидного анион-радикала, состояние процессов ПОЛ и активность антиоксидантных систем в слизистой оболочке желудка крыс, М±m

	Интактные животные, n=10	Фторидная интоксикация, 10 мг/кг, n=13	Нитратная интоксикация, 500 мг/кг, n=14	Сочетанная интоксикация, n=15
Генерация •O ₂ ⁻ , нмоль/г-с				
Базовая	0,4±0,01	0,61±0,02*	0,82±0,02* ^{***}	1,18±0,01 ^{****#}
НАДФН-зависимыеЭТЦ	7,17±0,16	11,4±0,09*	10,0±0,16* ^{***}	8,04±0,22 ^{****#}
НАДН-зависимыеЭТЦ	4,9±0,23	5,32±0,08*	9,4±0,12* ^{***}	8,15±0,22 ^{****#}
НАДФН-оксидаза лейкоцитов	1,33±0,03	2,05±0,02*	1,26±0,03* ^{***}	1,76±0,02 ^{****#}
Содержание ТБК-реактантов, мкмоль				
До инкубации	6,1±0,25	17,35±0,44*	8,93±0,2* ^{***}	13,65±0,11 ^{****#}
Послеинкубации	18,2±0,32	32,77±0,59*	25,57±0,24* ^{***}	34,18±1,38 ^{****#}
Прирост	12,09±0,29	15,42±0,88*	16,64±0,23*	20,53±1,33 ^{****#}
Активность SOD, у.е.	0,73±0,14	0,26±0,05*	1,16±0,1* ^{***}	0,33±0,02 [#]
Активность САТ, нкат/г	204±4	356±32*	145±15* ^{***}	136±10 ^{****#}

* Данные статистически значимо отличаются от интактной группы с $p < 0,05$.

** Данные статистически значимо отличаются от фторидной интоксикации с $p < 0,05$.

*** Данные статистически значимо отличаются от фторидной интоксикации с $p < 0,05$.

Данные статистически значимо отличаются от фторидной интоксикации с $p < 0,05$.

довательских и других научных целей». Животные были разделены на 4 группы:

- первая – интактные животные (n=10);
- вторая – группа фторидной интоксикации (n=13);
- третья – группа нитратной интоксикации (n=14);
- четвертая – группа с сочетанной интоксикацией (n=15).

Продукцию супероксидного анион-радикала (•O₂⁻) исследовали модифицированным спектрофотометрическим методом при проведении теста с нитросиним тетразолием [2]. Для оценки его генерации НАДФН-зависимыми (микросомальными) электронно-транспортными цепями (ЭТЦ) и от NO-синтазы, НАДН-зависимым (митохондриальным) ЭТЦ и НАДФН-оксидазы лейкоцитов вводили индукторы в виде НАДН, НАДФН и бактериального липополисахарида (пирогенал). Модификация метода заключалась в том, что при оценке индукции пирогеналом тритон Х-100 вводился после 30-минутной инкубации. Это позволяет сохранить мембраны лейкоцитов неповрежденными во время инкубации, а после неё облегчает выход •O₂⁻ из лейкоцитов. Таким образом, точность оценки индукции пирогеналом повышается.

О показателях ПОЛ судили по количеству

веществ, образующихся в реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактантов) [7] и их приростом после инкубации в железо-аскорбатном буферном растворе. Определение активности супероксиддисмутазы (SOD, Е.С.1.15.1.1.) проводили по определению ингибирования автоокисления адреналина в щелочной среде [4], каталазы (САТ, Е.С.1.11.1.6.) – по убыванию содержания перекиси водорода в присутствии пробы [1]. Спектрофотометрические исследования проводились на фотоэлектрокалориметре «PM-2111 Solar» (Беларусь). Результаты подвергались статистическому анализу методом ANOVA, с последующим анализом по Геймсу – Ховелу с поправкой по Данн – Сидаку. Статистическая обработка проводилась с помощью программы Microsoft Excel и расширения Real Statistic.

Результаты. Изолированная фторидная интоксикация увеличивает базовую генерацию на 52,5 %, микросомальными ЭТЦ и от NO-синтазы (NOS) – на 59 %, митохондриальным ЭТЦ на 8,6 %, от лейкоцитов ткани – на 54,1 %. Нитратная интоксикация показала другую динамику: базовая генерация •O₂⁻ увеличена на 105 %, микросомальными ЭТЦ и от NO-синтазы – на 39,5 %, митохондриальным ЭТЦ – на 91,8 %, от лейкоцитов ткани генерация уменьшилась – на 5,3 %. Хотя нитраты и

фториды имеют тенденцию к усилению генерации $\bullet\text{O}_2^-$ митохондриальным ЭТЦ, нитраты увеличивают генерацию на 76,69 %, относительно фторидной интоксикации, что объясняется влиянием нитратов на ЭТЦ митохондрий [10]. Генерация $\bullet\text{O}_2^-$ микросомальным ЭТЦ и от NOS также имеет тенденцию к увеличению относительно интактной группы, однако фториды на 14 % сильнее индуцируют генерацию $\bullet\text{O}_2^-$ микросомальным ЭТЦ и от NOS, что связано с активацией ионами фтора различных изоформ NOS [10]. Влияние на НАДФН-оксидазу лейкоцитов носит разнонаправленный характер, что может быть связано с ингибирующим эффектом нитратов на iNOS [10, 13].

Сочетанное избыточное поступление нитратов и фторидов увеличивает базовую генерацию $\bullet\text{O}_2^-$ на 93 %, микросомальными ЭТЦ и от NO-синтазы – на 12 %, НАДН митохондриальным ЭТЦ – на 66 %, от лейкоцитов ткани – на 33 %. Таким образом, можно сделать вывод об синергическом эффекте нитратов и фторидов на базовую генерацию $\bullet\text{O}_2^-$. Сочетанное влияние фторидов и нитратов на микросомальные ЭТЦ оказывает выраженный антагонизм этих факторов: снижение генерации $\bullet\text{O}_2^-$ на 29,47 % относительно фторидной интоксикации и на 19,6 % относительно нитратной.

Активность SOD при изолированной фторидной интоксикации снижается на 64,38 %, САТ повышается на 78,92 %. При нитратной интоксикации SOD повышается на 58,9 %, САТ – сни-

жается на 28,9 2 %. При сочетанной патологии активность SOD снижается на 54,79 %, САТ – снижается на 33,33 %. При сочетанном введении нитратов и фторидов достоверных различий в активности SOD при сравнении с фторидной группой не наблюдается. В ходе анализа активности САТ достоверных различий между нитратной и сочетанной интоксикациями также не обнаружено.

При анализе количества ТБК-реактантов примечательна тенденция к увеличению их содержания до инкубации как при фтористой интоксикации (на 184 %), так и при нитратной (на 46,39 %). Сочетанная интоксикация повышает содержание ТБК-реактантов на 124 %. Прирост ТБК-реактантов при сочетанной интоксикации увеличивается на 33,1 % при сравнении с фторидной, и на 23,38 % – при сравнении с нитратными интоксикациями. Это позволяет сделать заключение о синергическом угнетающем эффекте нитратной и фторидной интоксикации на ферментативную антиоксидантную систему.

Выводы

Сочетанная нитратная и фторидная интоксикация оказывает синергический эффект на базовую генерацию $\bullet\text{O}_2^-$ и прирост ТБК-реактантов. Стимулированные генерации от микросомальных и митохондриального ЭТЦ имеют антагонистическую динамику. Ферментативные же антиоксидантные системы показали определенную тропность к ионам фтора (преимущественно САТ) и нитрат-ионам (SOD).

ЛИТЕРАТУРА

- 1 *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г.* Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
- 2 *Костенко В.О., Цебржинський О.І.* Продукція супероксидного аніон-радикала та оксиду азоту у тканині нирок після хірургічного втручання // Фізіолог. журн. – 2000. – Т. 46, № 5. – С. 56-62.
- 3 *Назаренко Е.А., Нікозять Ю.Б., Іващенко О.Д.* Проблеми забруднення фторидами ґрунтів і вод геохімічної провінції (на прикладі Полтавської області) // Екологічна безпека. – 2014. – № 1. – С. 59-63.
- 4 Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / [Л.В.Беркало, О.В.Бобович, Н.О.Боброва та ед.] // під ед. І.П.Кайдашев. – Полтава: Полімет, 2003. – 96-99 с.
- 5 *Серикбаева А.К.* Качество природных вод Республики Казахстан / А.К.Серикбаева, Л.М.Сагаева, А.М.Азимов // Междунар. науч. ин-т «Educatio». – 2015. – № 2 (9). – С. 21-23.
- 6 *Смоляр В.І.* Нітрати, нітрити та нітрозозаміни у харчових продуктах і раціонах / В.І.Смоляр, О.І.Циганенко, Г.І.Петрашенко // Проблеми харчування. – 2007. – № 3. – С. 35-44.
- 7 *Стальная И.Д.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.

8 *Bouaziz-Ketata H.* Nitrate-induced Biochemical and Histopathological Changes in the Liver of Rats: Ameliorative Effect of *Hyparrhenia hirta* / H.Bouaziz-Ketata, G.B.Salah, H.B.Salah [et al.] // *Biomed Environ Sci.* – 2014. – Vol. 27 (9). – P. 695-706.

9 *Fina B.L., Lombarte M., Rigalli J.P.* et al. Fluoride increases superoxide production and impairs the respiratory chain in ROS 17/2.8 osteoblastic cells // *PLOS ONE.* – 2014. – Vol. 9. – Is. 6. – P. 1-6.

10 *Romero-Puertas M.C., Sandalio L.M.* Nitric oxide level is self-regulating and also regulates its ROS Partners // *Front. Plant. Sci.* – 2016. – Vol. 7. – Is. 316. – P. 1-6.

11 *Shivarayaschankara Y.M., Shivashankara A.R., Bhat P.G.* et al. Effect of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant systems in rats / Y.M.Shivarayaschankara // *Fluoride.* – 2001. – Vol. 34. – P. 108-113.

12 *Shushua X., Ziyou L., Ling Y.* et al. A Role of Fluoride on Free Radical Generation and Oxidative Stress in BV-2 Microglia Cells // *Mediators Inflamm.* – 2012. – Vol. 13. – Art. 102954. – P. 1-8.

13 *Yang T., Pelleli M., Zollbrecht C.* et al. Inorganic nitrite attenuates NADPH oxidase-derived superoxide generation in activated macrophages via a nitric oxide-dependent mechanism // *Free Radic. Biol. Med.* – 2015. – Vol. 83. – P. 159-166.

ТҮЙІН

Зерттеу супероксидті анион-радикал ($\bullet\text{O}_2^-$) таралуына нитратты және фторидті үйлескен улану әсерін зерттеу, ферментативті антиоксидантты жүйелердің қызмет етуін, антиоксидантты қорғауды интегралды көрсеткіші мен егеуқұйрықтың асқазанындағы шырышты қабаттың липидтердің пероксидтті қышқылдану ($\text{ЛП}\bullet$) көрсеткіштерін зерттеу мақсатында 30 күн бойы Вистар тұқымының жыныс мүшелері жетілген 52 егеуқұйрықтарына зерттеу жүргізілген. Нәтижелерді талдау $\text{ЛП}\bullet$ процестеріне фторидті және нитратты уланудың синергиялық ықпалын анықтауға мүмкіндік берді. $\bullet\text{O}_2^-$ және антиоксидантты жүйенің таралуына әсер ету күрделі өзара әрекетке ие.

Негізгі сөздер: супероксидті анион-радикал, нано дисперсті кремнезем, натрий нитраты, натрий фториді, супероксиддисмутаза, каталаза, ТБК-реактанттар.

SUMMARY

The study was conducted on 52 adult Wistar rats for 30 days to examine the effect of combined nitrate and fluoride intoxication on the generation of superoxide anion radical ($\bullet\text{O}_2^-$), the functioning of enzymatic antioxidant systems, integrated indicator of antioxidant protection and indicators of lipid peroxidation (LPO) in rat gastric mucosa. Analysis of the results allowed us to establish a synergistic effect of fluoride and nitrate toxicity on processes of lipid peroxidation. The impact on the generation of $\bullet\text{O}_2^-$ and antioxidant system has a complex interaction.

Key words: superoxide anion-radical, sodium nitrate, sodium fluoride, superoxide dismutase, catalase, TBA-reactants.