

DOI: 10.32999/ksu2524-0838/2020-28-9

УДК 616-099+504

Цвях О.О.¹, Ларичева О.М.², Вичалковська Н.В.¹,
Тарасова С.М.¹, Воробйова О.В.¹

ЗМІНА ОКРЕМИХ ПОКАЗНИКІВ НІТРОЗАТИВНОГО ТА ОКИСНОГО СТРЕСУ В НИРКАХ ЩУРІВ ПРИ ТРИВАЛОМУ ВПЛИВІ НІТРАТІВ

¹Миколаївський національний університет імені В.О.Сухомлинського,

²Чорноморський національний університет імені Петра Могили,

м. Миколаїв, Україна

e-mail: tsvyakho@gmail.com

Забруднення навколишнього середовища нітратами та їхній негативний вплив на організм людини та тварин роблять проблему вивчення впливів нітратів на біохімічні процеси особливо актуальною, це має не лише теоретичне, але і практичне значення. Основною причиною нітратної інтоксикації у тварин є споживання рослин, які мають властивість до підвищеної кумуляції азоту. Багато нітратів нагромаджується у кормових культурах у періоди посух, при недостатній інсоляції та зниженні температури ґрунту і повітря, при недостатній кількості окремих мікроелементів. Також ще одним із джерел потрапляння нітратів і нітритів в організм тварин і людини, є вода, при використанні свердловин та відкритих джерел забруднених великою кількістю азотних мінеральних та органічних добрив. Переважна більшість екзогенних та ендогенних нітратів і нітритів екскретується з організму людини та тварин переважно нирками, але їх дія призводить до порушення цілісності клітинної мембрани нирок та активації процесів вільнорадикального окиснення макромолекул.

В організмі нітрати здатні відновлюватися до нітрит-іонів, які в свою чергу здатні перетворюватися на оксид-азоту, який в надлишку може призводити до розвитку нітрозативного стресу внаслідок утворення активних форм азоту, які в ряді реакцій можуть призводити до утворення вільних радикалів, зокрема ОН та як наслідок активації процесів перекисного окиснення ліпідів.

Досліджено вплив 30-добового надходження натрій нітрату концентрацією 500 мг/кг маси тіла на стан нирок статевозрілих щурів і зміну таких показників, як активність аргінази та вміст пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів. Нітратна інтоксикація призводить до активації процесів нітрозативного стресу, що проявляється у зниженні активності аргінази та зростанні рівня пероксинітриту, а також призводить до активації процесів перекисного окиснення ліпідів і до активації ензиматичного антиоксидантного захисту в нирках щурів.

Ключові слова: нирки, активність аргінази, вміст пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів, нітратна інтоксикація, нітрозативний стрес, оксидативний стрес.

Tsviakh O.O., Larycheva O.M., Vychalkovska N.V.,
Tarasova S.M., Vorobiova O.V.

CHANGE OF INDIVIDUAL INDICATORS OF NITROSATIVE AND OXIDATIVE STRESS IN RATID KIDNEYS WITH LONG-TERM INFLUENCE OF NITRATES

The problem of studying the effects of nitrates on biochemical processes is particularly relevant because of nitrate pollution and their negative impact on humans and animals. It has not only theoretical but also practical significance. The main cause of nitrate intoxication in animals is the consumption of plants that have the property of increased nitrogen accumulation. Many nitrates accumulate in forage crops during periods of drought, with insufficient insolation and lowering of soil and air temperature, with insufficient amount of microelements. Water is also another source of nitrates and nitrites in animals, including humans. This happens with the uncontrolled use of water from wells with large amounts of nitrates and nitrites or from open water contaminated with nitrogen mineral and organic fertilizers. The majority of exogenous and endogenous nitrates and nitrites, excreted from humans and animals mainly by the kidneys. At the same time, their action leads to a violation of the integrity of the cell membrane of the kidneys and to activation of the processes of free radical oxidation of macromolecules.

In the body, nitrates able to reducing to nitrite ions, which in turn, able for converting into nitric oxide, which in excess can lead to the development of nitrosative stress due to the formation of reactive nitrogen forms. These forms, in a number of reactions can lead to the formation of free radicals, in particular $OH \cdot$ and, as a consequence, the activation of lipid peroxidation.

The effect of a 30-day intake of nitrates with a concentration of 500 mg / kg body weight on the kidney status of adult rats and changes in such indicators as arginase activity and content of peroxinitrites of alkali and alkaline earth metals is studied. Nitrate intoxication leads to the activation of nitrosative stress processes, which manifested in a decrease in arginase activity and a slight increase in peroxinitrite levels, as well as leads to activation of lipid peroxide oxidation processes and to activation of enzymatic antioxidant protection in rat kidneys.

Key words: *kidneys, arginase activity, peroxinitrite levels, nitrate intoxication, nitrosative stress, oxidative stress.*

В організмі нітрати, що надходять з продуктами харчування та водою [1], здатні відновлюватися до нітрит-іонів, які в свою чергу здатні перетворюватися на оксид-азоту (NO), який в надлишку може призводити до розвитку нітрозативного стресу внаслідок утворення активних форм нітрогену - катіон нітрозонію (NO^+), нітроксил-аніону (NO^-) або пероксинітриту ($ONOO^-$). Однак, коли кількість активних форм азоту перевищує здатність антиоксидантного захисту, нітрозативний стрес, що виникає, може викликати незворотні пошкодження в усіх біомолекулах, зокрема в ліпідах, ДНК, білках [2].

Також NO утворюється в організмі при окисленні амінокислоти L-аргініну під дією ферментів NO-синтаз (NOS) з одночасним синтезом цитруліна [3]. Але конкурентним до NO-синтазного шляху перетворення L-аргініну є неокисний аргіназний шлях [4]. Раніше було з'ясовано, що в умовах надлишкового нітратного навантаження знижується активність ферментів аргіназного шляху (аргінази та орнітин декарбоксілази). Зниження активності аргінази може посилювати біосинтез NO і NO-залежні процеси в організмі [5]. Але залишається питання на скільки змінюється рівень пероксинітритів за дії хронічного

надмірного надходження нітратів та як змінюється стан вільнорадикального окиснення ліпідів у нирках щурів за цих умов.

Робота є фрагментом планової наукової теми кафедри хімії Миколаївського національного університету імені В.О. Сухомлинського: «Особливості метаболізму та морфофункціонального стану вісцеральних систем за умов впливу екологічно небезпечних чинників» (zareєстрована в УкрІНТЕІ за № 0118U003395 від «02» лютого 2018 р.).

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження виконані на 10 щурах-самцях лінії Вістар (Wistar) середньою масою тіла 320-360 г. Тварини були розділені на дві групи: група інтактних тварин (n=5), що утримувались в стандартних умовах і не піддавались жодному впливу; експериментальна група тварин (n=5), яким щоденно протягом 30 діб внутрішньошлунково за допомогою зонду вводили розчин натрію нітрату (NaNO₃) концентрацією 500 мг/кг маси тіла, що дорівнює ¹/₁₅ DL₅₀ [6].

При роботі з лабораторними тваринами дотримувались правил «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006, ст. 26), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2013).

Загальну аргіназну активність визначали шляхом визначення різниці концентрації L-орнітину до та після інкубації в фосфатному буферному розчині, що містить L-аргінін. Концентрацію L-орнітину визначали по продукту в реакції із реактивом Chinard в модифікації Храмова. Пероксинітриди лужних та лужно-земельних металів визначали за реакцією відновлення атомарного йоду із солей калію. Рівень пероксидного окиснення ліпідів в тканинах нирок оцінювали за вмістом дієнових, трієнових та оксодієнових кон'югатів і за утворенням в реакції з тіобарбітурової кислотою (ТБК) забарвленого триметинового комплексу [7]. Загальну антиоксидантну активність оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) за час 1,5-годинної інкубації в прооксидантному залізоаскорбатному буферному розчині. Активність ензиматичної ланки оцінювали за активністю супероксиддисмутази (СОД) (за методом Беркало Л.В. із співавторами (2003)) і каталази (за методом М.Королюка).

Отримані дані обробляли методами варіаційної статистики в програмі Microsoft Excel та Statistica 6 (Statsoft, США). Перевірку на нормальний розподіл проводили з використанням W-критерію Шапіро-Уїлка. Різницю між двома середніми оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента та вважали статистично достовірною, якщо вірогідність різниці між середніми складала p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При використанні моделі інтоксикації нітритом натрію у дозі 500мг/кг протягом 30 діб в нирках щурів істотно змінилася активність аргінази (рис.1).

Аргіназна активність в нирках щурів дослідної групи знизилася у 3,7 рази (p<0,0025).

При аналізі впливу нітратної інтоксикації на рівень пероксинітриду були виявлені деякі зміни. Встановлено, що вміст пероксинітритів в дослідній групі має тенденцію до зростання (виріс на 9,76 %) (рис. 2).

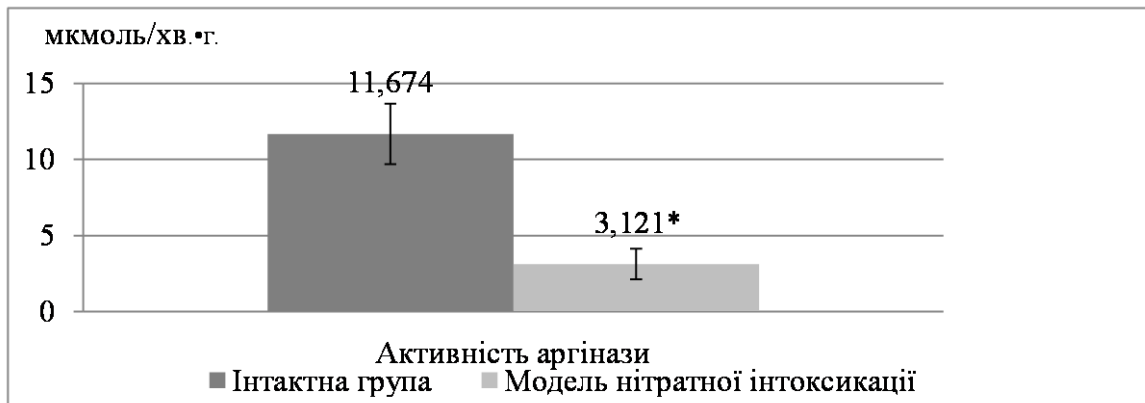


Рис. 1. Зміни активності аргінази при моделюванні хронічного надмірного надходження нітратів, * - різниця між середніми двох груп вірогідна на рівні значущості $p < 0,0025$.

Концентрація дієнових кон'югатів у тканині нирок експериментальної групи порівняно з контрольною збільшилась у 2,2 раза ($p < 0,05$), трієнових кон'югатів \square у 1,5 раза ($p < 0,001$), оксодієнових \square у 1,4 раза ($p < 0,01$) (рис. 3).

Концентрація ТБК-АП-0 у тканині нирок експериментальної групи у порівнянні з показниками у інтактних тварин збільшилась у 1,7 раза ($p < 0,01$) (рис. 4).

Супероксиддисмутазна активність в тканині нирок експериментальної групи порівняно з інтактними тваринами збільшилась у 3,9 раза ($p < 0,01$), а каталазна активність достовірно не змінилася (рис. 5).

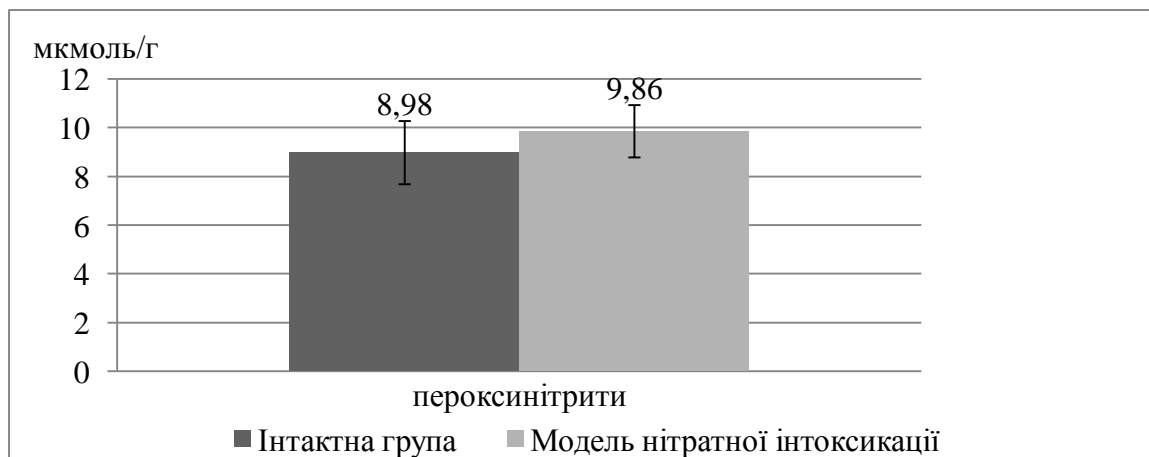


Рис. 2. Зміни рівня пероксинітритів лужних та лужно-земельних металів при моделюванні хронічного надмірного надходження нітратів.

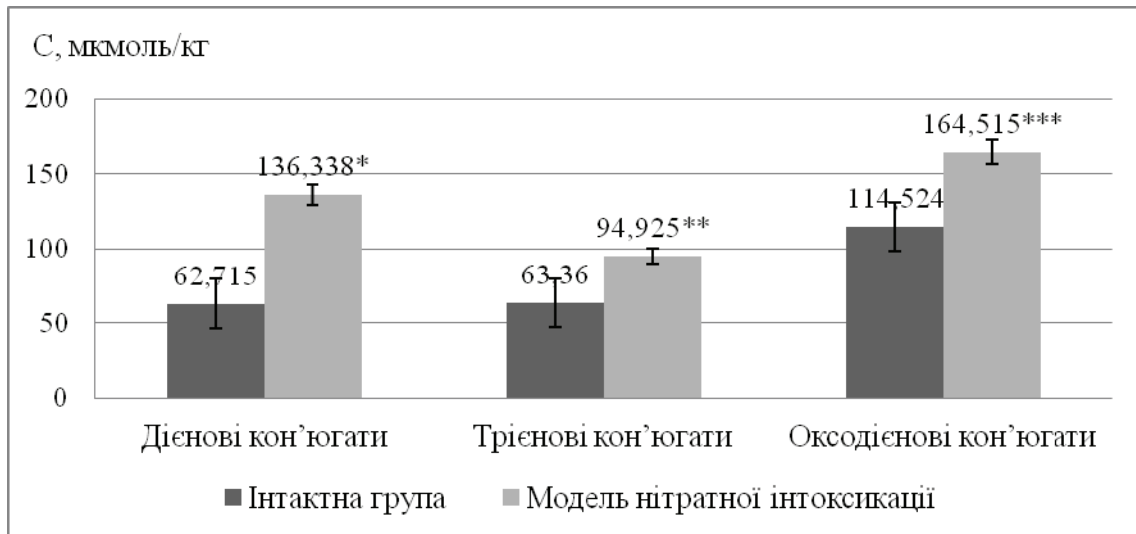


Рис. 3. Зміни концентрації продуктів пероксидного окиснення ліпідів у тканинах нирок щурів при моделюванні хронічного надмірного надходження нітратів, * - різниця між середніми двох груп по дієновим кон'югатам вірогідна на рівні значущості $p < 0,05$, ** - різниця між середніми двох груп по трієновим кон'югатам вірогідна на рівні значущості $p < 0,001$, *** - різниця між середніми двох груп по оксодієновим кон'югатам вірогідна на рівні значущості $p < 0,01$.

Отримані дані вказують на те, що вплив хронічного надходження нітратів концентрацією 500 мг/кг маси тіла призводить до виникнення нітрозативного стресу, активації процесів пероксидного окиснення ліпідів і до активації антиоксидантного захисту в тканинах нирок щурів.

Отримані нами дані, що нітрати гальмують роботу аргінази, посилюють генерацію вільних радикалів, призводять до зростання продуктів пероксидного окиснення ліпідів в тканинах нирок, збігаються з даними інших авторів отриманих при вивченні крові та інших органів за умов хронічного впливу нітратів [8 – 10].

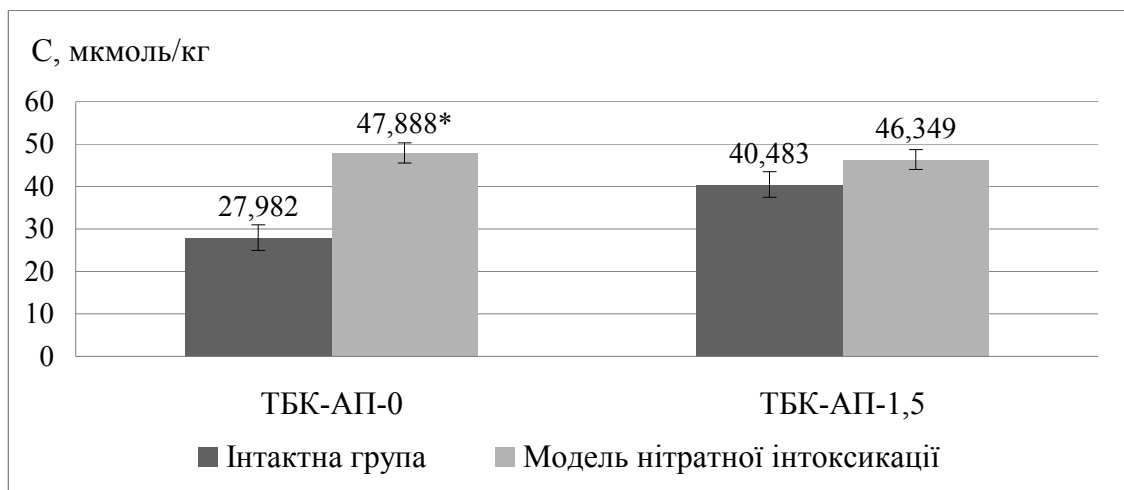


Рис. 4. Зміни концентрації ТБК-АП у тканинах нирок щурів при моделюванні хронічного надмірного надходження нітратів, * - різниця між середніми двох груп вірогідна на рівні значущості $p < 0,01$.

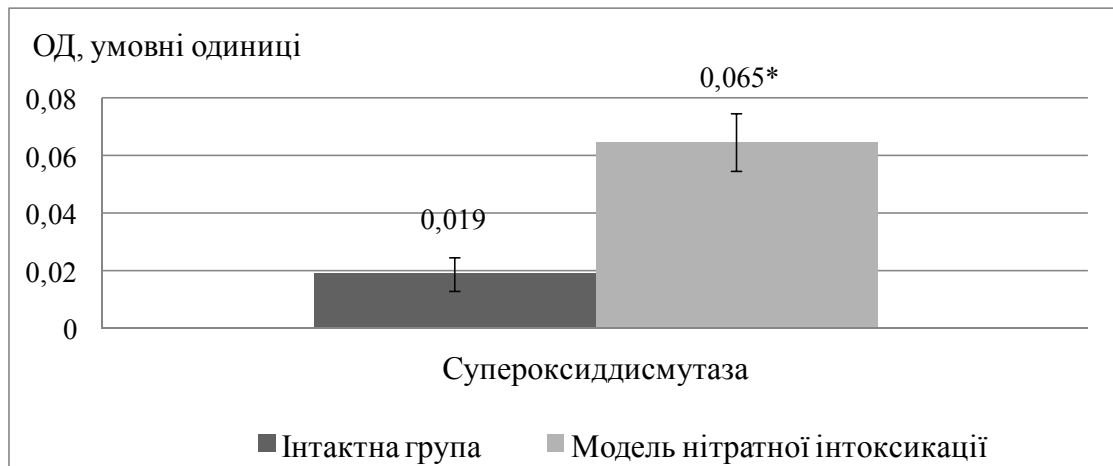


Рис. 5. Зміна активності СОД у тканинах нирок щурів при моделюванні хронічного надмірного надходження нітратів, * - різниця між середніми двох груп вірогідна на рівні значущості $p < 0,01$.

ВИСНОВКИ

Хронічна інтоксикація нітратами (500 мг/кг) призводить до зниження аргіназної активності в нирках щурів у 3,7 рази на фоні незначного підвищення пероксинітритів, а також до активації процесів пероксидного окиснення ліпідів, про що можна судити по зростанню рівня продуктів перекисного окиснення: дієнових кон'югатів - у 2,2 рази ($p < 0,05$), трієнових кон'югатів – у 1,5 рази ($p < 0,001$), оксодієнових – у 1,4 рази ($p < 0,01$), також до активації окремих ланок ферментного антиоксидантного захисту в тканинах нирок щурів – зростання активності супероксиддисмутази у 3,9 рази ($p < 0,01$) без зміни активності каталази.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гунчак ВМ. До токсикології нітратів і нітритів у тварин. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. 2013; 3 (57):62-70.
2. Гутый БВ, Гуфрий ДФ, Гунчак ВМ, Харив ИИ, Хомик РИ, Васив РА, Слободюк НМ, Назарук НВ, Губерук ВО, Семанюк ВИ, Гайдюк МБ, Гута ЗА, Вищур ВЯ, Данко ГВ. Прооксидантно-антиоксидантное равновесие организма бычков за нитратной нагрузки [Internet] Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. 2015; 2(62). [cited 2020 June 02] Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/prooksidantno-antioksidantnoe-ravnovesie-organizma-bychkov-za-nitratnoy-nagruzki>
3. Stuehr DJ. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. The J. of Nutrition [serial online], 2004;134 (10), Oct.: 2748S–2751S. DOI: 10.1093/jn/134.10.2748S
4. Wu G., Bazer F.W., Davis T.A. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. Amino Acids. 2009; 37(1):153-168.
5. Хмиль ДА., Левков АА., Костенко ВА. Эффективность сочетанного применения L-аргинина и ингибитора ядерного фактора kb для коррекции дезорганизации соединительной ткани кожи крыс при избыточном поступлении нитрата натрия в организм. Журнал ГрГМУ. [Internet] 2018; 1. [cited 2020 June 02] Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/effektivnost-sochetannogo-primeneniya-l-arginina-i-ingibitora-yadernogo-faktora-b-dlya-korreksii-dezorganizatsii-soedinitelnoy-tkani>

6. Akimov OYe., Kostenko VO. Functioning of nitric oxide cycle in gastric mucosa of rats under excessive combined intake of sodium nitrate and fluoride. *The Ukr. Biochem.J.* 2016; 88(6): 70-75.
7. Беркало ЛВ., Бобович НО., Боброва НО. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. Під ред. Кайдашева ПП.. Полтава: Полімет; 2003. 319 с.
8. Акимов ОЕ., Ковалёва ИА., Костенко ВА. Влияние энтеросорбентов на метаболизм аргинина и процессы пероксидного окисления липидов в крови крыс в условиях хронической сочетанной интоксикации нитратом и фторидом натрия. *Вестник АГИУВ.* 2016; 3. [cited 2020 June 8] Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-enterosorbentov-na-metabolizm-arginina-i-protsessy-peroksidnogo-okisleniya-lipidov-v-krovi-krys-v-usloviyah-hronicheskoy>
9. Кулицька МІ. Динаміка метаболічних змін в організмі щурів за умов ураження нітритом натрію. *Вісник проблем біології і медицини.* 2015; 2. [cited 2020 June 08] Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/dinamika-metabolichnih-zmin-v-organizmi-schuriv-za-umov-urazhennya-nitritom-natriyu>.
10. Салига НО. Показники антиоксидантної системи щурів, уражених нітритом натрію та їх корекція L-глутаміною кислотою. *Світ медицини та біології.* 2016; 2: 145-148.

REFERENCES

1. Gunchak VM. Do toksykologii' nitrativ i nitrytiv u tvaryn. *Naukovyj visnyk LNUVMBT imeni S.Z. Gzhyck'kogo.* – 2013;57(3): 62-70. [in Ukrainian]
2. Hutyi BV, Hufryi DF, Hunchak VM, Kharyv YY, Khomyk RY, Vasyv RA, Slobodiuk NM, Nazaruk NV, Huberuk VO, Semaniuk VY, Haidiuk MB, Huta ZA, Vyshchur VIa, Danko HV. Prooksydantno-antyoksydantnoe ravnovesye orhanyzma bichkov za nytratnoi nahruzky [Internet] *Naukovyi visnyk Lvivskoho natsionalnoho universytetu veterinaryarnoї medytsyny ta biotekhnolohii imeni S.Z. Gzhytskoho.* 2015; 2(62). [cited 2020 June 2] Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/prooksydantno-antioksydantnoe-ravnovesie-organizma-bychkov-za-nitratnoy-nagruzki>. [in Russian]
3. Stuehr DJ. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *The J. of Nutrition* [serial online], 2004; 134 (10), Oct.: 2748S–2751S. DOI: 10.1093/jn/134.10.2748S
4. Wu G, Bazer FW, Davis TA. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease . *Amino Acids.* 2009; 37(1): 153-168.
5. Khmyl DA., Levkov AA., Kostenko VA. Effektyvnost sochetannogo prymereniya L-arhynyna y ynhybytora yadernoho faktora kb dlia korrektsyy dezorhanyzatsyy soedynytelnoi tkany kozhy kris pry yzbitochnom postuplenyy nytrata natryia v orhanyzm. *Zhurnal HrHMU.* [Internet] 2018; 1. [cited 2020 June 2] Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/effektivnost-sochetannogo-primereniya-l-arginina-i-ingibitora-yadernogo-faktora-b-dlya-korrektsii-dezorganizatsii-soedinitelnoy-tkani> [in Russian]
6. Akimov OYe., Kostenko VO. Functioning of nitric oxide cycle in gastric mucosa of rats under excessive combined intake of sodium nitrate and fluoride. *The Ukr. Biochem.J.* 2016; 88(6): 70-75.
7. Berkalo LV., Bobovych OV., Bobrova NO. Metody klinichnyh ta eksperymental'nyh doslidzhen' v medycyni. pid red. I.P. Kajdasheva. – Poltava: Polimet; 2003. 320 p. [in Ukrainian]
8. Akimov OE., Kovaljova IA., Kostenko VA. Vlijanie jenterosorbentov na metabolizm arginina i processy peroksidnogo okislenija lipidov v krovi krysv v uslovijah hronicheskoy

- sochetannoj intoksikacii nitratom i fluoridom natrija. Vestnik AGIUV. 2016; 3. [cited 2020 June 8] Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-enterosorbentov-na-metabolizm-arginina-i-protsessy-peroksidnogo-okisleniya-lipidov-v-krovi-krys-v-usloviyah-hronicheskoy>. [in Russian]
9. Kulic'ka MI. Dynamika metabolichnyh zmin v organizmi shhuriv za umov urazhennja nitrytom natriju // Visnyk problem biologii' i medycyny. 2015; 2. [cited 2020 June 8] Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/dinamika-metabolichnih-zmin-v-organizmi-schuriv-za-umov-urazhennya-nitritom-natriyu>. [in Ukrainian]
 10. Salyga NO. Pokaznyky antyoksydantnoi' systemy shhuriv, urazhenyh nitrytom natriju ta i'h korekcija L-glutaminovoju kyslotoju. Svit medycyny ta biologii'. 2016; 2: 145-148. [in Ukrainian]

Стаття надійшла до редакції 08.06.2020.

The article was received 08 June 2020.