

О. Е. Акимов, А. В. Мищенко,
В. А. Костенко

ВЛИЯНИЕ СУСПЕНЗИИ НАНОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ЦИКЛА ОКСИДА АЗОТА В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА КРЫС ПРИ СОЧЕТАННОЙ НИТРАТНОЙ И ФТОРИДНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
«Украинская медицинская стоматологическая академия»,
Украина, г. Полтава

Исследование проведено на 35 крысах линии Вистар в течение 30 дней с целью изучения влияния суспензии нанодисперсного кремнезема, которая используется в качестве энтеросорбента, на функционирование цикла оксида азота в слизистой оболочке желудка крыс в условиях сочетанной фторидной и нитратной интоксикации. Для оценки функционирования цикла оксида азота измерялась общая активность NO-синтаз, аргиназ, нитрат-нитрит-редуктаз, определялось содержание нитритов и пероксинитрита. Установлено, что суспензия нанодисперсного кремнезёма снижает активность NO-синтаз на 13,8 %, нитрит-редуктаз на 34,7 %, нитрат-редуктаз на 35,3 %. Общая аргиназная активность снижается на 38,6 %. Таким образом, суспензия нанодисперсного кремнезёма показала свою эффективность в коррекции изменений в функционировании цикла оксида азота при сочетанной нитратно-фторидной интоксикации.

Ключевые слова: нитрат-редуктаза, аргиназа, нитрит-редуктаза, NO-синтаза.

O. Ye. Akimov, A. V. Mischenko, V. O. Kostenko

INFLUENCE OF NANOSIZED SILICA ON FUNCTION OF NO-CYCLE IN RAT'S GASTRIC MUCOSA UNDER CHRONIC COMBINED NITRATE AND FLUORIDE INTOXICATION

The research was performed on 35 Wistar rats for 30 days to examine the effect nanosized silica suspension, which was used as enterosorbent, on the functioning of nitric oxide cycle in rat's gastric mucosa under combined nitrate and fluoride intoxication. To assess the performance of the nitric oxide cycle total activities of NO-synthases, arginases, nitrate-nitrite reductases were determined, the concentration of nitrite and peroxy nitrite was also measured. It has been established that the suspension of nanosized silica reduces the total NO-synthases activity by 13.8 %, the nitrite reductases by 34.7 %, the nitrate reductases by 35.3 %. Total arginases activity was reduced by 38.6 %. Thus, the suspension of nanosized silica proved to be effective in the correction of changes in the functioning of nitric oxide cycle under combined nitrate-fluoride intoxication.

Key words: *nitrate reductase, arginase, nitrite reductase, NO-synthase.*

Одной из регуляторных биомолекул нашего организма является оксид азота ($\cdot\text{NO}$), он образуется из L-аргинина при помощи группы ферментов, называемых NO-синтазами (NOS, EC 1.14.13.39). Влияние NO на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта неоднозначно. С одной стороны, NO как биологический регулятор, оказывает защитное действие на слизистую оболочку желудка, стимулируя секрецию бикарбонатов и угнетая интерлейкин-2-опосредованную продукцию соляной кислоты. В последнее время препараты-донаторы NO показали свою эффективность, как средства профилактики пептических язв, вызванных введением нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) [3]. Однако, способность NO в избыточных количествах образовывать нитрозильные комплексы с железом может лежать в основе язвенообразного эффекта, поскольку снижается активность железосодержащих ферментов, участвующих в энергетическом метаболизме. В условиях избыточной генерации NO вероятность его взаимодействия с активными формами кислорода, а именно с супероксидным анион-радикалом резко возрастает, что приводит к образованию пероксинитрита. Следует отметить, что NOS – не единственный источник продукции NO в организме млекопитающих. Более древним механизмом, способным обеспечить продукцию NO является нитрат-нитритредуктазная система. Она обеспечивает восстановление NO из неорганических и органических нитратов. Ситуация избыточной активации этой системы возможна в связи с поступлением большого количества нитратов в организм человека и животных с питьевой водой, продуктами питания, лекарственными средствами.

В некоторых регионах Европы отмечается повышенное содержание фтора в питьевой воде [2]. Для республики Беларусь характерно низкое содержание фтора в воде. Однако при производстве суперфосфатов для агрохимии, при получении алюминия методом электролиза в почву могут попадать отходы, содержащие фториды, последние через грунтовые воды могут поступать в источники питьевой воды. Фтор является ингибитором активности аргиназ (ARG, EC 3.5.3.1.), которые конкурируют с NOS за субстрат. Конечным продуктом аргиназного расщепления L-аргинина являются полиамины (путресцин, спермидин), которые играют важную роль в регенерации тканей.

Таким образом, возможно алиментарное попадание в организм двух веществ, влияющих на цикл NO. С целью профилактики и коррекции изменений, вызванных избыточной нагрузкой на организм нитратами и фторидими, целесообразной может быть их элиминация с помощью энтеросорбентов.

Целью данного исследования является изучение влияния суспензии нанодисперсного кремнезема, которая используется в качестве энтеросорбента, на функционирование цикла оксида азота в слизистой оболочке желудка крыс в условиях сочетанной фторидной и нитратной интоксикации.

Материалы и методы

Эксперимент был проведен на 35 белых крысах линии Вистар. Хроническое избыточное сочетанное поступление нитратов и фторидов моделировали путем введения нитратов через желудочный зонд из расчета 500 мг/кг, фторидов из расчета 10 мг/кг. Нитраты и фториды

■ Оригинальные научные публикации

вводили в течение 30 дней. Суспензия нанодисперсного кремнезёма 5 %, содержащая 0,5 % полиэтиленоксида-400 вводилась из расчета 100 мг/кг действующего вещества. Все манипуляции проводились согласно «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и других научных целей». Животные были разделены на три группы: интактная – 10 животных; группа хронической нитратной и фторидной интоксикации – 15 животных; группа животных, которым вводили суспензию нанодисперсного кремнезёма на фоне моделирования хронической интоксикации, 10 животных. Вывод животных из эксперимента осуществлялся под тиопенталовым наркозом. Биохимические исследования проводились в 10 % гомогенате слизистой оболочки желудка.

Общую NO-синтазную активность определяли по приросту нитритов после инкубации в 0,2 М трис-буферном растворе (pH = 7,4), содержащем 0,3 мл 320 мМ раствора L-аргинина и 0,1 мл 1 мМ раствора НАДФН. Концентрацию нитритов определяли с помощью реактива Грисса [1].

Общую аргиназную активность определяли по приросту L-орнитина после 20 часовой инкубации в 0,2 М фосфатном буферном растворе (pH = 7,0), содержащем 0,3 мл 24 мМ раствора L-аргинина [1].

Для оценки общей нитрат-нитритредуктазной активности в качестве индукторов использовались 10 мМ растворы нитрата и нитрита натрия. В качестве донора электронов для этих систем использовали 1 мг/л раствор НАДН. Для неферментативного восстановления нитратов в нитриты использовался раствор сернокислого гидразина. Определение выполняли следующим образом: брались четыре аликвоты по 0,1 мл 10 % гомогената слизистой оболочки желудка крыс, в каждую добавлялось по 1 мл 10 мМ раствора нитрата и нитрита натрия и по 1 мл 0,2 М фосфатного буферного раствора (pH = 7,0). В аликвоту 1 добавлялось 0,1 мл восстановителя и 1 мл воды. После 10 минутной инкубации при $t = 37^\circ\text{C}$ определяли содержание нитритов (C_1). В аликвоту 2 не добавлялся восстановитель, а сразу определялось содержание нитритов (C_2). В аликвоты 3 и 4 добавлялось по 0,1 мл 1 мг/мл раствора НАДН, после чего они инкубировались 60 минут при $t = 37^\circ\text{C}$. После инкубации, в аликвоту 3 добавлялось 0,1 мл восстановителя и 1 мл воды. После 10 минутной инкубации при $t = 37^\circ\text{C}$ определяли содержание нитритов (C_3). В аликвоту 4 не добавлялся восстановитель,

а сразу, после инкубации, определялось содержание нитритов (C_4). Расчёт активности проводили по формулам:

$$R_1 = 1000 \cdot ((C_2 - C_1) - (C_3 - C_4)) / (60 \cdot N),$$

$$R_2 = 1000 \cdot (C_2 - (C_4 - (X - Y))) / (60 \cdot N),$$

при $X = (C_2 - C_1)$, $Y = (C_3 - C_4)$,

где R_1 – общая активность нитратредуктаз мкмоль/мин·г белка; R_2 – общая активность нитритредуктаз мкмоль/мин·г белка; N – общее количество белка г/л; 60 – время инкубации в минутах; 1000 – коэффициент пересчёта на л гомогената.

Общее количество пероксинитритов щелочных металлов содержащихся в пробе определяли по восстановлению атомарного йода из KI в водной среде в присутствии 0,2 М фосфатного буферного раствора (pH = 7,0). Для этого к 0,1 мл гомогената добавляли 3,9 мл фосфатного буфера и 1 мл 5 % водного раствора KI, далее пробу тщательно перемешивали. Через 1 минуту 1 мл верхнего слоя фотометрировали в кювете с длиной оптического пути 1 см на длине волны 355 нм. Расчёт содержания пероксинитритного аниона проводили по формуле $C = 20 \cdot A$ мкмоль/г, где A – поглощение пробы на длине волны 355 нм. 20 – коэффициент пересчёта, который учитывает молярную экстинкцию атомарного йода, разведение пробы в ходе анализа, вес пробы в граммах и длину оптического пути. Поскольку в организме животных и человека очевидным источником пероксинитритов щелочных металлов является пероксинитритный анион, который образуется в реакции $\cdot\text{NO}$ с супероксидным анион-радикалом ($\cdot\text{O}_2^-$), то определение общего содержания пероксинитритов щелочных металлов (пероксинитритного пула) отражает нагрузку на организм генерацией активных форм азота.

Определение количества общего белка проводили биуретовым методом. Спектрофотометрия проводилась на спектрофотометре Ulab 101. Данные подавались статистическому анализу методом ANOVA, с последующим сравнением по парам по t-критерию Стьюдента (при нормальном распределении признака) или по тесту Манна-Уитни (при распределении отличном от нормального).

Результаты и обсуждение

Анализ результатов показал, что сочетанная интоксикация повышает общую NO-синтазную активность на 18,9 %, относительно интактных животных, что может быть связано с активацией

Таблица. Влияние суспензии нанодисперсного кремнезёма на цикл оксида азота в условиях сочетанной нитратно-фторидной интоксикации

	NOS, мкмоль/мин-г белка	ARG, мкмоль/мин-г белка	Нитрит-редуктазы, мкмоль/мин-г белка	Нитрат-редуктазы, мкмоль/мин-г белка	Нитриты, нмоль/г	Пероксинитрит, мкмоль/г
Интактные, n = 10	6,51 ± 0,41	2,07 ± 0,08	4,32 ± 0,69	5,98 ± 0,74	11,56 ± 0,51	0,88 ± 0,06
Сочетанная интоксикация, n = 15	7,74 ± 0,27*	3,34 ± 0,08*	11,3 ± 0,48*	10,27 ± 0,63*	18,9 ± 0,8*	1,48 ± 0,059*
Суспензия нанодисперсного кремнезёма, n = 10	6,67 ± 0,41**	2,05 ± 0,03**	7,38 ± 0,42**	6,64 ± 0,41**	7,59 ± 0,68**	1,22 ± 0,045**

Примечание:

* – данные статистически значимо отличаются от интактных животных с $p < 0,05$.

** – данные статистически значимо отличаются от группы сочетанной интоксикации с $p < 0,05$.

индуцибельных форм NOS. При введении суспензии нанодисперсного кремнезёма общая активность NOS снижается на 13,8 %, относительно сочетанной интоксикации. Что может быть связано с уменьшением индуцирующего действия фторидов на NOS.

Фтор считается модельным ингибитором аргиназ, однако при сочетанной нитратно-фторидной интоксикации активность аргиназ возросла на 61,4 %, относительно интактных животных, что указывает на определенный антагонизм эффектов нитратов и фторидов при одновременном воздействии на аргиназы. Известно, что конечными продуктами аргиназного пути метаболизма L-аргинина являются полиамины, усиливающие регенераторный потенциал тканей, в тоже время появились свидетельства о негативном влиянии аргиназ. В частности, есть информация об участии аргиназ в усилении процессов генерации активных форм кислорода (супероксидного анион-радикала), и их способности ингибировать эндотелиальную (но не индуцибельную) изоформу NOS [4–6]. Применение в этих условиях суспензии нанодисперсного кремнезёма снижает активность аргиназ на 38,6 %, нормализуя функционирование этого пути метаболизма L-аргинина.

Нитратредуцирующая активность в условиях сочетанной интоксикации возрастает на 71,7 % при сравнении с интактными животными; нитритредуцирующее звено увеличивает свою активность на 162 %. Данные изменения могут быть объяснены субстратной индукцией, которую обеспечивает нитратная составляющая интоксикации, с одной стороны, и гипоксией, вызываемой фторидной составляющей. Введение суспензии нанодисперсного кремнезёма снижает активность нитратредуктаз на 35,3 %, нитритредуктаз на 34,7 %.

Нитриты, являясь продуктом деятельности нитратредуктазного звена цикла оксида азота, с одной стороны, и продуктами прямого окисления NO кислородом, но не супероксидным анион-радикалом, могут вступать в реакции нитрозилирования белков и нуклеиновых кислот. При сочетанной интоксикации содержание нитритов в слизистой оболочке желудка крыс возрастает на 63,5 %. Использование суспензии нанодисперсного кремнезёма снижает содержание нитритов на 59,8 %, что может быть объяснено активной сорбцией нитратной составляющей сочетанной интоксикации.

Сочетанная интоксикация увеличивает пероксинитритный пул на 68,2 %, что обеспечивается усилением активности NOS и нитрат-нитритредуктазного звена, как донаторов NO, и усилением генерации $\cdot O_2^-$ фторидной составляющей и аргиназами [4, 6]. Нанодисперсный кремнезём снижает пероксинитритный пул на 17,6 %, относительно сочетанной интоксикации. Данное снижение объяснимо снижением продукции NO от NOS и нитрат-нитритредуктазного звена. Снижение активности аргиназ также приводит к уменьшению продукции $\cdot O_2^-$ аргиназоопосредованным путем [4].

Таким образом, суспензия нанодисперсного кремнезёма снижает NOS зависимую и нитрат-нитритредуктазную излишнюю продукцию NO, нормализует деятельность аргиназ и снижает содержание нитритов и пероксинитрита в слизистой оболочке желудка крыс в условиях сочетанной нитратной и фторидной интоксикации. Таким образом, суспензия нанодисперсного кремнезёма показала свою эффективность в коррекции изменений в функционировании цикла оксида азота при сочетанной нитратно-фторидной интоксикации.

❑ Оригинальные научные публикации

Литература

1. Акімов, О. Є. Функціонування аргіназного та NO-синтазного шляху метаболізму L-аргініну в крові щурів за умов надлишкового надходження нітрату та фториду натрію та застосування суспензії нанодисперсного кремнезему / О. Є. Акімов, І. О. Ковальова, В. О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2016. – Т. 16, № 1. – С. 169–173.

2. Жовинский, Э. Я. Прикладное значение геохимии фтора / Э. Я. Жовинский, Н. О. Крюченко // Пошукова та екологічна геохімія. – 2007. – № 1. – С. 3–13.

3. Jansson, E. A. Protection from nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced gastric ulcers by dietary nitrate / E. A. Jansson, J. Petersson, C. Reinders [et al.] // Free Radic Biol Med. – 2007. – № 42(4). – P. 510–518.

4. Jeyabalan, G. Arginase blockade protects against hepatic damage in warm ischemia-reperfusion / G. Jeyabalan, J. R. Klune, A. Nakao [et al.] // Nitric Oxide: Biology and Chemistry. – 2008. – Vol. 19, № 1. – P. 29–35.

5. Ryoo, S. Oxidized lowdensity lipoprotein-dependent endothelial arginase II activation contributes to impaired nitric oxide signaling / S. Ryoo, C. A. Lemmon, K. G. Soucy [et al.] // Circulation Research. – 2006. – Vol. 99, № 9. – P. 951–960.

6. Yan, X. Sodium Fluoride Induces Apoptosis in H9c2 Cardiomyocytes by Altering Mitochondrial Membrane Potential and Intracellular ROS Level / X. Yan, X. Yang, X. Hao [et al.] // Biol Trace Elem Res. – 2015. – Vol. 166, № 2. – P. 210–215.

Поступила 22.09.2016 г.