

IMPULSE ACTIVATION OF ANTIOXIDATION PROTECTION OF CALF IN EARLY POSTNATAL ONTOGENESIS

Akhtyrskiy A.V., Shapovalov S.O.; Institute of animal science of UAAS

Ionov I.A., Grigoreva A.S., Konahovich N.F., Buharina M.G., Institute of pharmacology and toxicology AMS of Ukraine.

This article presents the test data on 'Biotam' preparation impact on the main processes of lipid peroxidation in calves blood by oral dosing. By authors was showed reliable increase of peroxide resistance of erythrocytes in experimental group, increase of SOD activity on the 24,7 %, decrease of catalase activity on the 18,9 % and decrease of content of MDA in blood serum on the 15,9 %. Introduction of "Biotam" insignificantly decreasing content of reduced glutathione.

Key words: SOD, coordination compounds, microelements, DC, MDA, PRE, APO, LP.

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

НО-ЗАЛЕЖНІ ЗМІНИ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ОКИСНЮВАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У ШКІРІ ТВАРИН ЗА УМОВ ТРИВАЛОГО НАДХОДЖЕННЯ В ОРГАНІЗМ НІТРАТУ НАТРІЮ

Рецензент: канд. с.-г. наук, д.-тор філос. за фахом «фізіологія людини та тварин» Денисенко М.В.

О.П. Оренчук, В.О. Костенко

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

В експерименті на 40 білих щурах виявлено, що в динаміці хронічної інтоксикації нітратом натрію в шкірі спостерігається прогресуюче збільшення продукції оксиду азоту і супероксидного аніон-радикала. Основними джерелами останнього є мітохондріальний і мікосомальний електронно-транспортні ланцюги. Продукція супероксидного аніон-радикала НАДФН-оксидазою лейкоцитів у тканинах шкіри білих щурів обмежена часовим проміжком (на 14-30 добу). Хронічна інтоксикація нітратом натрію сприяє істотній активації процесів вільнорадикального пероксидного окиснення ліпідів і виснаженню антиоксидантного потенціалу в шкірі щурів уже на 30 добу інтоксикації. Зміна активності антиоксидантних ферментів у тканинах шкіри білих щурів носить фазний характер. На 14 добу інтоксикації активність супероксиддисмутази та каталази зростає, а надалі знижується (каталази – на 30 добу, супероксиддисмутази – після 3-місячного введення нітрату натрію).

Ключові слова: оксид азоту, нітрати, окислювальний метаболізм, супероксидний аніон-радикал, шкіра.

Широке використання нітратів і нітритів у промисловості та сільському господарстві нерідко обумовлює надходження цих сполук в організм тварин і людини у концентраціях, що значно перевищують гранично припустимі [1]. Типовим механізмом дії нітрат-іонів вважається їхнє відновлення до нітрит-іонів, а тих, у свою чергу, до оксиду азоту (NO) [2-3].

В останні роки повідомляється про роль NO у фізіологічній регуляції функцій шкіри [4-5]. Оксид азоту і NO-синтази виявлені у кератиноцитах, меланоцитах, клітинах Лангерганса, фібробластах і ендотеліоцитах [4]. На поверхні шкіри NO здатний утворюватися неферментативно внаслідок ацидифікації чи шляхом



фотодекомпозиції S-нітрозотіолів і нітрит-іонів при дії ультрафіолетового випромінювання [5-7].

Виявлено, що в шкірі NO відіграє роль у підтримці її бар'єрно-захисних функцій і забезпеченні нормального кровотоку в мікроциркуляторному руслі, опосередкує процес ацетилхолін-індукованої вазодилатації, справляє антиапоптотичну дію на клітини шкіри [8-9]. У той же час NO відомий як потужний агент, що ушкоджує. Він виявляє прооксидантні й апоптотичні властивості, пригнічує біоенергетичні і репаративні процеси. Детально вивчені механізми NO-залежного ушкодження судинної стінки, нирок, печінки, шлунка, слинних залоз [2]. Проте недостатньо з'ясовані за умов надлишкового утворення NO з екзогенних попередників (нітратів, нітритів) механізми порушень метаболізму і функцій шкіри.

Метою цієї роботи полягала у з'ясуванні змін продукції активних форм кисню й азоту (супероксидного аніон-радикала, оксиду азоту), активності пероксидного окиснення ліпідів і антиоксидантних ферментів у шкірі за умов тривалого надходження в організм білих щурів нітрату натрію.

Матеріали і методи досліджень. Експерименти виконані на 40 білих щурах лінії Вістар масою 130-160 г у чотирьох серіях дослідів: перша серія - інтактні тварини (контрольна); у другій, третій і четвертій серіях тваринам вводили нітрат натрію (200 мг/кг) відповідно протягом 14, 30 і 90 діб. Білих щурів декапітували під ефірним наркозом і вирізували стандартні зразки шкіри з області спини.

Утворення супероксидного аніон-радикала (O_2^-) оцінювали при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм у гомогенаті тканини з індукторами у вигляді НАДН, НАДФН і бактеріальними ліпополісахаридами (пірогеналом) [10-11]. Про вміст NO судили за спектрами ЕПР (чинник $g=2,007$) комплексів NO з гемовим і негемовим залізом [12].

Рівень пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за утворенням у реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) із ТБК-активними продуктами забарвленого триметинового комплексу до і після 1,5-годинної інкубації [13]. Активність антиоксидантної системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час півторагодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (СОД) і каталази [13].

Дані експериментів опрацьовували за методами варіаційної статистики за допомогою програми Statistika 2.0. Для порівняння й оцінки вірогідності отриманих результатів використовували розрахунок критерію вірогідності Ст'юдента (t-тест).

Результати досліджень. Уже через 2 тижні після початку введення в організм білих щурів нітрату натрію спостерігається зростання продукції O_2^- мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом на 41,7 % ($p<0,01$) і НАДФН-оксидазою лейкоцитів на 63,9 % ($p<0,02$) (табл. 1).

Підвищення продукції O_2^- мітохондріальним (на 44,8 %, $p<0,01$) і лейкоцитарним (на 75,0 %, $p<0,02$) електронно-транспортними ланцюгами спостерігається і через 1 місяць від початку введення в організм білих щурів нітрату натрію. У цей же період підвищується утворення O_2^- мікросомальним електронно-транспортним ланцюгом (на 39,5 %; $p<0,01$).

Після 3-місячного введення нітрату натрію істотно зростає загальний фон продукції O_2^- (на 27,1 %; $p<0,05$).

1. Утворення супероксидного аніон-радикала та оксиду азоту в шкірі білих щурів ($M \pm m$) за умов надлишкового надходження в організм нітрату натрію ($n=40$)

Показники	Контроль	Час від початку введення нітрату натрію		
		14 діб	30 діб	90 діб
Загальний фон продукції $\cdot O_2^-$, нмоль/м $\times$ с	0,85 $\pm 0,06$	0,96 $\pm 0,15$	0,95 $\pm 0,18$	1,08 $\pm 0,08^*$
Продукція $\cdot O_2^-$ мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом (стимуляція НАДФН), нмоль/м $\times$ с	18,54 $\pm 0,88$	20,46 $\pm 2,06$	25,87 $\pm 1,48^*$	32,08 $\pm 1,34^*$
Продукція $\cdot O_2^-$ мікросомальним електронно-транспортним ланцюгом (стимуляція НАДН)	17,32 $\pm 1,14$	24,54 $\pm 1,44^*$	25,08 $\pm 1,86^*$	32,68 $\pm 1,28^*$
Продукція $\cdot O_2^-$ НАДФН-оксидазною системою лейкоцитів (стимуляція пірогеналом), нмоль/м $\times$ с	0,72 $\pm 0,08$	1,18 $\pm 0,14^*$	1,26 $\pm 0,16^*$	0,83 $\pm 0,10$
Залізо-нітрозильні комплекси, число спинів, $\times 10^{13}$	13,83 $\pm 1,21$	16,86 $\pm 0,25$	22,33 $\pm 1,65^*$	24,37 $\pm 0,46^*$

Примітка. Тут і далі – * - $p < 0,05$ при порівнянні результатів із даними інтактної серії.

У цей період його вироблення мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом на 88,7 % ($p < 0,001$) перевищує дані контрольної групи, мікросомальним електронно-транспортним ланцюгом – на 73,0 % ($p < 0,001$).

У цей же час продукція $\cdot O_2^-$ при використанні як стимулятора пірогеналу, що дає змогу оцінити внесок НАДФН-оксидазної системи лейкоцитів у процесі продукції активних форм кисню, на відміну від даних на 14-у та 30-у добу інтоксикації, вірогідно не відрізняється від показників контрольної серії.

На 14 добу інтоксикації нітратом натрію достовірної зміни між зразками шкіри сигналу ЕПР (чинник $g=2,007$), що реєструється при взаємодії NO з гемовим і негемовим залізом, ми не виявили. Проте на 30-у добу хронічної інтоксикації нітратом натрію ми виявили достовірне зростання амплітуди сигналу. При цьому число спинів змінюється з $13,83 \pm 1,21 \times 10^{13}$ (у контрольній серії) до $22,33 \pm 1,65 \times 10^{13}$ ($p < 0,05$), тобто на 76,2 %.

Проте на 90-у добу хронічної інтоксикації нітратом натрію сигнал ЕПР, що відповідає комплексам NO з гемовим і негемовим залізом (чинник $g=2,007$), зростає до $24,37 \pm 0,46 \times 10^{13}$, тобто на 61,9 % перевищує дані контрольної серії ($p < 0,02$).

При цьому нами встановлена пряма кореляційна залежність між рівнем залізо-нітрозильних комплексів і величиною продукції $\cdot O_2^-$ мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом ($r = 0,78$), що вказує на роль NO у забезпеченні 1-електронного відновлення кисню в дихальному ланцюзі мітохондрій.

Одночасний ріст утворення NO і $\cdot O_2^-$ створює передумови до утворення в тканинах шкіри високотоксичного пероксинітриту: $\cdot O_2^- + NO \rightarrow \cdot ONOO^-$ [14]. Останній здатний породжувати ланцюгові реакції ПОЛ, спричинювати одониткові розриви і різко підсилювати утворення 8-гідроксидезоксигуанозину в ДНК, пригнічувати мітохондріальне дихання [14].

Через 14 днів після початку введення в організм білих щурів нітрату натрію достовірних змін утворення ТБК-реактивних (табл. 2), найбільшу кількість яких становить малоновий діальдегід, не виявлено. Це, очевидно, пов'язано з



компенсаторним підвищенням антиоксидантного потенціалу, зокрема, у цей період вірогідно зростає активність супероксиддисмутази (на 45,5 %; $p < 0,01$) і каталази (на 28,1 %; $p < 0,05$).

2.Зміни процесів пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантних ферментів у шкірі білих щурів за умов надлишкового надходження в організм нітрату натрію ($M \pm m$, $n=40$)

Показники	Контроль	Час від початку введення нітрату натрію		
		14 діб	30 діб	90 діб
ТБК-реактанти до інкубації, мкмоль/м	26,8 $\pm 2,8$	24,4 $\pm 4,2$	38,4 $\pm 3,2$	46,4 $\pm 2,6^*$
ТБК-реактанти після інкубації, мкмоль/м	43,6 $\pm 3,1$	42,8 $\pm 4,2$	64,6 $\pm 4,0^*$	79,1 $\pm 3,9^*$
Приріст ТБК-реактантів, мкмоль/м	16,8 $\pm 1,2$	18,4 $\pm 1,8$	26,2 $\pm 1,6^*$	32,7 $\pm 1,6^*$
СОД, од. акт.	2,24 $\pm 0,16$	3,26 $\pm 0,22^*$	2,86 $\pm 0,14^*$	1,68 $\pm 0,18^*$
Каталазний показник	3,02 $\pm 0,28$	3,87 $\pm 0,24^*$	2,23 $\pm 0,19^*$	1,88 $\pm 0,38^*$

Відомо, що синтез СОД індукується на рівні трансляції субстратом (тобто O_2^-) [15], а, як відзначалося вище, у цей період істотно зростає його продукція. Активність каталази індукується на генному рівні пероксидом водню [16], у зв'язку з чим активності цього ферменту і СОД знаходяться у взаємозв'язку, тому що СОД забезпечує каталазу субстратом, а остання регенерує кисень для потреб клітини.

При відтворенні 1-місячної інтоксикації нітратом натрію спостерігається зростання концентрації ТБК-реактантів після 1,5-годинної інкубації в залізоаскорбатному буферному розчині – на 48,2 % ($p < 0,01$), що свідчить про активацію процесів вільно-радикального ПОЛ у тканинах шкіри білих щурів. У цей період вірогідно підвищується приріст ТБК-реактантів за час інкубації (на 56,0 %; $p < 0,001$), що вказує на виснаження антиоксидантного потенціалу в тканинах шкіри. Разом із тим, активність СОД на 27,7 % ($p < 0,02$) перевищує дані інтактної групи. У той же час, активність каталази прогресивно знижується й поступається величині контролю на 26,2 % ($p < 0,05$).

Одним з можливих механізмів зниження активності зазначеного ферменту, очевидно, є блокування іона заліза, його активного центра, оксидом азоту, що утворюється в ході метаболізму нітрат- і нітрит-іонів [3]. На це вказує, зокрема, підвищений у цей період рівень парамагнітних комплексів NO з гемовим і негемовим залізом у зразках шкіри білих щурів, причому нами встановлена зворотна кореляційна залежність між рівнем цих комплексів і значенням каталазного показника ($r = -0,70$).

Висновок. У динаміці хронічної інтоксикації нітратом натрію в шкірі білих щурів спостерігається погресуюче збільшення продукції оксиду азоту і супероксидного аніон-радикала. Основними джерелами останнього є мітохондріальний і мікосомальний електронно-транспортні ланцюги. Продукція супероксидного аніон-радикала НАДФН-оксидазою лейкоцитів у тканинах шкіри білих щурів обмежена часовим проміжком (на 14-30 добу). Хронічна інтоксикація нітратом натрію сприяє істотній активації процесів вільнорадикального пероксидного окиснення ліпідів і виснаженню антиоксидантного потенціалу в шкірі щурів уже на 30 добу інтоксикації. Зміна активності антиоксидантних ферментів у тканинах шкіри білих щурів носить

фазний характер. На 14 добу інтоксикації активність СОД і каталази зростає, а надалі знижується (каталази – на 30 добу, СОД – після 3-місячного введення нітрату натрію).

Перспективи подальших досліджень. Одержані результати дають підстави для подальших досліджень у галузях ветеринарної та гуманітарної медицини щодо запобігання NO-залежним ушкодженням шкіри і пов'язаних із цим її захворюванням. Також потребує подальших розробок визначення шляхів запобігання зниженню якості шкіри сільськогосподарських тварин, пов'язаного з активацією вільнорадикальних процесів через надлишкове надходження до організму азотовмісних сполук.

Бібліографічний список

1. Бутовский Р.О. Проблемы химического загрязнения почв и грунтовых вод в странах Европейского Союза / Р.О. Бутовский // *Агрохимия*. - 2004. - №3. - С.74-81.
2. 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.] // *Клінічна та експериментальна патологія*. – 2004. – Т.3, № 2 (Ч.1). – С.202-204.
3. Проблема оксида азота в биологии и медицине и принцип цикличности: Ретроспективный анализ идей, принципов и концепций /[В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, Н.С. Косицын, В.Е. Охотин]. – Москва: Едиториал УРСС, 2003. – 96 с.
4. Cals-Grierson M.M. Nitric oxide function in the skin / M.M.Cals-Grierson, A.D. Ormerod // *Nitric Oxide*. – 2004. – V.10, №4. – P.179-193.
5. Weller R. Nitric oxide: a key mediator in cutaneous physiology / R. Weller // *Clin. Exp. Dermatol*. – 2003. – V.28, №5. – P. 511-514.
6. Opländer C. The impact of nitrite and antioxidants on ultraviolet-A-induced cell death of human skin fibroblasts /C. Opländer, M.M. Cortese, H.G. Korth [et al.]// *Free Radic. Biol. Med*. – 2007. – V.43, №5. – P.818-829.
7. Paunel A.N. Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms /A.N. Paunel, A. Dejam, S. Thelen [et al.]// *Free Radic. Biol. Med*. – 2005. – V.38, №5. – P.606-615.
8. Iskander D. Nitric oxide suppression of apoptosis in human skin following UV irradiation / D. Iskander, R. Weller // *Br. J. Dermatol*. – 2005. – V.152. – P.847.
9. Kellogg D.L. Acetylcholine-induced vasodilation is mediated by nitric oxide and prostaglandins in human skin / D.L. Jr. Kellogg, J.L. Zhao, U.Coey, J.V. Green // *J. Appl. Physiol*. – 2005. – V.98, №2. – P.629-632.
10. Цебржинский О.И. Дифференцированное спектрофотометрическое определение продукции супероксида в тканях НСТ-тестом / О.И. Цебржинский // *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. - 2002. – Т.2, №1. - С.96-97.
11. Блинецова Г.Н. Метод определения субклеточной генерации супероксиданиона у здоровых животных и при токсическом повреждении печени /Г.Н. Блинецова, О.И. Цебржинский, А.К. Нацвина [и др.] // *Вестник ВГУ: сер. «Химия. Биология. Фармация»*. - 2004. - № 2. - С.108–111.
12. Ажипа Я.И. Медико-биологические аспекты применения метода электронного парамагнитного резонанса /Я.И. Ажипа. - Москва: Наука, 1983. - 527 с.
13. 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.



14. Kamat J.P. Peroxynitrite: a potent oxidizing and nitrating agent /J.P. Kamat // Indian J. Exp. Biol. – 2006. – V.44, №6. – P.436-447.

15. Поберезкина Н.Б. Биологическая роль супероксиддисмутазы / Н.Б. Поберезкина, Л.Ф. Осинская // Украинский биохимический журнал. - 1989. - Т.61, №2. - С.14-23.

16. Ponrdenz E. Alteration of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide / E. Ponrdenz, R. Kahl // Free Radical. Biol. Med. - 1998. - V.24, №1. - P.27-38.

*NO-ЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ
ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В КОЖЕ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ
ДЛИТЕЛЬНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ В ОРГАНИЗМ НИТРАТА НАТРИЯ*

Оренчук Е.П., Костенко В.А., Украинская медицинская стоматологическая академия, г. Полтава

В эксперименте на 40 белых крысах выявлено, что в динамике хронической интоксикации нитратом натрия в коже отмечается прогрессирующее увеличение продукции оксида азота и супероксидного анион-радикала, активация процессов пероксидного окисления липидов и истощение антиоксидантного потенциала уже на 30 сутки интоксикации. Выявлен фазный характер изменений в коже активности антиоксидантных ферментов. На 14 сутки интоксикации активность супероксиддисмутазы и каталазы возрастает, а в дальнейшем - снижается (каталазы – на 30 сутки, супероксиддисмутазы – после 3-месячного введения нитрата натрия).

Ключевые слова: оксид азота, нитраты, окислительный метаболизм, супероксидный анион-радикал, кожа.

*NO-DEPENDENT OXIDATIVE PROCESS SWAP IN THE ANIMAL SKIN UNDER
THE CONDITIONS OF LONG-TERM SODIUM NITRATE ACCUMULATION IN THE
ORGANISM*

Orenchuk E., Kostenko V.; the pathological physiology chair manager, Ukrainian medical dental academy, Poltava town

This article highlights the experimental research results on oxidative process swap in the animal skin due to long-term sodium nitrate accumulation in the organism. 40 white rats were tested during the experiment. Nitric oxide and super-oxide anion radical products observed to be aggregated in the rat skin. The above-mentioned product aggregation resulted from chronic intoxication progress due to sodium nitrate. The basic super-oxide anion radical sources include mitochondria & micro-somatic blood stream chains. Super-oxide anion radical products in the skin tissue of the white rat are aggregated on the 14-th – 30-th day. The above-mentioned products are manufactured by NADFN-leukocyte oxidase enzyme. Chronic intoxication is induced by sodium nitrate. Intoxication activates enzymatic lipid oxidation processes and it procures antioxidant potential degradation in the rat skin on the 30-th intoxication day. Antioxidant enzyme activity in the skin tissues of the white rats is characterized by the phase swap. Super oxide-dismutase & catalase enzyme activity is increased on the 14-th intoxication day and later activity is diminished. Catalase enzyme activity is decreased on the 30-th intoxication day. Super-oxide-dismutase enzyme activity is abated after sodium nitrate administration in three months.

Key words: nitric oxide, nitrates, oxidative metabolism, super-oxide anion radical, skin.