

РАЗДЕЛ I. ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.12-008.9:615.916:546.16./33-085:549.514]-092.9

КОРРЕКЦИЯ СУСПЕНЗИЕЙ НАНОДИСПЕРСНОГО ОКСИДА КРЕМНИЯ ОКСИДАЦИОННОГО СТРЕССА В СЕРДЦЕ КРЫС ПРИ НИТРАТНО-ФТОРИДНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

*Акимов О.Е.: ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4958-3695>,
Мищенко А.В.: ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8521-956X>,
Костенко В.О.: ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3965-1826>*

Украинская медицинская стоматологическая академия,
г. Полтава, Украина

CORRECTION OF OXIDATIVE STRESS IN THE HEART OF RATS DURING NITRATE-FLUORIDE INTOXICATION BY NANOSIZED SILICA OXIDE SUSPENSION

*Akimov O.Ye.: ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4958-3695>,
Mischenko A.V.: ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8521-956X>,
Kostenko V.O.: ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3965-1826>*

Ukrainian medical stomatological academy, Poltava, Ukraine

Реферат.

Избыточное поступление с питьевой водой и продуктами питания нитратов и фторидов несёт в себе риск не только для органов желудочно-кишечного тракта, но для всего организма в целом.

Цель исследования: изучение влияния суспензии нанодисперсного оксида кремния (НКО) на продукцию активных форм кислорода и азота, функционирование цикла NO, антиоксидантную защиту и процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сердце крыс при сочетанном избыточном поступлении в организм нитратов и фторидов.

Материал и методы исследования. Объект исследования – 35 белых крысах линии Вистар. Предмет исследования – влияние суспензии НКО на продукцию активных форм кислорода и азота, функционирование цикла NO, антиоксидантную защиту и процессы ПОЛ.

Результаты исследования. Нитратно-фторидная интоксикация приводит к усилению продукции активных форм кислорода и азота, снижению активности антиоксидантных ферментов, усилению интенсивности процессов ПОЛ. Введение НКО на фоне моделирования хронической нитратно-фторидной интоксикации снижает продукцию активных форм кислорода и азота, восстанавливает активность антиоксидантных ферментов, уменьшает интенсивность ПОЛ.

Выводы. НКО эффективна для коррекции метаболических изменений в сердце крыс при хронической нитратно-фторидной интоксикации.

Ключевые слова: нанодисперсный оксид кремния, нитрат натрия, фторид натрия, сердце, оксидативный стресс.

Abstract.

Excessive intake of drinking water and food polluted with nitrates and fluorides carries a risk not only for the organs of the gastrointestinal tract, but for the whole organism.

Objective: the aim of this study was to evaluate the effect of a nanosized silicon oxide suspension (NKO) on the production of reactive oxygen and nitrogen species, the functioning of the NO cycle, antioxidant protection, and lipid peroxidation (LPO) processes in the heart of rats under combined excessive intake of nitrates and fluorides.

Material and methods. The object of study is 35 white rats of the Wistar line. The subject of the study is the effect of NKO suspension on the production of active forms of oxygen and nitrogen, the functioning of the NO cycle, antioxidant protection and processes LPO.

Results. Nitrate-fluoride intoxication leads to an increase in the production of reactive oxygen and nitrogen species, a decrease in the activity of antioxidant enzymes, and an increase in the intensity of LPO processes. The introduction of NKO against the background of modeling chronic nitrate-fluoride intoxication reduces the production of reactive oxygen and nitrogen species, restores the activity of antioxidant enzymes, and reduces LPO intensity.

Conclusions. NKO is effective for the correction of metabolic changes in the heart of rats during chronic nitrate-fluoride intoxication.

Key words: nanosized silica oxide, sodium nitrate, sodium fluoride, heart, oxidative stress.

Введение. Оксид азота (далее – NO) является важным газовым медиатором для функционирования сердечной мышцы. Недостаточная продукция NO может привести к спазму венечных артерий и развитию ишемических поражений сердца. Основными продуцентами NO являются NO-синтазы (далее – NOS) и нитрит-редуктазы (NiR), которые получают свой субстрат в результате окисления NO до нитритов и от редукции нитратов нитрат-редуктазами.

Органические и неорганические нитраты могут попадать в организм человека и животных в избыточном количестве с продуктами питания и питьевой водой, особенно в регионах с развитой аграрной промышленностью. Некоторые авторитетные учёные считают, что нитраты способны оказать позитивное влияние на систему кровообращения [6, 7]. Механизмом, который лежит в основе позитивного влияния пищевых нитратов, является редукционный путь синтеза NO [4, 8].

В то же время длительное применение органических нитратов у пациентов с ишемической болезнью может привести к усугублению эндотелиальной дисфункции путём активации НАДФН-оксидазы фагоцитов с последующим развитием оксидативного стресса в эндотелии [10]. Неорганические нитраты способны ингибировать НАДФН-оксидазу фагоцитов и ограничивать развитие оксидативного стресса [3]. Таким образом, влияние нитратов на развитие оксидативного стресса в сердце сильно зависит от химической природы активаторов нитрат-нитрит-редуктазного пути образования оксида азота и от дозы их поступления в организм.

Ещё одним экологическим фактором, который влияет на продукцию оксида азота, являются ионы фтора. Фториды также могут попадать в организм человека с водой (например, Полтавская область, Украина) и некоторыми продуктами питания, особенно в регионах, где концентрация фтора в грунтовых водах может достигать 48 мг/л [5]. Фториды могут приводить к развитию оксидативного стресса путём активации ядерного транскрипционного фактора NF-κB, который в свою

очередь усиливает экспрессию генов индуцибельной NOS, приводя к усилению продукции оксида азота NOS-зависимым путём [9]. По данным наших предыдущих исследований, фторид натрия способен снижать активность аргиназ, высвобождая субстрат реакции для NOS [2].

Таким образом, нитраты и фториды способны изменять продукцию оксида азота и приводить к развитию оксидативного стресса в сердечной мышце. Также не исключено их одновременное избыточное поступление в организм.

Целесообразным является разработка методов лечения и профилактики негативных последствий сочетания этих двух экопатогенов. Перспективным препаратом для профилактики патологических изменений, вызванных нитратами и фторидами, является суспензия нанодисперсного оксида кремния (далее – НКО). Данный сорбент является безопасным при длительном употреблении даже в дозах 975,9 мг/кг [11]. Также наши предыдущие исследования показали его эффективность при коррекции избыточной продукции оксида азота в слизистой желудка [1].

Цель исследования: изучение влияния НКО на продукцию активных форм кислорода и азота, функционирование цикла NO, антиоксидантную защиту и процессы перекисного окисления липидов (далее – ПОЛ) в сердце крыс при сочетанном избыточном поступлении в организм нитратов и фторидов.

Материал и методы исследования. Данная работа является частью плановой научно-исследовательской работы «Роль транскрипционных факторов, системы циркадиального осциллятора и метаболических нарушений в формировании и функционировании патологических систем» (№ 0119U103898).

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 вводили в течение 30 дней.

Суспензия НКО – это 5%-й раствор (масса/объём) оксида кремния с размером частиц в диапазоне 30–45 нм на 0,5%-ном (объём/объём) растворе полиэтиленоксида-400.

НКО вводился 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 нитратно-фторидной интоксикации – 15 животных; группа животных, которым вводили НКО на фоне моделирования хронической интоксикации – 10 животных.

Вывод животных из эксперимента осуществлялся под тиопенталовым наркозом.

Биохимические исследования проводились в 10%-ном гомогенате тканей сердца.

Продукцию супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$) определяли путём определения концентрации диформаза, образованного в реакции $O_2^{\cdot-}$ с нитросиним тетразолием.

Для оценки вклада в продукцию $O_2^{\cdot-}$ митохондриальных и митохондриальных электронно-транспортных цепей (ЭТЦ) использовали индукторы в виде 3%-ных (масса/объём) водных растворов НАДФН₂ и НАДН₂.

Для оценки интенсивности продукции $O_2^{\cdot-}$ НАДФН-оксидазой лейкоцитов (К.Ф. 1.6.3.1) использовали бактериальный липополисахарид (Пирогенал) в качестве индуктора [12].

Концентрацию пероксинитрита щелочных и щелочно-земельных металлов ($ONOO^-$) определяли по концентрации I_3^- , который образуется при реакции $ONOO^-$ с 5%-ным (масса/объём) раствором KI в щелочной среде [12].

Активность супероксиддисмутазы (СОД; К.Ф. 1.15.1.1) определяли по методу О. С. Брусова [12].

Активность каталазы (КАТ; К.Ф. 1.11.1.6) определяли по методу М. А. Королюк [12].

Концентрацию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактантов), определяли по методу М. Д. Стальной [12].

Общую активность NO-синтаз (NOS; К.Ф. 1.14.13.39) определяли по приросту нитритов после 30 минутной инкубации 0,2 мл 10%-ного гомогената при $t=37^\circ\text{C}$ в среде, содержащей

2,5 мл 0,2 mM трис-буферного раствора (pH=7,4), 0,3 мл 320 mM раствора L-аргинина и 0,1 мл 1 mM раствора НАДФН₂ [12].

Общую активность нитрит-редуктаз определяли по убыли нитритов после 60-минутной инкубации при t=37°C в среде, содержащей 1 мл 0,2 mM фосфатного буферного раствора (pH=7,0), 10 мкмоль нитрита натрия и 0,1 мл 0,1%-ного раствора НАДФН₂ (масса/объем) [12].

Общую активность аргиназ (К.Ф. 3.5.3.1.) определяли по приросту L-орнитина после 20-ти часовой инкубации при t=37°C в среде, содержащей 0,5 мл 0,2 mM фосфатного буферного раствора (pH=7,0) и 0,2 мл 24 mM раствора L-аргинина [12].

Концентрацию нитритов в исследуемых растворах определяли при помощи реактива Грисса-Илосвая.

Концентрацию L-орнитина в исследуемых растворах определяли при помощи реактива Chinard в модификации Храмова.

Спектрофотометрические исследования проводились на спектрофотометре Ulab 101. Реактивы были квалификации ЧДА или ХЧ.

Статистическую обработку проводили в пакете программ Microsoft Office Excel с использованием расширения Real Statistics 2019.

Все результаты поддавались проверке на нормальность распределения по методу Шапиро-Вилка.

Статистическую значимость различия между группами определяли при помощи t-критерия Стьюдента (при нормальном распределении признака), или при помощи теста Манна-Уитни (при распределении отличном от нормального). Разницу считали статистически значимой при p<0,05.

Результаты исследования и их обсуждение. В тканях сердца сочетанная интоксикация увеличивает базовую продукцию O₂^{•-} на 34,55% относительно группы интактных животных (таблица 1).

Продукция от микросомальной ЭТЦ и NOS увеличивается на 54,55%; от митохондриальной ЭТЦ – на 44,27%. Продукция O₂^{•-} от НАДФН-оксидазы лейкоцитов возрастает на 17,69%. Концентрация ONOO⁻ возрастает на 56,5%.

Таблица 1. – Продукция свободных радикалов в сердце крыс при нитратно-фторидной интоксикации и коррекции суспензией нанодисперсного оксида кремния ($M \pm m$)

Показатели	Группы		
	Интактные животные, n=10	Нитратно-фторидная интоксикация, n=15	Суспензия нанодисперсного оксида кремния, n=10
Продукция $O_2^{\cdot-}$, нмоль/с на г:			
базовая	1,91±0,17	2,57±0,06*	1,90±0,03**
микросомальными ЭТЦ и NOS	11,0±0,72	17,0±0,4*	15,0±0,42**
митохондриальными ЭТЦ	13,1±1,12	18,9±0,88*	13,8±0,99**
НАДФН-оксидазой лейкоцитов	1,47±0,03	1,73±0,07*	1,59±0,07**
Концентрация $ONOO^-$, мкмоль/г	3,31±0,19	5,18±0,28*	3,45±0,19**

Примечания для таблиц 1–3: * – результаты статистически значимо отличаются от группы интактных животных ($p < 0,05$); ** – результаты статистически значимо отличаются от группы нитратно-фторидной интоксикации животных ($p < 0,05$)

Активность СОД в условиях хронической нитратно-фторидной интоксикации статистически значимо не изменяется по сравнению с группой интактных животных (таблица 2).

Таблица 2. – Антиоксидантная защита и ПОЛ в сердце крыс при нитратно-фторидной интоксикации и коррекции суспензией нанодисперсного оксида кремния ($M \pm m$)

Показатели	Группы		
	Интактные животные, n=10	Нитратно-фторидная интоксикация, n=15	Суспензия нанодисперсного оксида кремния, n=10
Активность СОД, у.е.	1,21±0,2	1,03±0,07	1,71±0,23**
Активность каталазы, нкат/г	0,65±0,08	1,41±0,02*	0,82±0,07**
Концентрация ТБК-реактантов, мкмоль	42,79±2,93	57,12±1,43*	44,35±3,08**

Активность КАТ увеличивается на 117%. Концентрация ТБК-реактантов увеличивается на 33,49%. Увеличение активности КАТ при неизменённой активности СОД свидетельствует о разобщении в функционировании супероксиддисмутазно-каталазной системе. Результатом этого разобщения можно считать усиление интенсивности ПОЛ в тканях сердца. Продукция NO от NOS увеличивается на 53,57% (таблица 3).

Таблица 3. – Функционирование цикла оксида азота в сердце крыс при нитратно-фторидной интоксикации и коррекции суспензией нанодисперсного оксида кремния ($M \pm m$)

Показатели	Группы		
	Интактные животные, n=10	Нитратно-фторидная интоксикация, n=15	Суспензия нанодисперсного оксида кремния, n=10
Активность NO-синтаз, мкмоль NO_2^- /мин. на г белка	1,68±0,07	2,58±0,2*	1,89±0,11**
Активность аргиназ, мкмоль L-орнитина / мин. на г белка	2,24±0,08	2.07±0,13	2,55±0,16**
Активность нитрит-редуктаз, мкмоль NO_2^- /мин. на г белка	2,34±0,39	8,83±1,24*	4,83±0,94**

Снижение продукции активных форм кислорода и азота свидетельствует об эффективной сорбционной способности суспензии нанодисперсного оксида кремния по отношению к нитратам и фторидам.

Активность СОД повышается на 66,02%. Активность КАТ снижается на 41,84%. Концентрация ТБК-реактантов уменьшается на 33,49%.

Снижение активности КАТ на фоне повышения активности СОД свидетельствует о нормализации в функционировании супероксиддисмутазно-каталазной системы.

НКО снижает продукцию NO от NOS на 26,74%. NOS-независимая продукция NO снижается в 1,83 раза.

Активность аргиназ увеличивается на 23,19%.

Снижение продукции NO от нитрат-нитрит редуктазного звена цикла NO свидетельствует о снижении нитратной нагрузки и эффективной сорбции нитратов НКО. Снижение суммарной продукции NO объясняет снижение концентрации ONOO⁻. Увеличение активности аргиназ свидетельствует об интенсивном синтезе полиаминов, поскольку продукция O₂^{•-} снижается.

Выводы.

1. НКО эффективна для коррекции избыточной продукции свободных радикалов в условиях хронической нитратно-фторидной интоксикации.

2. Введение НКО восстанавливает функционирование антиоксидантных ферментов и снижает интенсивность ПОЛ. НКО нормализует функционирование цикла оксида азота в сердце крыс в условиях хронической нитратно-фторидной интоксикации.

Литература

1. Акимов, О. Е. Влияние суспензии нанодисперсного кремнезема на функционирование цикла оксида азота в слизистой оболочке желудка крыс при сочетанной нитратной и фторидной интоксикации / О. Е. Акимов, А. В. Мищенко, В. А. Костенко // Вест. Бел. гос. мед. ун-та. – 2017. – № 1. – С. 40–4.

2. Akimov, O. Y. Functioning of nitric oxide cycle in gastric mucosa of rats under excessive combined intake of sodium nitrate and fluoride. / O. Y. Akimov, V. O. Kostenko // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 88(6). – P. 70–5. doi:10.15407/ubj88.06.070.

3. AMP-activated protein kinase activation and NADPH oxidase inhibition by inorganic nitrate and nitrite prevent liver steatosis. / I. Cordero-Herrera [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2019. – Vol. 116(1). – P. 217–226. doi:10.1073/pnas.1809406115.

4. Chirinos, J. A. The Nitrate-Nitrite-NO Pathway and Its Implications for Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. / J. A. Chirinos, P. Zamani // Curr. Heart Fail. Rep. – 2016. – Vol. 13(1). – P. 47–59. doi:10.1007/s11897-016-0277-9.

5. Del Bello, L. Fluorosis: an ongoing challenge for India. / L. Del Bello // Lancet Planet. Health. – 2020. – Vol 4(3). – P. 694–5. doi:10.1016/S2542-5196(20)30060-7.

6. Dietary nitrate's effects on exercise performance in heart failure with reduced ejection fraction (HFREF). / V. Mulkareddy [et al.] // Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis. – 2019. – Vol. 1865(4). – P. 735–40. doi:10.1016/j.bbadis.2018.09.026.

7. Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive

patients: a randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study. / V. Kapil [et al.] // *Hypertens.* – 2015. – Vol. 65(2). – P. 320–7. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04675.

8. Nitrite and nitrate chemical biology and signalling. / A.W. DeMartino [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2019. – Vol. 176(2). – P. 228–45. doi:10.1111/bph.14484

9. Sodium fluoride induces renal inflammatory responses by activating NF- κ B signaling pathway and reducing anti-inflammatory cytokine expression in mice. / Q. Luo [et al.] // *Oncotarg.* – 2017. – Vol. 8(46). – P. 80192–207. doi:10.18632/oncotarget.19006.

10. The Endothelin Receptor Antagonist Macitentan Improves Isosorbide-5-Mononitrate (ISMN) and Isosorbide Dinitrate (ISDN) Induced Endothelial Dysfunction, Oxidative Stress, and Vascular Inflammation. / S. Steven [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2018. – Vol. 2018 (7845629). doi:10.1155/2018/7845629.

11. Toxicology of silica nanoparticles: an update. / S. Murugadoss, D. Lison [et al.] // *Arch. Toxicol.* – 2017. – Vol. 91(9). – P. 2967–3010. doi: 10.1007/s00204-017-1993-y.

12. Yelins'ka, A. M. Role of AP-1 transcriptional factor in development of oxidative and nitrosative stress in periodontal tissues during systemic inflammatory response. / A. M. Yelins'ka, O. Ye. Akimov, V. O. Kostenko // *Ukr. Biochem. J.* – 2019. – Vol. 91(1). – P. 80–5. doi: https://doi.org/10.15407/ubj91.01.080.

References

1. Akimov O. Y., Mischenko A. V., Kostenko V. A. (2017). Vliyanie suspenzii nanodispersnogo kremnezema na funkcionirovanie cikla oksida azota v slizistoj obolochke zheludka krysa pri sochetannoј nitratnoј i fluoridnoј intoksikacii. *Vestnik Belorusskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. Vol. 1. pp. 40–4 (in Russian).

2. Akimov O. Y., Kostenko V. O. (2016). Functioning of nitric oxide cycle in gastric mucosa of rats under excessive combined intake of sodium nitrate and fluoride. *The Ukrainian Biochemical Journal*. Vol. 88(6). pp. 70–5. doi:10.15407/ubj88.06.070 (in English).

3. Cordero-Herrera I., Kozyra M., Zhuge Z., McCann Haworth S., Moretti C., Peleli M. (2019). AMP-activated protein kinase activation and NADPH oxidase inhibition by inorganic nitrate and nitrite prevent liver steatosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 116(1). pp. 217–26. doi:10.1073/pnas.1809406115 (in English).

4. Chirinos J. A., Zamani P. (2016). The Nitrate-Nitrite-NO Pathway and Its Implications for Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *Current*

Heart Failure Reports. Vol. 13(1). pp. 47–59. doi:10.1007/s11897-016-0277-9 (in English).

5. Del Bello L. (2020). Fluorosis: an ongoing challenge for India. *The Lancet Planetary Health*. Vol. 4(3). pp. 694–5. doi:10.1016/S2542-5196(20)30060-7 (in English).

6. Mulkareddy V., Racette S. B., Coggan A. R., Peterson L. R. (2019). Dietary nitrate's effects on exercise performance in heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF). *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Vol. 1865(4). pp. 735–40. doi:10.1016/j.bbadis.2018.09.026 (in English).

7. Kapil V., Khambata R. S., Robertson A., Caulfield M. J., Ahluwalia A. (2015). Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive patients: a randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study. *Hypertension*. Vol. 65(2). pp. 320–7. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04675 (in English).

8. DeMartino A. W., Kim-Shapiro D. B., Patel R. P., Gladwin M. T. (2019). Nitrite and nitrate chemical biology and signalling. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 176(2). pp. 228–45. doi:10.1111/bph.14484 (in English).

9. Luo Q., Cui H., Deng H., Kuang P., Liu H., Lu Y. (2017). Sodium fluoride induces renal inflammatory responses by activating NF- κ B signaling pathway and reducing anti-inflammatory cytokine expression in mice. *Oncotarget*. Vol. 8(46). pp. 80192–207. doi:10.18632/oncotarget.19006 (in English).

10. Steven S., Oelze M., Hausding M., Roohani S., Kashani F., Kröllerschön S. (2018). The Endothelin Receptor Antagonist Macitentan Improves Isosorbide-5-Mononitrate (ISMN) and Isosorbide Dinitrate (ISDN) Induced Endothelial Dysfunction, Oxidative Stress, and Vascular Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Vol. 2018 (7845629). doi:10.1155/2018/7845629 (in English).

11. Murugadoss S., Lison D., Godderis L., Van Den Brule S., Mast J., Brassinne F. (2017). Toxicology of silica nanoparticles: an update. *Archives of Toxicology*. Vol. 91(9). pp. 2967–3010. doi: 10.1007/s00204-017-1993-y (in English).

12. Yelins'ka A. M., Akimov O. Ye., Kostenko V. O. (2019). Role of AP-1 transcriptional factor in development of oxidative and nitrosative stress in periodontal tissues during systemic inflammatory response. *The Ukrainian Biochemical Journal*. Vol. 91(1). pp. 80–5. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj91.01.080> (in English).

Поступила в редакцию: 02.06.2020

Адрес для корреспонденции: reseofreva_n_5@gmail.com