

УДК: 615.099:612.08:54

МЕТАБОЛІЗМ ОКСИДУ АЗОТА ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

Микитенко А.О.

Полтавський державний медичний університет, Полтава, Україна

Експериментально було показано, що етанол впливає на продукцію оксиду азоту у щурів, проте оксид азоту може виконувати як захисний ефект шляхом послаблення шкідливого впливу етанолу на мікроциркуляцію печінки, так і призводити до ураження печінки активними формами азоту. Метою дослідження було вивчення змін в роботі циклу оксиду азоту за умов моделювання хронічної алкогольної інтоксикації у щурів. Експерименти були виконані на 30 білих статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар, вагою 180–220 г. Тварини були розділені на 2 групи: I – контрольна (n=6); II група – тварини, яким моделювали алкогольний гепатит (n=24) методом примусової переривистої алкоголізації протягом 5 діб, з повтором через дві доби шляхом внутрішньоочеревинного введення 16,5 % розчину етанолу на 5 % розчині глюкози, з розрахунку 4 мл/кг маси тіла. Виведення тварин з експерименту відбувалося на 10, 14, 21 та 28 добу шляхом забору крові з правого шлуночка серця під тіопенталовим наркозом. В гомогенаті печінки щурів визначали активність індуктибельної та конститутивних ізоформ NO-синтази та концентрацію нітритів і пероксинітриту лужних та лужноземельних металів, активність нітритредуктази, нітратредуктази та аргінази, нітрозотіолів. Моделювання хронічної алкогольної інтоксикації на 10–28 добу призвело до порушення утворення та метаболізації оксиду азоту з переважним утворенням токсичних його метаболітів пероксинітритів та нітритів, що загрожує розвитком нітрозативного стресу в печінці. Хронічна алкогольна інтоксикація на 10–28 добу експерименту супроводжувалася різким зниженням активності аргіназозалежного шляху метаболізму аргініну в печінці щурів, що свідчить про порушення процесів дезамінування в циклі Кребса-Хендзелейта.

Ключові слова: нітрити, NO-синтази, пероксинітрит, алкоголь, печінка, щури.



Цитуйте українською: Микитенко А.О. Метаболізм оксиду азоту за умов моделювання хронічної алкогольної інтоксикації. Експериментальна і клінічна медицина. 2023;92(1):13-20. <https://doi.org/10.35339/ekm.2023.92.1.myk>

Cite in English: Mykytenko A.O. Metabolism of nitric oxide under the conditions chronic alcohol intoxication modelling. Experimental and Clinical Medicine. 2023;92(1):13-20. <https://doi.org/10.35339/ekm.2023.92.1.myk> [in Ukrainian].

Вступ

Хронічне надмірне вживання алкоголю порушує нормальну роботу органів і викликає структурні пошкоджен-

ня практично кожної тканини тіла. Печінка особливо чутлива до пошкоджень, спричинених алкоголем. Недавні дослідження показують, що в усьому світі го-

ловною причиною захворювань печінки є алкоголь [1]. За даними ВООЗ, алкоголь є причиною 48 % смертей від цирозу печінки (53 % у чоловіків і 45 % у жінок) у всьому світі. В Європі алкогольна хвороба печінки (АХП) є основною причиною смерті серед дорослих, які вживають алкоголь. Це пов'язано з тим, що у Європі найвищий у світі показник споживання алкоголю на душу населення, який становить 9,8 літра в рік [2; 3]. Хронічне вживання етанол-місних напоїв приблизно від 20 до 50 г/день для жінок або від 60 до 80 г/день для чоловіків підвищує ризик розвитку алкогольного цирозу печінки [4].

Прогресування фіброзу печінки є критичним фактором у пацієнтів із хронічними захворюваннями печінки, оскільки розвинутий фіброз є передумовою для розвитку цирозу та його ускладнень, а також сприяє розвитку гепатоцелюлярної карциноми. На даний момент єдиним ефективним підходом до уповільнення прогресування фіброзу або навіть його регресія є припинення вживання алкоголю [5].

Фіброз добре обґрунтований при багатьох хронічних захворюваннях печінки, включаючи алкогольний гепатит, стеатогепатит і хронічну обструкцію венозного відтоку. Ці стани зазвичай починаються з фази запалення, яка прогресує до фіброзу після хронічного оксидативного стресу.

Під час запальної фази інфільтрація поліморфноядерними нейтрофілами супроводжується підвищенням рівня цитокінів, хемокінів, активних форм кисню (АФК) та посиленням експресії індукцибельної NO-синтази (iNOS). Лімфоцити також рекрутуються через портальний тракт, синусоїди та печінкову вену. Клітини Купфера та лейкоцити здатні утворювати велику кількість оксиду азоту (NO) і цитокінів, особливо трансформуючий фактор росту- β (TGF- β)

і фактор некрозу пухлин- α (TNF- α). Активація зірчастих клітин призводить до збільшення їх проліферації, рухливості, скоротливості та синтезу екстрацелюлярного матриксу печінки.

Точний механізм активації зірчастих клітин нез'ясований, але асоційовані білки були ідентифіковані. Цитокіни відіграють вирішальну роль у формуванні фіброзу. Роль NO у формуванні фіброзу не настільки чітко зрозуміла. У пацієнтів із цирозом печінки підвищений опір портального кровотоку асоціюється з порушенням біодоступності NO [6].

Експериментально було показано, що етанол впливає на продукцію оксиду азоту у щурів. Також, було припущено, що NO має можливий захисний ефект шляхом послаблення шкідливого впливу етанолу на мікроциркуляцію печінки. Однак хронічне вживання етанолу, може призводити до ураження печінки, викликаного NO. Крім того, було виявлено, що тривале годування щурів етанолом знижує як продукцію оксиду азоту, так і протипухлинну активність клітин Купфера [7].

Більшість активних форм азоту (АФА), знайдених *in vivo*, походять від NO. Не зрозуміло, чи є утворення NO захисним чи ушкоджуючим механізмом при АХП. Наприклад, звуження судин печінки, спричинене гострим гепатитом або цирозом печінки, принаймні частково, є наслідком низької продукції NO. Оксид азоту також є антиапоптичним фактором у гепатоцитах і необхідний для нормальної регенерації печінки, також, він може припинити ланцюгові реакції перекисного окислення ліпідів, атакуючи пероксидні радикали ліпідів. Дослідження на підтримку гіпотези, що NO відіграє захисну роль при АХП, показали, що інгібітор NOS [метиловий ефір N(G)-нітро-L-аргініну (L-NAME)] загострює експериментальну АХП, і що

добавки аргініну усувають пошкодження печінки, спричинені етанолом. Проте NO також відіграє потенційно шкідливу роль у розвитку АХП, утворюючи сильні реакційноздатні речовини, зокрема, пероксинітрит. Ці АФА, отримані з NO, можуть викликати реакції нітрування (наприклад, утворення 3-нітротирозину) і реакції нітרוзування (наприклад, утворення нітрозотіолу), а також реакції окислення під час впливу алкоголю. Реакційноздатні проміжні продукти, що утворюються під час пероксинітритної деградації, також можуть викликати одноелектронні реакції окислення з етанолом, що призводить до утворення гідроксиетиллових радикалів [8].

Таким чином, NO може відіграти подвійну роль при алкогольному ураженні печінки, опосередковуючи як захисні ефекти, так і пошкодження тканин через надмірну продукцію АФА. Ці події *in vivo* критично залежать від типу клітини, ізоформи NOS та стадії захворювання.

Мета дослідження вивчити зміни в роботі циклу оксиду азоту за умов моделювання хронічної алкогольної інтоксикації у щурів.

Матеріали і методи дослідження

Експерименти виконані на 30 білих статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар, вагою 180–220 г. Тварини були розділені на 2 групи: I – контрольна (n=6); II група – тварини, яким моделювали алкогольний гепатит (n=24) методом примусової переривистої алкоголізації протягом 5 діб, з повтором через дві доби шляхом внутрішньоочеревинного введення 16,5 % розчину етанолу на 5 % розчині глюкози, з розрахунку 4 мл/кг маси тіла [9]. До контрольної групи увійшли тварини, яким протягом усього терміну дослідження проводили аналогічні маніпуляції, але вводили фізіологічний розчин. Умови утримання

тварин у віварію стандартні. Виведення тварин з експерименту відбувалося на 10, 14, 21 та 28 добу шляхом забору крові з правого шлуночка серця під тіопенталовим наркозом. Об'єктом досліджень була сироватка крові та печінка. Під час експериментів дотримувались рекомендацій «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) у відповідності до «Загальних принципів експериментів на тваринах» схвалених I Національним конгресом з біоетики, та вимогами «Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» (2012).

В гомогенаті печінки щурів визначали активність індукцибельної (iNOS), конститутивних ізоформ NO-синтази (cNOS) та концентрацію нітритів і пероксинітриту лужних та лужноземельних металів, активність нітритредуктаз, нітратредуктаз та аргінази [10], нітрозотіолів [11].

Статистичну обробку результатів біохімічних досліджень здійснювали використовуючи попарне порівняння за допомогою непараметричного методу Мана-Вітні. Всі статистичні обрахунки проводились в програмі Microsoft Office Excel та її розширення Real Statistics 2019. Різницю вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

При біохімічних дослідженнях печінки щурів встановлено, що активність індукцибельної NO-синтази на 21 добу експерименту була підвищена в 3,69 рази порівняно з контролем (таблиця). На 21 добу експерименту активність iNOS в печінці щурів підвищилась в 3,28 рази порівняно з 14 добою експерименту. На 28 добу – активність iNOS в печінці щурів знизилась в 2,68 рази порівняно з 21 добою експерименту.

Таблиця. Біохімічні показники циклу оксиду азоту в печінці щурів за умов моделювання хронічної алкогольної інтоксикації, $M \pm m$

Біохімічні параметри	Групи				
	Контроль, n=6	10 доба, n=6	14 доба, n=6	21 доба, n=6	28 доба, n=6
Активність індукцибельної NO-синтази, мкмоль/хв. на г білка	0,16±0,02	0,44±0,11	0,18±0,009	0,59±0,1*^	0,22±0,03^
Активність конститутивних NO-синтаз, мкмоль/хв. на г білка	0,027±0,0003	0,037±0,0004*	0,024±0,0001*^	0,027±0,0001^	0,026±0,0003^
Активність нітритредуктаз, мкмоль/хв. на г білка	3,11±0,51	7,73±1,51*	2,95±0,44^	2,29±0,32	8,08±0,03*^
Активність нітратредуктаз, мкмоль/хв. на г білка	3,71±0,81	6,84±1,28	2,09±0,28^	2,15±0,56	4,53±0,09^
Концентрація пероксинітриту, мкмоль/г	0,45±0,01	9,03±0,1*	7,18±0,2*^	5,57±0,03*^	6,57±0,03*^
Концентрація нітрозотіолів, мкмоль/г	0,36±0,02	3,41±0,21*	0,76±0,06*^	0,64±0,04*	0,55±0,006*^
Концентрація NO ₂ , нмоль/г	7,14±0,17	5,27±0,56*	8,21±0,11*^	10,84±0,78*^	7,8±0,17*^
Активність аргінази, мкмоль/хв. на г білка	1,8±0,1	0,77±0,03*	0,26±0,04*^	0,2±0,006*	0,69±0,03*^

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою щурів;

^ – $p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном експерименту.

Активність cNOS в печінці щурів на 10 добу експерименту підвищена в 1,37 рази, а на 14 добу – знижена в 1,13 рази по відношенню до контрольної групи тварин. На 14 добу експерименту активність cNOS в печінці щурів знизилась в 1,54 рази порівняно з 10 добою експерименту.

На 21 добу активність cNOS в печінці щурів підвищилась в 1,13 рази порівняно з 14 добою експерименту. На 28 добу активність cNOS в печінці щурів знизилась в 1,04 рази порівняно з 21 добою експерименту.

Активність нітритредуктаз в печінці щурів на 10 добу експерименту підви-

щена в 2,49 рази, а на 28 добу – в 2,6 рази порівняно з групою контролю. На 14 добу експерименту активність нітритредуктаз в печінці щурів знизилась в 2,62 рази порівняно з 10 добою експерименту. На 28 добу активність нітритредуктаз в печінці щурів підвищилась в 3,53 рази порівняно з 21 добою експерименту.

Активність нітратредуктаз в печінці щурів на 14 добу експерименту знижувалась в 3,27 рази порівняно з даними 10 доби експерименту. На 28 добу активність нітратредуктаз в печінці щурів підвищилась в 2,11 рази порівняно з 21 добою експерименту.

Концентрація пероксинітриту в печінці щурів на 10, 14, 21 і 28 добу експерименту була підвищена відповідно в 20,07, 15,96, 12,38 і 14,6 рази порівняно з контролем. На 14 добу експерименту концентрація пероксинітриту в печінці щурів знизилась в 1,26 рази порівняно з 10 добою експерименту. На 21 добу концентрація пероксинітриту в печінці щурів знизилась в 1,29 рази порівняно з 14 добою експерименту. На 28 добу експерименту концентрація пероксинітриту в печінці щурів підвищилась в 1,18 рази порівняно з 21 добою експерименту.

Концентрація нітрозотіолів в печінці щурів на 10, 14, 21 і 28 добу експерименту була підвищена відповідно в 9,47, 2,11, 1,78 і 1,53 рази порівняно з контролем. На 14 добу експерименту концентрація нітрозотіолів в печінці щурів знизилась в 4,49 рази порівняно з 10 добою експерименту. На 28 добу концентрація нітрозотіолів в печінці щурів знизилась в 1,16 рази порівняно з 21 добою експерименту.

Концентрація нітритів в печінці щурів на 10 добу експерименту була знижена в 1,35 рази і на 14, 21 та 28 добу експерименту була підвищена відповідно в 1,15, 1,52 і 1,09 рази порів-

няно з контролем. На 14 добу експерименту концентрація нітритів в печінці щурів підвищилась в 1,56 рази порівняно з 10 добою експерименту. На 21 добу концентрація нітритів в печінці щурів підвищилась в 1,32 рази порівняно з 14 добою експерименту. На 28 добу експерименту концентрація нітритів у печінці щурів знизилась в 1,39 рази порівняно з 21 добою експерименту.

Активність аргінази в печінці щурів на 10, 14, 21 і 28 добу експерименту була знижена відповідно в 2,34, 6,92, 9 і 2,61 рази порівняно з контролем. На 14 добу експерименту активність аргінази в печінці щурів знизилась в 2,96 рази порівняно з 10 добою експерименту. На 28 добу активність аргінази в печінці щурів підвищилась в 3,45 рази порівняно з 21 добою експерименту.

За результатами наших досліджень активність iNOS не відіграє важливої ролі в патогенезі порушення утворення та метаболізму оксиду азоту. Оскільки її активність статистично значуще підвищується лише на 21 день моделювання хронічної алкогольної інтоксикації, що хронологічно співпадає з найнижчою активністю аргіназ та нітритредуктаз.

На 10 добу моделювання хронічної алкогольної інтоксикації збільшується продукція оксиду азоту переважно від cNOS та нітритредуктаз, що призводить до підвищення концентрації пероксинітриту та нітрозотіолів і зниження нітритів. Такі зміни можуть свідчити про продукцію оксиду азоту від ендотеліальної NOS (eNOS) для вазодилатації судин печінки. А продукція оксиду азоту від нітритредуктаз призводить до надлишкової продукції NO, який перетворюється в пероксинітрит та нітрозотіоли. В подальшому нітрозотіоли можуть виступати ендотеліальним буфером оксиду азоту, який буде використовуватися для вазодилатації [12].

Ріст концентрації пероксинітриту потенціє ушкодження білків, ліпідів та нуклеїнових кислот клітин печінки [13]. Слід зазначити, що концентрації пероксинітриту та нітрозотіолів залишаються вищими за контрольні значення протягом усіх досліджуваних термінів моделювання хронічної алкогольної інтоксикації. Це може свідчити про розвиток ендотеліальної дисфункції у печінці, що супроводжується зниженням чутливості до оксиду азоту та його перерозподілом у більш токсичні форми [14]. Розвиток ендотеліальної дисфункції є характерним явищем, що супроводжує алкогольний гепатит [15; 16].

Зниження активності аргінази, що спостерігається на всіх термінах експерименту може призвести до гіпераргінінемії та супроводжуватись ушкодженням центральної нервової системи [17], що є також однією з патогенетичних ланок розвитку алкогольної енцефалопатії.

Література

1. Thomes PG, Rasineni K, Saraswathi V, Kharbanda KK, Clemens DL, Sweeney SA, et al. Natural Recovery by the Liver and Other Organs after Chronic Alcohol Use. *Alcohol Res.* 2021;41(1):05. DOI: 10.35946/arcr.v41.1.05. PMID: 33868869.
2. Mathurin P, Bataller R. Trends in the management and burden of alcoholic liver disease. *J Hepatol.* 2015;62(1 Suppl):S38-46. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.03.006. PMID: 25920088.
3. Campollo O. Alcohol and the Liver: The Return of the Prodigal Son. *Ann Hepatol.* 2019;18(1):6-10. DOI: 10.5604/01.3001.0012.7854. PMID: 31113611.
4. Mellinger JL. Epidemiology of Alcohol Use and Alcoholic Liver Disease. *Clin Liver Dis (Hoboken).* 2019;13(5):136-139. DOI: 10.1002/cld.806.
5. Bataller R, Mandrekar P. Identifying molecular targets to improve immune function in alcoholic hepatitis. *Gastroenterology.* 2015;148(3):498-501. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.01.013. PMID: 25613314.
6. Diesen DL, Kuo PC. Nitric oxide and redox regulation in the liver: part II. Redox biology in pathologic hepatocytes and implications for intervention. *J Surg Res.* 2011;167(1):96-112. DOI: 10.1016/j.jss.2009.10.006. PMID: 20400112.
7. Oekonomaki E, Notas G, Mouzas IA, Valatas V, Skordilis P, Xidakis C, Kouroumalis EA. Binge drinking and nitric oxide metabolites in chronic liver disease. *Alcohol Alcohol.* 2004;39(2):106-9. DOI: 10.1093/alc/alc/agh030. PMID: 14998825.
8. Beier JI, McClain CJ. Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease. *Biol Chem.* 2010;391(11):1249-64. DOI: 10.1515/BC.2010.137. PMID: 20868231.

Висновки

Моделювання хронічної алкогольної інтоксикації на 10–28 добу призводить до порушення утворення та метаболізму оксиду азоту з переважним утворенням токсичних його продуктів пероксинітритів та нітритів, що загрожує розвитком нітрозативного стресу в печінці. Хронічна алкогольна інтоксикація на 10–28 добу експерименту супроводжується різким зниженням активності аргіназозалежного шляху метаболізму аргініну в печінці щурів, що свідчить про порушення процесів в циклі Кребса-Хенселаїта.

Перспективність дослідження

Дані дослідження уточнюють патогенез хронічного алкогольного гепатиту і можуть бути використані для розробки патогенетичних засобів корекції алкогольного ураження печінки.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

9. Stepanov YuM, Didenko VI, Dynnik OB, Konenko IS, Oshmianskaia NYu, Galinsky AA. Association of morphological changes in the liver parenchyma and its rigidity under the conditions of the experimental modeling of alcoholic and toxic hepatitis. *Journal of the NAMSU*. 2017;23(3-4):196-204.
10. Akimov OY, Kostenko VO. Functioning of nitric oxide cycle in gastric mucosa of rats under excessive combined intake of sodium nitrate and fluoride. *Ukr Biochem J*. 2016;88(6):70-5. DOI: 10.15407/ubj88.06.070. PMID: 29236285.
11. Gaston B, Reilly J, Drazen JM, Fackler J, Ramdev P, Arnette D, et al. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993;90:10957-61.
12. Singh RJ, Hogg N, Joseph J, Kalyanaraman B. Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J Biol Chem*. 1996;271(31):18596-603. DOI: 10.1074/jbc.271.31.18596. PMID: 8702510.
13. Bartosz G. Peroxynitrite: mediator of the toxic action of nitric oxide. *Acta Biochim Pol*. 1996;43(4):645-59.
14. Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin*. 2020;36(2):307-21. DOI: 10.1016/j.ccc.2019.12.009. PMID: 32172815.
15. Blaya D, Rubio-Tomás T, Rodrigo-Torres D, Lozano J, Coll M, Argemi J, et al. Endothelial dysfunction markers predict short-term mortality in patients with severe alcoholic hepatitis. *Hepatology Int*. 2021;15(4):1006-17. DOI: 10.1007/s12072-021-10165-y. PMID: 33954832.
16. Yang Y, Sangwung P, Kondo R, Jung Y, McConnell MJ, Jeong J, et al. Alcohol-induced Hsp90 acetylation is a novel driver of liver sinusoidal endothelial dysfunction and alcohol-related liver disease. *J Hepatology*. 2021;75(2):377-86. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.02.028. PMID: 33675874.
17. Liu XB, Haney JR, Cantero G, Lambert JR, Otero-Garcia M, Truong B, et al. Hepatic arginase deficiency fosters dysmyelination during postnatal CNS development. *JCI Insight*. 2019;4(17):e130260. DOI: 10.1172/jci.insight.130260. PMID: 31484827.

Mykytenko A.O.

METABOLISM OF NITRIC OXIDE UNDER THE CONDITIONS CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION MODELLING

It was experimentally shown that ethanol affects the production of nitric oxide in rats. However, nitric oxide can have both a protective effect by weakening the harmful effect of ethanol on the microcirculation of the liver, and lead to liver damage by active forms of nitrogen. The purpose of the study is to study changes in the nitric oxide cycle under the conditions of modeling chronic alcohol intoxication in rats. Experiments were performed on 30 white, mature male Wistar rats, weighing 180–220 g. The animals were divided into 2 groups: I – control (n=6); II group – animals with alcoholic hepatitis (n=24) modelled by the method of forced intermittent alcoholization for 5 days, with a repeat after two days by intraperitoneal injection of a 16.5% ethanol solution in a 5% glucose solution, at the rate of 4 ml/kg of body weight. Animals were removed from the experiment on days 10, 14, 21 and 28 by taking blood from the right ventricle of the heart under thiopental anesthesia. The activity of inducible and constitutive isoforms of NO-synthase, concentration of nitrite, nitrosothiols and peroxynitrites of alkali and alkaline earth metals, the activity of nitrite reductase, nitrate reductase and arginase

were determined in rat liver homogenate. Chronic alcohol intoxication modelling for 10–28 days leads to a violation of the formation and metabolism of nitric oxide with the predominant formation of its toxic metabolites, such as peroxy-nitrites and nitrites, which threatens the development of nitrosative stress in the liver. Chronic alcohol intoxication on the 10th–28th days of the experiment is accompanied by a sharp decrease in the activity of the arginase-dependent pathway of arginine metabolism in the liver of rats, which indicates a violation of the deamination processes in the Krebs-Handzeleit cycle.

Keywords: nitrites, NO-synthase, peroxy-nitrite, alcohol, liver, rats.

Надійшла до редакції 23.02.2023

Відомості про автора:

Микитенко Андрій Олегович – кандидат медичних наук, доцент закладу вищої освіти, кафедри біологічної та біоорганічної хімії Полтавського державного медичного університету, Україна.

Адреса для листування: Україна, 36011, м. Полтава, вулиця Шевченка, 23, Полтавський державний медичний університет.

E-mail: mykytenkoandrej18@gmail.com

ORCID: 0000-0002-4205-2699.