

*O.Yu. Galkin, O.B. Besarab, Yu.V. Gorshunov, O.M. Dugan*  
National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute"  
Scientific-Research and Design-Technological Institute of Municipal Economy

**BIOANALYTICAL VALIDATION OF IMMUNOENZYMATIC TEST-KIT FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF TOTAL HUMAN IMMUNOGLOBULIN E**

The scientific and methodical study of procedure of bioanalytical validation of ELISA kit for the quantitative determination of total human IgE has presented. Validation characteristics (precision, diagnostic and analytical specificity, diagnostic sensitivity, accuracy, linearity) were determined as at the release of diagnostic kits, and at the time of expiry (as part of the stability studies). Mean diagnostic specificity was 99.3%. Immunoenzymatic method was linear in the range 10-1000 IU/mL, and the uncertainty of the calibration graph was insignificant. The detection limit was 1.42 IU/mL, and the limit of quantification of (analytical sensitivity) was 4.33 IU/mL. Reproducibility limit coincides with the analytical sensitivity. Accuracy is expressed in terms of systematic error, was 0.25 IU/mL, and was statistically insignificant.

*Keywords: ELISA, validation, human IgE*

Рекомендує до друку  
О.Б. Столяр

Надійшла 02.09.2014

УДК: 612.017.1/015.1-02:616.36-002-099]-092.9

А.Є. МУДРА

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України»  
майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001

**NO-СИНТАЗА ТА ПРОЗАПАЛЬНІ ЦИТОКІНИ ПРИ ГОСТРОМУ ТОКСИЧНОМУ ГЕПАТИТІ ТА ЗА ВПЛИВУ МОДУЛЯТОРІВ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ**

Вивчали зміни вмісту прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$ , IL-6 та TNF- $\alpha$ , ендотеліальної та індукційної молекулярних форм NO-синтази (eNOS, iNOS відповідно) та продуктів метаболізму оксиду азоту, нітрит і нітрат аніонів при експериментальному гепатиті та на фоні застосування модуляторів його синтезу. Встановлено, що при гострому токсичному ураженні печінки спостерігається зниження вмісту стабільних метаболітів NO у печінці та наростання їх концентрації в крові, зменшення рівня eNOS з вираженим наростанням кількості iNOS та концентрації прозапальних цитокінів. Прекурсори оксиду азоту сприяють активації синтезу NO, зниженню вмісту прозапальних цитокінів та експресії iNOS, при цьому спостерігається зростання вмісту eNOS. Повне інгібування ферментативного синтезу оксиду азоту шляхом застосування неселективного блокатора NOS L-NAME за гострого токсичного гепатиту призводить до зниження рівня NO<sub>2</sub>- та NO<sub>3</sub>, концентрації eNOS та iNOS на фоні високого рівня IL-1 $\beta$ , IL-6 та TNF- $\alpha$ . Блокування iNOS-індукованого синтезу NO призводить до зміни вмісту нітрит і нітрат аніонів та зниження активності індукційної NO-синтази як у крові, так і у печінці.

*Ключові слова: прозапальні цитокіни, ендотеліальна NO-синтаза, індукційна NO-синтаза, оксид азоту, печінка*

З'ясування сигнальної ролі та шляхів утворення монооксиду азоту (NO) у організмі створило нові можливості пошуку шляхів корекції патологічних станів [1,2]. В організмі людини і тварин NO утворюється в результаті окислення гуанідинових групи L-аргініна, яке каталізується групою ферментів - синтаз оксиду азоту. Одна з форм синтази оксиду азоту

індукується в імунокомпетентних клітинах і деяких інших клітинах ендотоксином (ліпополісахаридом) і цитокінами [2].

Цитокіни – це ендогенні, біологічно-активні поліпептидні медіатори, що являють собою велику гетерогенну групу низькомолекулярних, неспецифічних стосовно антигенів, білків-глікопротеїдів, які продукуються активованими клітинами різних типів, в тому числі макрофагами і куперівськими клітинами печінки, у відповідь на зовнішній позаклітинний стимул і беруть участь у формуванні та регуляції захисних реакцій організму [5]. При тривалому хронічному запаленні вони служать одними з медіаторів деструкції тканин. Гепатоцити дуже чутливі до дії цитокинів, так як містять на своїй поверхні цілий ряд специфічних рецепторів, через які здійснюється регуляція процесів білкового синтезу, проліферації, диференціації, спеціалізованого функціонування та апоптозу клітин печінки [13]. У запуску специфічної імунної відповіді беруть участь протизапальні цитокіни: ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-12, TNF-альфа, IFN-гамма. Зокрема інтерлейкін 1 (ІЛ-1 бета) синтезується в основному клітинами моноцитарно-макрофагальної ряду. Одне з основних властивостей ІЛ-1 полягає у здатності стимулювати функціональну активність лейкоцитів, в тому числі фагоцити, Т- і В-лімфоцити і кістково мозкове кровотворення. Тумор некротичний фактор альфа (TNF-альфа) є сильним активатором нейтрофілів, наділений антивірусної активністю. TNF-альфа збільшує проникність судин [5, 13].

Згідно даних літератури, у відповідь на пошкодження тканини печінки і запалення, індуковане різноманітними ксенобіотиками, в тому числі чотирхлористим вуглецем, синтезується велика кількість NO. Більшість дослідників значне підвищення концентрації NO, пов'язують з активацією індукцельної NO-синтази (iNOS) [6,11]. Відомо, що дана ізоформа ферменту активується ендотоксинами та прозапальними цитокінами. Результати експериментальних досліджень показали, що ураження печінки тетрахлорметаном супроводжувалося підвищенням експресії печінкової mRNA TNF- $\alpha$  і самого TNF- $\alpha$  в сироватці крові, одночасно зі зростання вмісту білка iNOS у печінці, а прозапальний ІЛ-1 сам може бути ефективним стимулятором iNOS в гепатоцитах [8, 10].

Метою нашого дослідження стало вивчення взаємодії систем прозапальних цитокинів та L-аргінін – NO в розвитку гострого токсичного ураження печінки. З'ясування ролі NO у патогенезі ураження здійснювали шляхом застосування попередників та неселективних блокаторів його утворення.

### Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведено на 36 білих щурах-самцях. Гострий токсичний гепатит моделювали одноразовим внутрішньоочеревинним введенням тетрахлорметану у розрахунку 2 г/кг маси тіла у вигляді 50 % олійного розчину на оливковій олії [3, 14]. Коригуючі чинники: попередники синтезу оксиду азоту L-аргінін (25 мг/кг), L-аргініну L-глутамат (препарат фірми «Здоров'я» глутаргін) (L-A-L-Г) (45 мг/кг), неселективний блокатор NO-синтази L-NAME (10 мг/кг) – вводили інтраперитонеально, один раз на добу, щоденно протягом 2 днів. Контрольній групі тварин вводили відповідний об'єм оливкової олії та ізотонічного розчину. Експерименти на тваринах проводили у відповідності до Європейської кон-венції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей (Страсбург, 1986), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000) та рішення комісії з біоетики Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського (протокол № 3, 2011 р.). Декапітацію тварин проводили під тіопенталовим наркозом через 24 год після останнього введення засобів корекції. У сироватці крові за допомогою стандартних наборів реактивів “Філісіт діагностика” (Україна) визначали активність АлАТ, АсАТ. У крові та печінці визначали вміст стабільних продуктів метаболізму оксиду азоту нітрит- та нітрат-аніонів (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> та NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) за методом Гріна, в модифікації І.О.Кіселика [4, 6] Імуноферментним методом (ELISA) за допомогою тест-систем USCN LifeScience Inc. в гепатоцитах та сироватці визначали експресію ендотеліальної (eNOS) та індукцельної (iNOS) NO-синтаз. Цим же методом за допомогою, адаптованих до виду піддослідних тварин, тест-систем фірми USCN LifeScienceInc у сироватці крові тварин визначали рівень прозапальних цитокинів: інтерлейкіну-1 $\beta$  (ІЛ-1 $\beta$ ), інтерлейкіну 6 (ІЛ-6) та фактору некрозу пухлин- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

## БІОХІМІЯ

Статистичну обробку одержаних даних виконували за допомогою Origin 7.5 (OriginLabCorp., США) та Microsoft Excel XP. Порівняння отриманих величин проводили з використанням t-критерію Стьюдента та методом одно-факторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Зміни вважали достовірними при  $p \leq 0,05$ .

### Результати досліджень та їх обговорення

Розвиток гострого токсичного ураження печінки, яке викликано тетрахлоретаном, спостерігали за зміною активності ферментів ураження печінки АлАТ та АсАТ. Так у щурів із  $CCl_4$ -ураженням вміст у крові АлАТ був вищим в 2,5 раза, а АсАТ – на 86,3 %, порівняно з контролем, а співвідношення величин АсАТ/АлАТ (коефіцієнт де Рітиса), який при ураженні печінки становить більше 1, в нашому випадку він становить  $2,83 \pm 0,11$ . Таке значне підвищення активності амінотрансфераз зумовлене, на нашу думку, масивним пошкодженням мембран гепатоцитів та виходом ферментів у кров з пошкоджених тканин печінки.

Ці всі зміни відбувається на фоні зміни вмісту стабільних метаболітів L-аргініну в циклі перетворення синтази. Так, на 3 добу експерименту ми спостерігали збільшення вмісту  $NO_2^-$  у сироватці крові у 2,7 рази, при чому в печінці його концентрація не змінювалася у порівнянні з контролем. Рівень  $NO_3^-$  у крові та печінці знижувався відповідно на 18,1 та 22,5 % (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст нітриг та нітрат аніонів при  $CCl_4$ -гепатиті та введенні модуляторів синтезу NO  
( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Серія дослідів	Показники			
	кров (мкмоль/л)		печінка (мкмоль/кг)	
	$NO_2^-$	$NO_3^-$	$NO_2^-$	$NO_3^-$
Контроль	$1,17 \pm 0,06$	$10,21 \pm 0,07$	$2,19 \pm 0,15$	$8,77 \pm 0,26$
$CCl_4$	$3,18 \pm 0,26^*$	$8,36 \pm 0,18^*$	$1,80 \pm 0,18^*$	$6,79 \pm 0,24^*$
$CCl_4$ + L-аргінін	$4,05 \pm 0,23^{*\#}$	$7,74 \pm 0,18^{*\#}$	$2,38 \pm 0,18^{*\#}$	$10,22 \pm 0,15^{*\#}$
$CCl_4$ + L-A-L-Г	$4,42 \pm 0,14^{*\#}$	$7,41 \pm 0,11^{*\#}$	$2,24 \pm 0,04^{*\#}$	$10,83 \pm 0,43^{*\#}$
$CCl_4$ + L-NAME	$2,07 \pm 0,20^{*\#}$	$6,36 \pm 0,25^{*\#}$	$1,26 \pm 0,07^{*\#}$	$6,02 \pm 0,15^{*\#}$

Примітка: \* - зміни порівняно з контролем вірогідні ( $p < 0,05$ ); # - достовірність відносно групи тварин з  $CCl_4$ -гепатитом ( $p < 0,05$ )

Оцінивши вище зазначені показники можна стверджувати, що гостре токсичне  $CCl_4$ -ураження печінки супроводжується зниженням вмісту стабільних метаболітів монооксиду азоту, та значним його зростанням у сироватці крові. Такі результати до певної міри корелюють із вмістом ізоформ NOS в досліджуваних середовищах. Проведені дослідження показали, що концентрація індукбельної форми ферменту зростає як печінці (в 4,9 рази), так і в крові (в 6,3 рази), а ендотеліальної знижується (на 61,8 % та 45,9 % відповідно) (табл. 2). Нами було встановлено наявність кореляційної залежності між вмістом нітриг аніону та eNOS в печінці ( $r=0,56$ ).

Таблиця 2

Вміст eNOS та iNOS у гепатоцитах та сироватці крові при токсичному гепатиті та за введення модуляторів синтезу NO ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Група тварин	Показники			
	сироватка крові		печінка (1 мл - $1 \times 10^6$ клітин)	
	eNOS Од/мл	iNOS нг/мл	eNOS Од/мл	iNOS нг/мл
Контроль	$2,33 \pm 0,26$	$15,38 \pm 0,82$	$3,79 \pm 0,17$	$2,30 \pm 0,34$
$CCl_4$	$1,27 \pm 0,07^*$	$96,51 \pm 5,21^*$	$1,26 \pm 0,20^*$	$11,28 \pm 0,79^*$
$CCl_4$ + L-аргінін	$3,43 \pm 0,20^{*\#}$	$53,54 \pm 1,74^{*\#}$	$2,26 \pm 0,20^{*\#}$	$7,20 \pm 0,34^{*\#}$
$CCl_4$ + L-A-L-Г	$3,45 \pm 0,29^{*\#}$	$57,80 \pm 0,91^{*\#}$	$2,85 \pm 0,19^{*\#}$	$5,56 \pm 0,26^{*\#}$
$CCl_4$ + L-NAME	$0,93 \pm 0,10^{*\#}$	$23,20 \pm 1,50^{*\#}$	$0,82 \pm 0,09^{*\#}$	$2,74 \pm 0,12^{*\#}$

Примітка: \* - зміни порівняно з контролем вірогідні ( $p < 0,05$ ); # - достовірність відносно групи тварин з  $CCl_4$ -гепатитом ( $p < 0,05$ )

Показники ІФА досліджень свідчать, що CCl<sub>4</sub>-гепатит характеризується, вираженою імунною відповіддю на дію токсиканта, про що свідчить зростання, у порівнянні з контролем, рівня прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  в 5,5; 5,2 та 31,4 рази в сироватці крові (рис. 1)

Активация iNOS та зростання синтезу NO може бути результатом підвищення вмісту прозапальних цитокінів. Нашу гіпотезу підтверджено встановленням тісного прямого кореляційного зв'язку між вмістом TNF- $\alpha$  та iNOS в крові ( $r=0,89$ ), а також між вмістом NO<sub>2</sub> та TNF- $\alpha$  ( $r=0,94$ ).

Встановлено, що введення попередників синтезу NO шурам із токсичним ураженням печінки супроводжувалось покращенням показників, які досліджувались.

Проаналізувавши зміни під впливом L-аргініну та L-аргініну L-глутамату (глутаргіну) маркерних показників цитолізу встановлено, що рівні амінотрансфераз у сироватці крові при корекції L-аргініном були нижчими, порівняно з аналогічними показниками в групі тварин із ураженням, на 31,9 і 11,6 % в, і на 40,4 і 24,2 % відповідно при введенні глутаргіну.

При використанні L-аргініну та L-аргініну L-глутамату відзначаються позитивні зміни показників, які характеризують стан ураженого органа, супроводжувались активацією синтезу оксиду азоту, про що свідчило зростання кількості його стабільних метаболітів NO<sub>2</sub><sup>-</sup> та NO<sub>3</sub><sup>-</sup> у печінці (на 24,8 та 59,4 %), порівняно з групою шурів з CCl<sub>4</sub> ураженням, в яких корекцію не проводили. Вміст нітрит-аніону в сироватці крові за введення L-аргініну та глутаргіну на 3 добу експерименту зростав на 27,4 та 38,9 %, а рівень нітратів знижувався на 7,5 та 11,4% (табл. 1). Ми спостерігали однонаправлений характер впливу досліджуваних речовин на вміст ізоформ NO-синтази, як в крові, так і у печінці. Проведені нами імунофементні дослідження показали, що використання L-аргініну та глутаргіну призводить до зростання вмісту ендотеліальної (e) NOS в гепатоцитах при ураженні тетрахлоретаном на 55,9 та 97,1 % з одночасним зниженням iNOS на 36,1 та 50,4 % відповідно. Але, активність індукційної форми ферменту залишалась вищою від показників контрольної гупи в 3,1 та 2,4 раза (табл. 2). Аналогічні зміни ми спостерігали у сироватці крові. При введенні L-аргініну та L-A-L-Г активність iNO-синтази знижувалася на 24,8 та 18,8 % але залишалась в 2,1 та 2,3 рази вищою, у порівнянні з показником контрольної групи тварин. Ендотеліальна ізоформа NOсинтази зростала в 2,7 та 2,7 рази відповідно до досліджуваних речовин та порівняно з показниками у шурів, в яких корекцію не проводили, причому при застосуванні обох прекурсорів синтезу NO її активність дещо перевищувала показники контрольної групи тварин.

Зниження активності індукційної форми ферменту відбувається на фоні достовірного зменшення вмісту в сироватці крові прозапальних цитокінів. Так, при застосуванні L-аргініну вміст IL-1 $\beta$ , IL-6 та TNF- $\alpha$  знижується на 48,2; 59,2 та 63,7 %, при застосуванні глутаргіну на 21,3; 32,2 та 49,9 % відповідно (рис. 1).

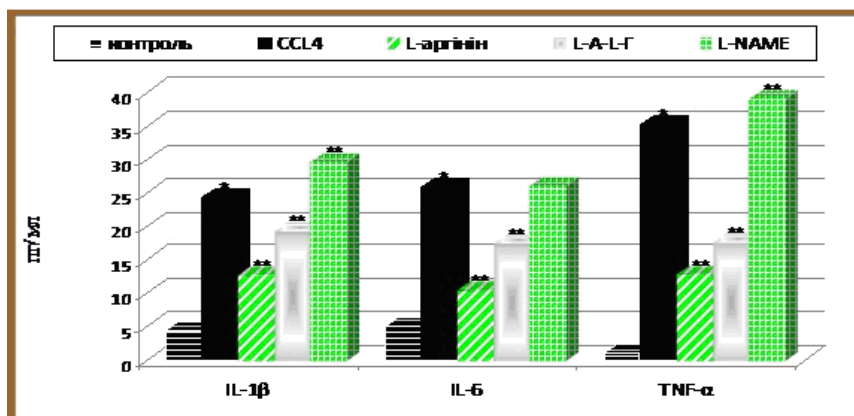


Рис. 1. Вміст прозапальних цитокінів у сироватці крові тварин з токсичним ураженням печінки CCl<sub>4</sub>, та за введення модуляторів синтезу оксиду азоту

В процесі досліджень встановлено, що використання неселективного інгібітора конститутивної та індукційної ізоформ NO-синтази N-нітро-L-аргініну метилового ефіру (L-

NAME) при токсичному ураженні печінки призвело поглиблення патологічного процесу. Так, жодна із амінотрансфераз за повторного введення L-NAME не відрізнялась від аналогічних у тварин з CCL<sub>4</sub>-гепатитом ( $p > 0,05$ ), але перевищувала контрольні значення: АлАТ в 2,9 та АсАТ у 1,9 раза.

Встановлено, що при застосуванні L-NAME знижується концентрація стабільних метаболітів NO<sub>2</sub><sup>-</sup> та NO<sub>3</sub><sup>-</sup> у сироватці крові (на 35,1 та 24,0 %) та печінці (на 29,8 та 11,4 %).

Вміст ендотеліальної форми синтази оксиду азоту при введенні інгібітора NOS знижується у сироватці крові та печінці на 26,8 та 43,7 % у порівнянні з групою тварин без корекції, і є на 60,4 та 78,5 % нижчим від контрольних показників, що вказує на майже повну інактивацію ферменту, особливо в ураженому органі.

Концентрація індукбельної форми NO-синтази в даній групі тварин також знижується як у сироватці крові, так і у печінці на 76,0 та 75,7 % відповідно. Разом з тим, слід зазначити, що цей показник в крові залишається на 50,8 % вищим, а у печінці є аналогічним контрольним значенням (табл. 2).

На фоні інгібування утворення NO концентрація прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNF- $\alpha$  продовжує зростати у порівнянні з CCL<sub>4</sub>-гепатитом (на 21,2 та 10,4 %), а вміст IL-6 залишається на рівні ураження (рис.1).

Отже, результати наших досліджень показали, що при гострому токсичному ураженні печінки відбувається викид значної кількості прозапальних цитокінів імунокомпетентними клітинами, що зумовлює активацію і NOS та вироблення значної кількості агресивного оксиду азоту. Так, за даними Laskin J.D. et al. (2001) збільшення продукції NO у в ендотеліальних клітинах печінки при токсичному пошкодженні є вкрай необхідним для забезпечення явища «робочої гіперемії». При розширенні судин відбувається спрямований на відновлення порушених функцій перерозподіл кисню і пластичних ресурсів [12].

Встановлений нами кореляційний зв'язок між вмістом нітрит аніону та eNOS в печінці може бути підтвердженням того, що при гострому токсичному гепатиті відбувається зниження протективного eNOS-індукованого синтезу оксиду азоту. Повне блокування синтезу NO синфазним шляхом вело до поглиблення ураження печінки, що підтверджує проективну дію оксиду азоту в умовах токсичного гепатиту. Збільшення біодоступності NO шляхом введення його попередників спричинює зниження викиду прозапальних цитокінів та чинить гепатопротекторну дію.

## Висновки

Порушення цитокінового профілю та системи L-аргінін-оксид азоту відіграють роль у розвитку гострого токсичного ураження печінки. Про це свідчить зниження вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту в печінці та наростання їх концентрації в крові, зменшенні рівня ендотеліальної NO-синтази як в крові, так і у печінці з вираженим наростанням вмісту індукбельної форми ферменту в обох досліджуваних середовищах та прозапальних цитокінів в сироватці крові. Прекурсори синтезу оксиду азоту при гострому токсичному ураженні печінки сприяють відновленню стану ураженого органу, що відбувається на тлі активації синтезу оксиду азоту, зниження вмісту прозапальних цитокінів та експресії iNOS, при цьому спостерігається зростання активності ендотеліальної форми ферменту. Повне інгібування ферментативного синтезу оксиду азоту шляхом застосування неселективного блокатора NOS L-NAME за гострого токсичного гепатиту призводить до подальшого поглиблення ураження печінки, про що свідчить зниження рівня його стабільних метаболітів, концентрації ендотеліальної та індукбельної форм NO-синтаз та високий рівень досліджуваних прозапальних цитокінів.

1. *Ванин А.Ф.* Оксид азота в биологии: история, состояние и перспективы исследований / А.Ф. Ванин // Биохимия. — 1998. — Т. 63. — Вып. 7. — С. 867—869.
2. *Горен А.К.Ф.* Универсальная и комплексная энзимология синтазы оксида азота / А.К.Ф. Горен, Б. Майер // Биохимия. — 1998. — Т. 63. — Вып. 7. — С. 870—880.
3. *Губский Ю.И.* Коррекция химического поражения печени. / Ю.И Губский. — К.: Здоров'я, 1989. — 168 с.

4. *Кіселик І.О.* Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології / І.О. Кіселик, М.Д. Луцик, Л.Ю. Шевченко // *Лабораторна діагностика.* — 2001. — № 3. — С. 43—45.
5. *Тодоріко Л.Д.* Цитокини – нова система регуляції захисних реакцій організму, їх роль у формуванні запалення / Л. Д. Тодоріко, К. В. Рихліцька // *Клін. та експер. патологія.* — 2004. — Т. 3, № 1. — С. 91—94.
6. *Сибірна Н.* Роль фосфатидилінозит-3-кінази та індукцибельної NO-синтази у регуляції морфофункціонального стану тромбоцитів у разі інсулінозалежного цукрового діабету / Н. Сибірна, О. Вовк, Л. Дробот // *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.* — 2003. — Вип. 34. — С. 52—56.
7. *Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids / L. C. Green, A. W. Davie, J. Glogowski [etal.] // *Analyt. Biochem.* — 1982. — Vol. 126, № 1. — P. 131—138.*
8. *Interleukin-1– contributes via nitric oxide to the upregulation and functional activity of the zinc transporter Zip14 (Slc39a14) in murine hepatocytes / L. A. Lichten, J. P. Liuzzi, R. J. Cousins // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* — 2009. — Vol. 296. — P. 860—867.*
9. *Kang J.-W.* Melatonin protects liver against ischemia and reperfusion injury through inhibition of toll-like receptor signaling pathway / J.-W. Kang, E.-J. Koh, S.-M. Lee // *J. Pineal Res.* — 2011. — Vol. 50. — P. 403—411.
10. *Kuo P. C.* Nitric oxide and acetaminophen-Mediated Oxidative Injury: Modulation of Interleukin -1 – induced Nitric Oxide Synthesis in cultured Rat Hepatocytes / P. C. Kuo, R. A. Schoeder, J. Loscalzo // *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.*— 1997. — Vol. 282, № 2. — P. 1072—1083.
11. *Mizumoto M.* NO as an indicator of portal hemodynamics and the role of iNOS in increased NO production in CCl<sub>4</sub>-induced liver cirrhosis / M. Mizumoto, S. Arai, M. Furutani et al. // *J. Surg. Res.* — 1997. — Vol. 70, № 2. — P. 124—133.
12. *Prooxidant and antioxidant functions of nitric oxide in liver toxicity. / Laskin J. D., Heck D. E., Gardner C. R., Laskin D. L. // *Antioxid Redox Signal.* — 2001. — Vol. 3 (2). — P. 261—271.*
13. *Ramadori G.* Cytokines in Liver / G. Ramadori, T. Armbrust // *Eur J Gastroenterol Hepatol.* — 2001. — Vol. 13, N. 7. — P. 777—784.
14. *S. Janakat.* Optimization of the dose and route of injection, and characterization of the time course of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat / S. Janakat, H. Al-Merie // *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* — 2002. — Vol. 48, N. 1. — P. 41—44.

*А. Е. Мудра*

ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского МОЗ Украины»

#### NO-СИНТАЗА И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОКИНЫ ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ И ПОД ВЛИЯНИЕМ МОДУЛЯТОРОВ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА

Изучали изменения содержания провоспалительных цитокинов, NO-синтазы и продуктов метаболизма оксида азота при экспериментальном гепатите и на фоне применения модуляторов его синтеза.

*Ключевые слова:* провоспалительные цитокины, эндотелиальная NO-синтаза, индуцибельная NO-синтаза, оксида азота, печень

*A. Ye. Mudra*

SHEI «I. Horbachevsky Ternopil State Medical University MPH of Ukraine»

#### NO - SYNTHASE AND PROINFLAMMATORY CYTOKINES LEVEL AT ACUTE TOXIC HEPATITIS AND USAGE OF NITRIC OXIDE MODULATORS

We studied the changes in the content of proinflammatory cytokines, NO-synthase and metabolic products of nitric oxide in experimental hepatitis and during treatment with modulators of its synthesis. In acute toxic liver injury are reduction of stable NO metabolites in the liver and an increase of their concentration in blood, decreasing eNOS with a significant increase of iNOS and concentrations of proinflammatory cytokines were observed. Nitric oxide precursors contribute to the activation of synthesis NO, reduce the content of proinflammatory cytokines and inducible expression of iNOS, while content of eNOS increase. The usage of non-selective NOS blocker L-NAME leads to the reduction of NO<sub>2</sub>- and NO<sub>3</sub>-, eNOS and iNOS concentration on background of high IL-1β, IL-6

and TNF- $\alpha$  level. Blocking iNOS-induced NO synthesis leads to changes in the capacity of nitrite and nitrate anions and reduces activity of iNOS in the liver and blood.

*Keywords: proinflammatory cytokines, endothelial NO-synthase, inducible NO-synthase, nitric oxide, liver*

Рекомендує до друку

Надійшла 09.09.2014

О.Б. Столяр

УДК 615.324.:665.213+612.015.11+547.295.92] - 02:613.2

<sup>1</sup>О.С. ПОКОТИЛО, <sup>1</sup>М.Д. КУХТИН, <sup>2</sup>М.І. КОВАЛЬ, <sup>2</sup>Т.Я. ЯРОШЕНКО

<sup>1</sup>Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

вул. Руська, 56, Тернопіль, 46001

<sup>2</sup>ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України»  
майдан Волі 1, Тернопіль, 46001

## **ЛІПОГЕНЕЗ І ХОЛЕСТЕРОЛОГЕНЕЗ У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН ПІСЛЯ НАВАНТАЖЕННЯ ХОЛЕСТЕРОЛОМ**

Досліджували *in vitro* інтенсивність синтезу ліпідів різних класів (жирних кислот, холестеролу, фосфоліпідів і ацилгліцеролів) в гомогенатах головного мозку після одноразового щоденного упродовж 30 діб навантаження білих щурів і морських свинок холестеролом (300 мг/кг маси тіла). Для цього в гомогенатах головного мозку білих щурів і морських свинок, які інкубували окремо із [6-<sup>14</sup>C] глюкозою, [2-<sup>14</sup>C] лізином або [1-<sup>14</sup>C] пальмітиновою кислотою, визначали радіоактивність ліпідних фракцій. Встановлено інгібуючий вплив холестеролу за підвищення його рівня в раціоні білих щурів і морських свинок на синтез жирних кислот, холестеролу та інших класів ліпідів в головному мозку при використанні як попередника ліпідів [6-<sup>14</sup>C] глюкози і [2-<sup>14</sup>C] лізину та відсутність інгібуючого впливу холестеролу при інкубації з [1-<sup>14</sup>C] пальмітиновою кислотою.

*Ключові слова: ліпіди, холестерол, морські свинки, щури, головний мозок, гіперхолестеринемія*

Головний мозок людини і вищих тварин характеризується значно більшим вмістом холестеролу і фосфоліпідів, ніж інші органи і тканини, за виключенням наднирників [6] та відносною стабільністю ліпідного і жирнокислотного складу [5]. Основним ліпогенним і енергетичним субстратом у головному мозку є глюкоза [11], метаболізм якої аеробним шляхом забезпечує продукцію ацетил-СоА з пірувату, а також 3-гліцерофосфату. Утворений при декарбоксілюванні пірувату ацетил-СоА є попередником жирних кислот і холестеролу, а 3-гліцерофосфат – попередником гліцеролу гліцерофосфоліпідів і триацилгліцеролів. Одночасно питання впливу гіперхолестеринемії на синтез холестеролу і фракційний склад ліпідів у такому холестериногенному і ліпогенному органі як головний мозок, а також роль різних субстратів у забезпеченні цих процесів майже не вивчено

Відомо що, попередником ацетил-СоА, який використовується в синтезі жирних кислот і холестеролу в організмі тварин є, з одного боку, глюкоза, з другого – жирні кислоти, з третього – амінокислоти. Як відомо, кінцевим продуктом катаболізму ряду амінокислот (лізину, триптофану, фенілаланіну, лейцину) в організмі тварин є ацетил-СоА, який використовується в синтезі жирних кислот і холестеролу [4]. Разом з тим, ацетил-СоА утворюється в процесі катаболізму амінокислот (цистеїну, гліцину, серину, треоніну), з яких утворюється піруват. У процесі катаболізму інших амінокислот утворюються інтермедіати циклу трикарбонових кислот, які використовуються в синтезі жирних кислот у значно меншій кількості. Загалом, амінокислоти вносять значний вклад у субстратне забезпечення синтезу ліпідів в організмі тварин [1]. Фонд основних попередників ацетил-СоА (глюкози, жирних кислот, амінокислот) в