

**О.І. Годованець**  
**М.М. Рожко\***  
**А.М. Ерстенюк\***

Буковинський державний медичний  
 університет, м. Чернівці  
 Івано-Франківський державний  
 медичний університет\*

## ВПЛИВ ХРОНІЧНОЇ НІТРАТНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ НА СТАН СИСТЕМИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В ЩУРІВ

**Ключові слова:** нітрати, щури, вік, прооксидантна система, система антиоксидантного захисту.

**Резюме.** Експеримент проведений на одно- та двомісячних щурах. Хронічна нітратна інтоксикація (ХНІ) моделювалася шляхом перорального уведення натрію нітрату в дозі 0,5 г/кг протягом 45 днів. Встановлено підвищений рівень продуктів пероксидації білків і ліпідів на фоні зниження активності основних компонентів антиоксидантного захисту (АОЗ), зокрема недостатності глутатіонової системи.

### Вступ

Науково-технічний прогрес та урбанізація призводять до неухильного зростання антропогенного забруднення довкілля. Нітрати та нітрити є одними з найпоширеніших забруднювачів навколишнього середовища. Актуальність робіт з вивчення їх патологічної дії зумовлена інтенсивним розвитком промисловості з виготовлення азотних добрив, а також широким їх застосуванням у різних галузях промисловості (харчовій, хімічній, текстильній, металургійній, машинобудівній), у сільському господарстві та фармакології. Більшу частину нітратного навантаження на організм становить вода, що містить підвищений рівень нітратів і використовується для харчування.

За даними НДІ медико-екологічних проблем (м. Чернівці) рівень нітрат-іону в деяких районах області сягає 400-500 мг/л (при гранично допустимій концентрації 45 мг/л). Підвищений рівень ксенобіотика найбільшу небезпеку становить для дітей, що пов'язано з віковими особливостями обміну речовин і специфікою харчування, а саме більшою кількістю харчових продуктів і води, що споживається на кг маси тіла дитини на добу. Навіть встановлені гранично допустимі концентрації нітратів у продуктах рослинництва і воді не дозволяють повною мірою захистити дитячий організм від їх підвищеної кількості.

Із літератури відомо, що, потрапивши аліментарним шляхом, нітрати легко всмоктуються через слизову оболонку порожнини рота, верхні відділи шлунково-кишкового тракту, надходять у кров'яне русло, звідки 70 % їх виводиться із сечею. Решта відновлюються за допомогою нітрат/нітритредуктазних систем мікрофлори організму людини до нітритів ( $\text{NO}_2^-$ ) та оксиду азоту ( $\text{NO}$ ). При цьому в ротовій порожнині утворюється 80% добової дози нітритів. Тому саме тканини порожнини

рота першими зазнають впливу підвищених рівнів ксенобіотика. Відновлені форми нітратів включаються в нормальний фізіологічний цикл оксиду азоту, викликають зміну концентрації основних його метаболітів. Цикл  $\text{NO}$  складається з  $\text{NO}$ -синтезної та нітритредуктазної компонент, які забезпечують необхідну кількість  $\text{NO}$  в організмі і функціонують відповідно в аеробних та анаеробних умовах. Нітритредуктазна компонента забезпечує синтез  $\text{NO}$  шляхом відновлення його з  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  за допомогою гемопротейнів [6, 13].

Очевидно, що за умов ХНІ буде спостерігатися підвищений рівень  $\text{NO}$  та його метаболітів. Реакція перетворення  $\text{NO}_2^-$  в  $\text{NO}$  визначає багатогранність токсичної дії нітратів: здатність до окиснення гемоглобіну та утворення комплексів  $\text{Hb-NO}$  (подібні процеси відбуваються й з іншими гемвмісними білками); вплив на активність розчинної гуанілатциклази і рівень цГМФ, а також на внутрішньоклітинну концентрацію іонів  $\text{Ca}^{2+}$ ; утворення вільнорадикальних продуктів -  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$  і, як наслідок, розвиток оксидативного стресу; мутагенну дію нітратів. Слід зауважити, що у фізіологічних умовах реалізація дії  $\text{NO}$ , як універсального регулятора метаболізму, здійснюється через розчинну гуанілатциклазу, яка володіє найбільшими  $\text{HS}$ -групами, окиснення яких  $\text{NO}$  призводить до активації ферменту [2,3,6]. Проте за умов тривалої дії окисників ( $\text{NO}$ , нітросполук, активних форм кисню) ензим втрачає свою нативність, що зумовлює ефекти протилежні фізіологічним [2,6].

### Мета дослідження

Вивчити в експерименті вплив хронічної нітратної інтоксикації на стан прооксидантно-антиоксидантної системи у тканинах пародонта та функціональну активність системи глутатіону в крові щурів у віковому аспекті.

## Матеріал і методи

Дослідження проводилося на білих щурах лінії Вістар віком 1 та 2 місяці (середня маса тварин становила відповідно  $50,0 \pm 3,65$  та  $75,4 \pm 7,34$  г). Тварини розподілені на групи наступним чином: 10 тварин віком 1 місяць (ІА - контрольна група) та 10 тварин двомісячного віку (ІІА - контрольна група). Групи спостереження склали 10 щурів віком 1 місяць (ІБ група) та 10 щурів віком 2 місяці (ІІБ група), яким спричинювали хронічну нітратну інтоксикацію шляхом уведення натрію нітрату з питною водою в дозі 0,5 г/кг маси протягом 45 днів. Усі тварини знаходились у стандартних умовах віварію. Декапітацію проводили під легким ефірним наркозом.

У плазмі крові тварин визначали рівень нітрит-іону спектрофотометричним методом [11], ступінь окисної модифікації білків (ОМБ) за методом Мещишена І.Ф. [4], стан системи глутатіону: рівень HS-груп за допомогою реактиву Елмана [5]; рівень відновленого глутатіону (Г-SH) в еритроцитах за методом Травіної О.В. [9]; активність глутатіон-S-трансфери (Г-ST) за методом Nabig W. H. et.al. [12]; активність глутатіонредуктази (ГР) в еритроцитах за методом Pinto R.E., Bartley V. [10]; активність глутатіонпероксидази (ГП) в еритроцитах за методом Геруша І.В., Мещишена І.Ф. [1]. У гомогенатах ясен визначали рівень проміжного та кінцевого продуктів пероксидації ліпідів: дієнових кон'югатів за методом Мещишена І.Ф. [7] та малонового альдегіду (МА) за методом Стальної Н.Д. [7], а також активність каталази за методом Корольок М.А. [7].

Статистична обробка даних проведена методом варіаційної статистики з використанням критерію Стьюдента за допомогою комп'ютерної програми "STATGRAPHICS" (2001).

## Обговорення результатів дослідження

Під час проведення експерименту спостерігалась зміна поведінки та зовнішнього вигляду тварин груп дослідження. Зокрема, протягом перших 10 днів затравки щури обох груп погано набирали вагу, шерстяний покрив був мокрим, поведінкові реакції змінені у бік гіподинамії. У ІБ групі одна тварина загинула. Надалі стан тварин покращався і стабілізувався, проте вага щурів дослідних груп на момент закінчення експерименту була нижчою, ніж показники груп контролю. Зокрема середня вага щурів в ІБ групі становила  $103,3 \pm 5,0$ , в ІІБ -  $156,5 \pm 4,48$  г проти  $153,5 \pm 6,01$  та  $167,0 \pm 4,84$  г у групах порівняння ( $p < 0,05$ ). Зниження ваги тварин вказує на дисгармонійний фізичний розвиток при ХНІ, причинами якого можуть бути порушення нормальних метаболічних процесів та

виснаження компенсаторно-адаптаційних механізмів захисту за умов хронічного надмірного надходження ксенобіотику.

Підтвердженням розвитку ХНІ стали показники рівня нітрит-іону - одного з основних стабільних метаболітів нітратів в організмі. Зокрема вміст цього метаболіту в плазмі крові ІБ групи був на 77,2% вищий, ніж у відповідній групі контролю, а в ІІБ групі - на 73,7%.

Результати проведених нами біохімічних досліджень показали значні зміни прооксидантної системи та системи антиоксидантного захисту за умов ХНІ у крові та тканинах пародонта щурів. Отримані дані представлені в таблиці.

Аналіз показників вільнорадикальних процесів у тканинах пародонта тварин показав, що рівень ДК у щурів віком 1 і 2 місяці, які зазнають впливу нітратів, підвищується відповідно в 2,2 та 1,9 раза порівняно з показниками груп контролю ( $p < 0,05$ ). Вміст малонового альдегіду зростає у 1,7 раза в ІБ групі та в 1,5 раза - у тварин ІІБ групи ( $p < 0,05$ ). Не виявлено вірогідної відмінності і в активності каталази тканин пародонта у тварин дослідних груп різного віку. Підвищення рівня проміжного та одного із кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та недостатність ферменту АОЗ вказує на посилення пероксидації біологічних мембран у тканинах пародонта тварин, які зазнають хронічного впливу нітратів.

Активізація прооксидантної системи та недостатність системи АОЗ виявлені також у крові тварин, що вказує на розвиток оксидативного стресу в організмі в цілому. Ступінь ОМБ плазми крові щурів дослідної групи віком 2 місяці становив  $25,8 \pm 1,8$  о.о.г./хв.г, що на 60,2% вище показників групи контролю ( $p < 0,05$ ). У одномісячних щурів ступінь ОМБ сягнув  $29,3 \pm 1,96$  о.о.г./хв.г, що на 70,3% вище, ніж у тварин групи порівняння ( $p < 0,05$ ). Інтенсифікація ОМБ із зменшенням віку тварини свідчить про підвищену чутливість несформованих систем молодого організму до дії патологічного чинника.

Аналіз показників системи глутатіону не виявив відмінностей між даними обох груп спостереження. Рівень HS-груп у сироватці крові тварин дослідної групи віком 1 місяць становив  $350,0 \pm 24,14$ , що на 35,5% нижче показників групи порівняння -  $542,4 \pm 29,02$  пмоль/мл ( $p < 0,05$ ). У двомісячних тварин даний показник був  $326,8 \pm 15,16$ , що на 39,7% нижче, ніж у тварин контрольної групи  $541,8 \pm 22,29$  пмоль/мл ( $p < 0,05$ ).

Середнє значення рівня Г-SH в еритроцитах у тварин ІБ групи склало  $655,1 \pm 102,85$ , у ІІБ -  $596,8 \pm 77,60$  пмоль/мл, що відповідно на 33,7% та на 37,2% менше показників груп порівняння.

Стан прооксидантно-антиоксидантної системи щурів за умов хронічної нітратної інтоксикації (X±x)

Показники	Тварини віком 1 місяць		Тварини віком 2 місяці	
	ІА група (x=10)	ІБ група (x=9)	ІІА група (x=10)	ІІБ група (x=10)
МА, мкмоль/мг білка	415,5±15,77	714,1±32,68*	424,4±20,0	654,4±29,96**
ДК, нмоль/мг білка	1,0±0,02	2,2±0,12*	1,1±0,05	2,1±0,14**
Каталаза, мкмоль/хв·мг білка	27,9±2,52	16,9±1,69*	28,1±1,67	16,2±2,27**
HS-групи, шмоль/мл	542,4±29,02	350,0±24,14*	541,8±22,29	326,8±15,16**
Г-SH, нмоль/мл	987,9±21,18	655,1±102,85*	949,6±33,95	596,8±77,60**
Глутатіон-S-трансфераза, нмоль/хв·мг білка	10,1±0,64	4,0±0,92*	9,1±0,71	4,7±0,91**
Глутатіонпероксидаза, нмоль/хв·мг білка	82,8±3,9	117,8±7,32*	87,0±3,05	122,1±3,75**
Глутатіонредуктаза, нмоль/хв·мг білка	4,1±0,15	2,5±0,37*	4,3±0,06	2,8±0,15**
ОМБ, о.о.г./хв·г	17,2±1,33	29,3±1,96*	16,1±1,43	25,8±1,8**
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , мкмоль/л	14,9±0,78	26,4±1,41*	15,6±1,12	27,1±1,18**

**Примітка.** \* - вірогідна відмінність показників ІА та ІБ груп p<0,05

\*\* - вірогідна відмінність показників ІІА та ІІБ груп p<0,05

^ - вірогідна відмінність показників ІБ та ІІБ груп p<0,05

Зниження рівня HS-груп, Г-SH можна пояснити витратою даних метаболітів у процесах обміну нітратів в організмі (нітрат/нітритредуктазних, відновлення метгемоглобіну, формування транспортних форм NO тощо) [6,13].

Активність ГП еритроцитів щурів, які піддавалися хронічній нітратній інтоксикації, підвищилась на 42,3% у тварин віком 1 місяць та на 40,3% - у двомісячних щурів порівняно з групами контролю (p<0,05). Активність ГР у щурів груп спостереження знизилась відповідно до віку на 39% та 34,9% проти показників груп порівняння (p<0,05). Активність Г-ST плазми крові тварин обох дослідних груп різко зменшилась, зокрема у ІБ групі активність падала на 60,4%, а в ІІБ - на 48,4% порівняно з тваринами груп контролю (p<0,05).

Система глутатіону та глутатіонзалежних ферментів бере активну участь у процесах детоксикації ксенобіотиків та антипероксидного захисту і є одним із основних показників загально-адаптаційного стану організму. Тому зміна активності всіх глутатіонзалежних ферментів та зниження рівня основного субстрату - відновленого глутатіону - дає підстави говорити про розбалансованість на недостатність як антипероксидної, так і детоксикаційної ланок системи, що призводить до зниження компенсаторно-адаптаційних можливостей організму.

Таким чином, аналіз прооксидантно-антиоксидантної системи тканин пародонта та крові тварин за умов ХНІ виявив активацію перекисного окиснення ліпідів і білків на фоні недостатності АОЗ, у тому числі антипероксидної і детоксикаційної компонент глутатіонової системи. Дані механізми разом із гіпоксією є основою патогенетичної дії ксенобіотика, що зумовлює особливості перебігу захворювань пародонта.

## Висновки

1. Тривале надходження нітратів до організму щурів призводить до розвитку хронічного хімічного стресу, що візуально в експерименті проявляється зниженням ваги та зміною поведінки дослідних тварин.

2. ХНІ в обох дослідних групах призводить до розвитку оксидативного стресу та недостатності захисних механізмів антиоксидантного захисту як організму в цілому, так і тканин пародонта зокрема.

3. Вірогідної різниці між показниками прооксидантно-антиоксидантної системи у тварин різного віку не виявлено, проте прослідковуються тенденції до посилення процесів пероксидації та зриву основних ланок антиоксидантного захисту із зменшенням віку тварин.

## Перспективи подальших досліджень

Перспективою подальших досліджень є вивчення в експерименті впливу антиоксидантної терапії на показники прооксидантно-антиоксидантної системи за умов ХНІ у віковому аспекті.

**Література.** 1. Геруш І.В., Мецишен І.Ф. Стан глутатіонової системи крові за умов експериментального виразкового ураження гастродуоденальної зони та дії настійки ехінацеї пурпурової // Вісн. проблем біол. і мед. - 1998. - №7. - С.10-15. 2. Горішна О.В., Цебржинський О.І., Горішний Б.М. Вплив хронічної дії нітратів на прооксидантно-антиоксидантну систему печінки білих щурів залежно від віку // Експерим. і клініч. мед. - 2001. - №1. - С.50-51. 3. Кургалюк Н.М., Коцюруб А.В., Сагач В.Ф. Модифікація продукції оксиду азоту за умов гострої гіпоксії під впливом екзогенних інтермедіатів циклу Кребса // Фізіол. ж. - 2005. - Т.51, №4. - С.20-28. 4. Мецишен І.Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові // Бук. мед. вісник. - 1998. - Т.2, №1. - С.156-158. 5. Мецишен І.Ф., Григор'єва Н.П. Метод кількісного визначення HS-груп у крові // Бук. мед. вісник. - 2002. - Т.6, №6. - С.109-192. 6. Реутов В.П., Гоженко А.И., Насибуллин Б.А. и др. Анализ циклических процессов с участием оксида азота в организмах и молеку-

лярного азота в биосфере с позиций голографического принципа и принципа цикличности. - Одесский мединверситет. 2003. - 66с. 7. *Северина И.С.* Растворимая гуанилатциклаза в молекулярном механизме физиологических эффектов оксида азота // Биохимия. - 1998. - Т.63, №7. - С.939-947. 8. Сучасні методи експериментальних та клінічних досліджень Центральної науково-дослідної лабораторії БДМА / *Магальяс В.М., Міхеев А.О., Роговий Ю.С. та ін.*: Навчально-методичний посібник. - Чернівці: БДМА, 2001. - 42с. 9. *Травина О.В.* Руководство по биохимическим исследованиям. - М.: Медгиз, 1955. - 320с. 10. *Beutler E.* Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: in vitro and in vivo studies // J. Clin. Invest. - 1969. - Vol.48, №11. - P.1957-1965. 11. *Green L.C., Wanger D.A., Gvolowski T.J. et al.* Analysis of nitrate and N-15nitrate in biological fluids // Ann. Biochem. - 1982.-Vol.126, №1. - P.131-138. 12. *Habig H.W., Pabs M.J., Jacoby W.B.* Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. - 1974. - Vol.249, №22. - P.7130-7139. 13. *Spencer N., Zeng H., Patel R., Hogg N.* Reaction of S-Nitrozoglutathione with the heme group of deoxyhemoglobin // J. Biol. Chem. - 2000. - Vol.275, №47. - P.36562-36567.

### **ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ НИТРАТНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НА СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У КРЫС**

*О.И. Годованец, М.М. Розжко, А.М. Эрстэнюк*

**Резюме.** Эксперимент проведен на одно- и двухмесячных крысах. Хроническая нитратная интоксикация моделировалась методом перорального введения нитрата натрия в

дозе 0,5 г/кг на протяжении 45 дней. Установлено повышенный уровень продуктов перекисидации белков и липидов на фоне снижения активности основных компонентов антиоксидантной защиты, в том числе недостаточности глутатионовой системы.

**Ключевые слова:** нитраты, крысы, возраст, прооксидантная система, система антиоксидантной защиты.

### **EFFECT OF CHRONIC NITRATE INTOXICATION ON THE STATE OF THE SYSTEM OF ANTIOXIDANT PROTECTION IN RATS**

*O.I. Hodovanets', M.M. Rozhko\*, A.M. Erstenluk\**

**Abstract.** The experiment has been carried out on one and two-month rats. Chronic nitrate intoxication was simulated via oral introduction of sodium nitrate in a dose of 0.5 g/kg during 45 days. An elevated level of protein and lipid peroxidation products against a background of diminished activity of the basic components of antioxidant protection, including glutathione system insufficiency, has been established.

**Key words:** nitrates, rats, age, prooxidant system, antioxidant protection system.

**Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)  
State Medical University (Ivano-Frankivsk)\***

*Clin. and experim. pathol. - 2007. - Vol.6, №3.-P.21-24.  
Надійшла до редакції 09.08.2007*

Рецензент - проф. І.Ф. Мещишен