

## МЕТАБОЛІЗМ ОКСИДУ АЗОТУ В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ ІЗ СФОРМОВАНОЮ АЛКОГОЛЬНОЮ ЗАЛЕЖНІСТЮ

*Досліджено метаболізм оксиду азоту в головному мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю. Виявлено активацію NO-синтази на початкових етапах досліджень (4 тиждень) за рахунок індукції як iNOS, так її конститутивних ізоформ (nNOS та eNOS), тоді як довгосистемне споживання алкоголю супроводжується активацією тільки cNOS, яке залежить від концентрації вільних іонів кальцію. Дослідження пулу стабільних метаболітів NO: нітрит- і нітрат аніонів ( $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ) та нітрозотіолів виявило збільшення їх вмісту на всіх етапах досліджень.*

**Ключові слова:** NO-синтаза, мозок, алкогольна залежність.

**Вступ.** Систематичне вживання алкоголю призводить до ураження органів і тканин, в результаті чого виникають захворювання нервової (алкогольна енцефалопатія), серцево-судинної (алкогольна кардіоміопатія), травної систем (алкогольний гастрит, алкогольний ентероколіт), печінки (алкогольний гепатит, алкогольний цироз печінки, жировий гепатоз), підшлункової залози (алкогольний панкреатит, геморагічний панкреонекроз). Клінічними та експериментальними дослідженнями встановлено, що при дії етанолу в першу чергу змінюється функціональний стан ЦНС. Спектр дії етанолу на обмін речовин і функції мозку доволі широкий і різноманітний за своїми цитохімічними, фізіологічними та морфологічними проявами, а також психічними наслідками [1]. В головному мозку хворих на алкоголізм розвиваються порушення, які характеризуються розширенням судин оболонки мозку, периваскулярним набряком, розладом кровообігу, некрозом. Нейрони неокортексу, ядер гіпоталамуса і мозочка знаходяться в стані гострого набухання з тотальним хроматолізом, різко знижується число клітинних елементів у верхніх шарах кори. Нерідко виявляється церебральна і мозочкова дегенерація, яка є основою розвитку деменції і атаксії [2]. Зміни поведінки, мотиваційно-емоційні розлади, симптоми психопатологічних станів, які характерні для алкоголізму, мають прямий зв'язок з порушенням функціонування нейромедіаторних систем. Проникаючи через гематоенцефалічний бар'єр в мозок, етанол та його метаболіти впливають на біохімічні процеси в нервових клітинах. В першу чергу етанол вражає нейрони нової кори, гіпокампа, зубчастої звивини і півкуль мозочка, впливаючи на нейромедіатори і змінюючи синаптичну передачу. Системна дія етанолу пов'язана з редукцією ГАМК-ергічної передачі і посиленням збуджувачих глутамат- і холинергічних механізмів [3]. Наслідком таких процесів є збільшення проникності плазматичних мембран, порушення кальцієвого гомеостазу, індукція окисного стресу, що у свою чергу призводить до загибелі нервових клітин [4]. Порушення фізіологічних функцій при алкоголізмі пов'язана також із впливом етанолу на NO-ергічну систему мозку. Оксид азоту (NO) приймає участь у формуванні нейрональної пам'яті, модулює процеси синаптичної передачі, впливає на функціональний стан глутаматних рецепторів, відіграє важливу роль в контролі мозкового кровотоку. Джерелом NO в ЦНС є нейрони, нейрогліальні клітини (астроцити), клітини мікроглії та ендотелій кровоносних судин [5]. Існує декілька типів NOS: нейрональна, конститутивна (nNOS), яка каталізує синтез NO в нейронах під впливом глутамату; ендотеліальна, конститутивна (eNOS), яка синтезує NO в ендотеліальних клітинах судин під впливом ацетилхоліну, брадикініну, а також змін тиску й потоку крові в судинах; індукційна (iNOS) ізоформа ферменту в макрофагах, мікроглії, астроцитах, гладенько-м'язових клітинах судин, яка синтезує NO після

активації цитокінами [6]. Основними ланками циклу перетворень NO є його окиснення до  $NO_2^-$  та  $NO_3^-$  та нітрозилування білків з утворенням нітрозотіолів, які є певним маркером нітрозативного стресу і однією із форм депоновання NO [7-9]. Таким чином, стабільність фізіологічної дії оксиду азоту забезпечує NO-синтазна активність, нітрат- і нітритредуктазна активність та наявність достатнього пулу депонованого NO. Тому, порушення функціонування цієї системи, зміни експресії різних ізоформ NO-синтаз, нестача або гіперпродукція NO призводить до дисбалансу вмісту активних форм азоту та кисню і, як наслідок, до нітрозативного та оксидативного стресу. Метою роботи було з'ясувати особливості метаболізму активних форм азоту в головному мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю.

**Матеріали і методи.** Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180-200 г. Проведенні дослідження відповідають основним вимогам щодо утримання та роботи з лабораторними тваринами згідно правил Європейської конвенції щодо захисту тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.) та згідно етичних норм у відповідності до українського законодавства. Алкогольна залежність у тварин в хронічному експерименті формувалась в умовах вільного вибору між 40 % розчином етанолу та водою протягом 2 місяців [10]. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води. Алкогольну залежність формували за наступною схемою: щурів розсаджували в індивідуальні клітки з двома пляшечками: одна містила мірну кількість води, а інша – 40% розчину етанолу. Кожної доби протягом місяця проводили вимірювання кількості випитого етанолу. Через місяць після початку експерименту тварин розподіляли на 2 групи. До 1 групи відносили інтактних тварин (контроль), до 2 групи – щурів з сформованою алкогольною залежністю, у яких споживання етанолу протягом доби становило 2 мл та більше. Тварин забивали методом дислокації шийних хребців, декапітували, після чого шляхом розтину черепної коробки мозок тварин видаляли з основи черепа, підрізавши черепно-мозкові нерви, промивали фізіологічним розчином та в подальшому гомогенізували. Інтенсивність окисного перетворення L-аргініну, що супроводжується синтезом оксиду азоту *de novo*, оцінювали за активністю ізоферментів NO-синтаз – кальцій залежної, конститутивної (cNOS) і кальційнезалежної, індукційної (iNOS) синтази [11]. Визначення загальної активності NO-синтази в клітинах мозку щурів проводили стандартним спектрофотометричним методом. Визначення активності NO-синтази засноване на комбінації класичного методу [12] та сучасної його модифікації [11], пристосованої до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – L-цитруліну. Водночас в гомогенаті головного мозку визначали вміст стабільних метаболітів оксиду

азоту – нітрит-аніонів ( $\text{NO}_2^-$ ) і нітрат-аніонів ( $\text{NO}_3^-$ ). Вміст нітрит-аніонів визначали за допомогою реактиву Гріса за методом Гріна [13]. Вміст нітрат-аніонів обчислювали за бруциновим методом [13]. Для оцінки процесів нітрозилування визначали вміст нітрозотіолів [13]. Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики із використанням програми Statistica 7 з визначенням t-критерію Стьюдента. Значення  $p < 0,05$  вважали статистично достовірним.

**Результати та їх обговорення.** Відомо, що за нормальних умов NO постійно утворюється в головному мозку, забезпечує ендотеліальну цитопротекцію, контролює осциляторну активність нейронів, модулює міжнейрональні комунікації, синаптичну пластичність, стан рецепторів, внутрішньоклітинну передачу сигналів, вивільнення нейротрансмітерів [14]. В останні роки продемонстрована провідна роль високих концентрацій NO в патогенезі ішемічних / реперфузійних ушкоджень мозку, нейродегенеративних захворювань ЦНС [14]. Тому, дослідження функціонування NO-ергічної системи мозку має

не тільки теоретичне, але і практичне значення, оскільки надає можливість розробки методів направленої фармакотерапії патологічних станів і корекції метаболічних порушень, викликаних хронічним надходженням етанолу.

У результаті досліджень нами було встановлено, що системне споживання алкоголю призводило до зростання активності NO-синтази в клітинах мозку щурів на 280% (4 тиждень експерименту) у порівнянні із контролем (табл.1). В подальші терміни досліджень (5-8 тиждень) активність ферменту залишалась підвищеною і на 8 тиждень експерименту перевищувала контрольні показники на 170 %.

Механізми ушкодження нейронів при гіперпродукції NO універсальні. Надлишкова кількість оксиду азоту пригнічує ферменти дихального ланцюга, циклу Кребса і синтез ДНК [15]. Фрагментація ДНК стимулює активність ядерного ферменту полірибозосинтетази (PARS), що сприяє швидкому виснаженню енергетики клітини та її загибель шляхом некрозу [16].

Таблиця 1. NO-синтазна активність в головному мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю

Групи тварин	Загальна активність NOS (мкмоль цитруліну /хв.·мг білка)	Активність iNOS (мкмоль цитруліну /хв.·мг білка)	Активність sNOS (мкмоль цитруліну /хв.·мг білка)
контроль	2,65±0,18	1,14±0,07	1,51±0,13
4тижні	7,34±0,49*	3,26±0,24*	4,08±0,71*
5 тижнів	6,48±0,32*	2,69±0,25*	3,79±0,35*
6 тижнів	6,05±0,51*	2,33±0,10*	3,71±0,43*
7 тижнів	5,83±0,41*	2,09±0,17*	3,73±0,31*
8 тижнів	4,58±0,38*	0,68±0,05*	3,98±0,43*

Примітка: \* – вірогідність відміни показника відносно контрольної групи ( $p < 0,05$ ).

Встановлена нами активація NO-синтази в мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю може відбуватись за рахунок індукції різних ізоформ ферменту: iNOS (індуцибельна NO-синтаза), яка продукує значно більше  $\text{NO}^{\bullet}$  у порівнянні з конститутивними ізоформами sNOS (eNOS -ендотеліальна NO-синтаза та nNOS -нейрональна NO-синтаза).

Оксид азоту, синтезований різними типами NOS, виконує, відповідно, і неоднакові функції. Зазначимо, зокрема, що активація ендотеліальної NOS спостерігається при підвищенні швидкості кровотоку [17]. Збільшення ендотеліальної продукції NO зазвичай сприятливе для організму, оскільки захищає його від гіпертензії, тромбозів, спазмів судин, вільнорадикального ушкодження. Однак експресія iNOS призводить до гіперпродукції NO і токсичних ефектів його надлишку. У такому випадку NO продукує мікроглія і лейкоцити. Відомо, що активність індукцибельної синтази (iNOS) зростає за умов запалення і індукується запальними цитокинами, інтерлейкіном  $\beta$ , інтерфероном  $\gamma$ . Виявлено тісний зв'язок системи NO та транскрипційного ядерного фактора  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ). Показано, що опосередкована через гліальні клітини нейротоксичність пов'язана з NF- $\kappa\text{B}$ -залежною індукцією iNOS з подальшою продукцією активних форм кисню [21]. Вважають, що синтезований цією формою NOS NO забезпечує антигенний гомеостаз мозкової тканини [15]. Оскільки iNOS не потребує кальцію, то фермент може підтримувати високу активність протягом декількох днів.

В результаті проведених досліджень нами було встановлено, що на 4 тиждень експерименту активність iNOS та sNOS перевищували контрольні показники на 286% і 270% відповідно. Таким чином виявлено активацію як цитокинзалежної iNOS, так і  $\text{Ca}_2^+$  залежних ізоформ NO-синтази (eNOS та nNOS). В подальші терміни досліджень (5-8 тиждень) нами встановлено, що активність iNOS знижувалась і на 8 тиждень експерименту

була нижче контрольних показників на 40%, тоді як активність sNOS перевищувала контроль на 245%-264% відповідно протягом всіх термінів досліджень.

Отже, нами показано, що активація NO-синтази в головному мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю на початкових етапах досліджень (4 тиждень) відбувається за рахунок індукції як iNOS, так її конститутивних ізоформ (nNOS та eNOS), тоді як довгосистемне споживання алкоголю супроводжується активацією тільки sNOS, які залежить від концентрації вільних іонів кальцію.

Відомо, що внаслідок активації індукцибельної (iNOS) продукується значна кількість оксиду азоту, який при взаємодії з вільними радикалами кисню (супероксид-аніоном) утворює ще більш потужний цитотоксичний радикал – пероксинітрил ( $\text{ONOO}^-$ ) який може самостійно реагувати з компонентами клітини або розкладатись до гідроксирадикалу ( $\cdot\text{OH}$ ) – найбільш реакціоздатного кисневого радикала [22]. Ці сполуки здатні окиснювати білки, нуклеїнові кислоти, мембранні ліпіди, що порушує функції клітини та її цілісність. З іншого боку, утворення  $\text{ONOO}^-$  призводить до різкого підвищення рівня  $\text{Ca}_2^+$  в цитоплазмі, порушення дихальної функції мітохондрій. Високий рівень оксиду азоту в мітохондріях разом із підвищенням в них вмісту  $\text{Ca}_2^+$  перешкоджає поглинанию кисню, призводить до виснаження енергетичних запасів клітини, знижує утворення та утилізацію АТФ, інактивує комплекс дихального ланцюга та подальшої активації нітрозативного стресу та апоптозу [23,24].

Якщо наномолярні концентрації оксиду азоту призводять до зворотного інгібування мітохондріального дихання, то мікромольні концентрації NO, які виникають за участі iNOS, спричиняють незворотні зміни ферментів дихального ланцюга [15].

Саме з активністю iNOS найчастіше пов'язують продукцію великої кількості NO, здатного ініціювати гіпоксичний і вільнорадикальний некробіоз у тканині

головного мозку за умов його гіпоксії, ішемії / реперфузії, запалення [14].

Таким чином, ми можемо припустити, що встановлена нами активація NO-синтази на початкових етапах формування алкогольної залежності пов'язана як з індукцією механізмів запалення, так і посиленого надходження  $Ca_2^+$  до клітинного матриксу. В подальші терміни досліджень нами встановлена активація тільки  $Ca_2^+$ -залежних ізоформ ферменту.

Рядом дослідників було показано, що за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації відбувається зростання вмісту IL1 та IL6 і посилюється цитокін-індукована експресія iNOS астроцитів. Продемонстровано дозозалежний характер впливу етанолу на активність iNOS гліальних клітин *in vitro*: зростання активності ферменту при введенні низьких доз спирту та зниження при високих дозах. З іншого боку, при гострому введенні етанолу показано зниження полії: С-індукованої NO-відповіді у мікроглії. Вважається, що ефект етанолу на iNOS мРНК відбувається не через накопичення ацетальдегіду і ацетату, а через інгібування ядерного транскрипційного фактора (NF- $\kappa$ B) і STAT-1 сигнальної системи [25,26].

Подальше інгібування активності iNOS пов'язано також з розвитком гіпоксії головного мозку. Було показано, що в процесі адаптації до гіпоксії відбуваються зміни в експресії генів, які кодують різні ізоформи NO-синтаз. Важка гіпоксія індукуює експресію гена iNOS, тоді як адаптація до неї не впливає на цей процес, а збільшує в мозку і судинах експресію eNOS [17]. Крім того, адаптивна реакція, яка розвивається при хронічній алкогольній інтоксикації супроводжується збільшенням числа NMDA рецепторів на постсинаптичних мембранах нейронів. Надмірна стимуляція NMDA рецепторів приводить до зростання току іонів  $Ca_2^+$  у клітину і запуску механізмів клітинного пошкодження [27]. Тому, найбільш вірогідним є залучення в процесі NO-опосередкованої вазодилатації двох ізоформ ферменту-ендотеліальної і нейрональної.

Основними ланками циклу перетворень NO є його окиснення до  $NO_2^-$  і  $NO_3^-$  та нітрозилування білків до

нітрозотіолів. В результаті визначення стабільних метаболітів нітрит- і нітрат-аніонів ( $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ) та нітрозотіолів нами показано збільшення їх вмісту на всіх етапах досліджень. Так, на 4 тиждень пул  $NO_2^-$  і  $NO_3^-$  перевищував контрольні показники в 6,5 і 6 разів. Посилення всіх ланок метаболізму активних форм азоту проявляється також в збільшенні депонування NO у вигляді нітрозотіолів, пул яких зростає в 3 рази. В подальші терміни експерименту (5-8 тижднів) вміст нітрит- і нітрат-аніонів та нітрозотіолів знижувався, але перевищував контрольні показники в 4,4; 3,9 та 2,3 рази відповідно (табл.2).

Крім киснезалежного синтезу NO (окиснення L-аргініну) може активуватись киснезалежний реутилізаційний шлях утворення NO (відновлення нітрату нітратредуктазою до нітриту, а останнього нітритредуктазою до NO) [28]. Але, в умовах гіпоксії утворення нітрат-аніона при ферментативному окисненні NO є мало-вірогідним, тому можливо припустити, що його утворення залежить від деградації пероксинітриту [29]. Враховуючи ці факти, а також те, що пероксинітрит утворюється лише при одночасній генерації як NO, так і  $\cdot O_2^-$  підвищення вмісту нітрат-аніона свідчить не лише про активацію синтезу NO, але і активацію генерації супероксидного аніона (що неминуче призводить до утворення  $H_2O_2$  і OH). Отже, одночасно з нітрозативним розвивається і оксидативний стрес [30]. Збільшення пулів нітрит-аніона, може мати адаптивне захисне значення, спрямоване на нейтралізацію високого вмісту пероксинітриту, що утворюється внаслідок високих рівнів генерації як АФК (оксидативного стресу), так і гіпервисоких рівнів синтезу NO (нітрозативний стрес). За умов хронічного споживання алкоголю зростають пули нітрозотіолів (які є в основному нітрозоглутатионом та нітрозильованими білками), при цьому може знижуватись вміст глутатіону, який є потужним низькомолекулярним антиоксидантом і певним чином змінюється функції білків. Нітрозотіоли розглядаються як буферну систему, яка грає важливу роль в збереженні і транспорті оксида азоту, тому нітрузо тіоли розглядаються як основне депо NO.

Таблиця 2. Вміст  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$  і нітрозотіолів в головному мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю

	$NO_2^-$ пмоль/хв•мгбілка	$NO_3^-$ нмоль/хв•мгбілка	нітрозотіоли пмоль/хв•мгбілка
контроль	168,32±13,60	34,26±3,11	164,40±18,88
4тижні	1088,41±98,31*	209,66±6,15*	529,33±39,89*
5 тижнів	1037,90±82,07*	198,42±13,62*	469,01±28,40*
6 тижнів	957,18±57,14*	181,13±7,80*	427,61±24,77*
7 тижнів	881,87±70,15*	159,64±9,12*	389,22±31,47*
8 тижнів	740,01±56,04*	134,62±11,39*	376,29±17,63*

Примітка: \* – вірогідність відміни показника відносно контрольної групи ( $p < 0,05$ )

Таким чином, отримані в результаті наших досліджень дані про метаболізм оксида азоту за вмістом нітрит- і нітрат-аніонів ( $NO_2^-/NO_3^-$ ) та продуктів нітрозилування АФА- нітрозотіолів (в основному глутатіону і продуктів нітрозилування SH-груп білків) дають підстави стверджувати, що формування алкогольної залежності супроводжується утворенням пероксинітриту і свідчить про прояви нітрозативного і оксидативного стресу в головному мозку щурів. На нашу думку, гіперпродукція оксида азоту на початкових етапах формування алкогольної залежності (4 тижднів) може розглядатися як наслідок прямої вазотоксичної дії алкоголю на судини головного мозку та відігравати провідну роль у порушенні судинного тонуусу з формуванням стійкої вазодилатації. Зростання вмісту нітрит- і нітрат-аніонів ( $NO_2^-/NO_3^-$ ) може розглядатися як індикатор інтенсивно-

сті синтезу NOS (iNOS та cNOS) в макрофагах, ендотелію судин і відповідних відділах головного мозку. За участю нітрат- та нітритредуктазних реакцій в організмі нітрат- та нітрит-аніони відновлюються до NO і таким чином, формується цикл оксида азоту. Захисною реакцією клітин від ушкоджуючого впливу алкоголю є депонування оксида азоту у вигляді стабільних метаболітів з накопиченням нітрозотіолів, які виконують функції внутрішньоклітинного депо та міжклітинного транспорту оксида азоту до клітин-мішеней. Нітрозотіоли, зв'язуючи вільний NO, перешкоджають його взаємодії з аніонами супероксиду и таким чином здатні знижувати рівень утворення пероксинітриту. Але, надмірне утворення NO, нітрозотіолів та пероксинітриту викликає блокаду внутрішньоклітинного дихання, пригнічення активності ферментів циклу Кребса та синтезу ДНК, порушує зв'яз-

зки між компонентами мембран клітин і цитоплазматичних білків та поглиблює енергетичний дисбаланс.

**Висновок.** Таким чином, за умов хронічного споживання алкоголю в головному мозку щурів активуються відповідні ланки циклу NO: NOS та депонування NO у вигляді нітрозотіолів. Підвищення продукції оксиду азоту може відігравати важливу роль у патогенезі алкогальної інтоксикації, оскільки на фоні розвитку оксидативного і нітрозативного стресу створюються усі передумови до продукції значної кількості пероксинітриту, реалізації його цитотоксичної дії. Про утворення пероксинітриту свідчить зростання рівня нітрат-аніону та нітрозотіолів. В той же час, у подальшому, накопичення оксиду азоту може бути одним із факторів посилення токсичної дії етанолу, який реалізується шляхом вторинного утворення токсичних аніон-радикалів.

#### Список використаних джерел

1. Анохина И.П. Основные биологические механизмы зависимости от психоактивных веществ / И.П. Анохина // Вопросы наркологии. – 2013. – № 6. – С. 40-59.
2. Пиголкин Ю.И. Судебно-медицинская диагностика отравлений спиртами. – М.: МИА, 2006. – 576 с.
3. Fadda F. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. / F. Fadda, Z.L. Rossetti // Progress in Neurobiology. – 1998. – № 4. – P. 385–431. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
4. Dahchour Abdelkader. Effects of acamprosate on excitatory amino acids during multiple ethanol withdrawal periods/Abdelkader Dahchour and Philippe De Witte // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. – 2003. – № 3. – p. 465-470. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
5. Bredt D.S. Nitric oxide mediates glutamate linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum / D.S. Bredt, S.H. Snyder // Proceedings of the National Academy of Science. – 1989. – № 86. – p. 9030-9033. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
6. Зозуля Ю. Мультифункциональность и метаболизм оксида азота в центральной нервной системе/ Ю.Зозуля, Л.Сенько // Академія медичних наук України. – 2000. – № 1. – С. 3-26.
7. Реутов В.П. / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, В.Е. Охотин, Н.С. Косицин / Циклическое превращение оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1998. – 159 с.
8. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотіолы-две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биологических системах / А.Ф. Ванин // Биохимия. – 1998. – № 7. – С. 924-938.
9. Сагач В.Ф. Пригнічення оксидативного та нітрозативного стресу як механізм кардіо- і вазопротекторної дії екдистерону за умов експериментального цукрового діабету I типу / В.Ф. Сагач, Ю.П. Коркач, А.В. Коцюрба, О.Д. Присяжна. // Фізіологічний журнал. – 2008. – Т. 54, № 5. – С. 46–54.
10. Харченко Н.К. Роль измененной функциональной активности катехоламиновой и опиатной систем в механизме формирования и развития алкогольной зависимости/Н.К. Харченко // Архив психиатрии. – 1998. – № 1(16). – с. 123-128.
11. Chin S. Increased activity and expression of Ca<sup>2+</sup> – dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats / S. Chin, K. Pandey, S. Shi [et al.] // American Journal of Physiology. – 1999. – Vol. 277, № 5. – P. 797–804. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
12. Salter Mark. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent nitric oxide synthases / Mark Salter, Richard G. Knowles, Salvador Moncada // FEBS

Letters. – 1991. – Vol. 291, № 1 – P. 145–149. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

13. Green L. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]-nitrate in biological fluids / L. Green, D. Wagner, J. Glogowski [et al.] // Analytical Biochemistry. – 1982. – Vol. 126, № 1. – P. 131–138. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

14. Куровська В.О. Роль оксиду азоту в ішемічних і ішемічнореперфузійних ушкодженнях головного мозку/ В.О. Куровська, В.П. Пішак, С.С. Ткачук // Буковинський медичний вісник. – 2008. – Т. 12, № 4. – С. 143-149.

15. Максимович Н.Е. Особенности формирования уровня оксида азота в плазме крови крыс при ишемических и реперфузионных повреждениях головного мозга / Н.Е. Максимович // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2004. – № 3. – С. 55-60.

16. Зозуля Ю. Мультифункциональность и метаболизм оксида азота в центральной нервной системе/ Ю.Зозуля, Л.Сенько // Академія медичних наук України. – 2000. – № 1. – С. 3-26.

17. Малышев И. Стресс, адаптация и оксид азота / И. Малышев, Е. Манухина // Биохимия. – 1998. – № 7. – С. 992-1006.

18. Горрен А. Универсальная и комплексная энзимология синтазы оксида азота/ А. Горрен, Б. Майер // Биохимия. – 1998. – № 7. – С. 870-880.

19. Башкатова В. Оксид азота в механизмах повреждения мозга, обусловленного нейротоксическим действием глутамата/ В. Башкатова, К. Раевский // Биохимия. – 1998. – № 7. – С. 1020-1028.

20. Викторов И.В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мозга/ И.В. Викторов // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. – 2000. – № 4. – С. 5-10.

21. Сагач В.Ф. Пригнічення оксидативного та нітрозативного стресу як механізм кардіо- і вазопротекторної дії екдистерону за умов експериментального цукрового діабету I типу / В.Ф. Сагач, Ю.П. Коркач, А.В. Коцюрба, О.Д. Присяжна. // Фізіологічний журнал. – 2008. – Т. 54, № 5. – С. 46–54.

22. Coyle J.T. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders/ J.T. Coyle, P. Puttfarcken // Science. 1993. – Vol. 262. – P. 689-695. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

23. Гарматина О.Ю. Индуцибельная синтаза оксида азота при патологии сердца / О.Ю. Гарматина, М.Н. Ткаченко, А.А. Мойбенко // Журнал АМН Украины. – 2005. – Т. 11. – № 4. – С. 645–659.

24. Зарицька М.В. Участь різних ізоформ NO-синтази в регуляції метаболізму оксиду азоту при стрептозоцинозному діабеті / М.В. Зарицька, Н.О. Сибірна. // Лабораторна діагностика. – 2001. – № 4. – С. 22–25.

25. Syapin P. J. Alcohol and nitric oxide production by cells of the brain / P. J. Syapin // Alcohol. – 1998. – V. 16. – P. 159–165. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

26. Greenberg S. Ethanol metabolism is not required for inhibition of LPS-stimulated transcription of inducible nitric oxide synthase / S. Greenberg // Alcohol. – 1999. – V. 17. – P. 203–213. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

27. Дереча Л.Н. Алкоголь и его действие на организм: обзор литературы/ Л.Н. Дереча // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Серія: Біологія. – 2007. – № 2. – с. 7-16.

28. Moibenko O.O. Fundamental mechanisms of action of nitric oxide on the cardiovascular system, as the basis of pathogenetic treatment of diseases / O.O. Moibenko, V.F. Sagach, M.M. Tkachenko [et al.] // Fiziologichnij Zhurnal. – 2004. – № 1. – с. 11-30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

29. Lee C. I. Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite / C. I. Lee, X. Lin, J. L. Zweier // The Journal of Biological Chemistry. – 2000. – № 3. – P. 9369–9376. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

30. Sharinov R.R. Induction of oxidative stress in heart mitochondria by focal ischemia – reperfusion brain and protective effect of ecdysterone / Sharinov R.R., Kotsiuruba A.V., Kopyak B.S., Sagach V.F. // Fiziologichnij Zhurnal. – 2014. – № 3. – P. 11-17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Надійшло до редколегії 25.11.2015

Ю. Омельченко, асп., О. Сокур, д-р биол. наук, О. Харченко, канд. биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук  
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

### МЕТАБОЛИЗМ ОКСИДА АЗОТА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС СО СФОРМИРОВАННОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ

*Изучено метаболизм оксида азота в головном мозге крыс с сформированной алкогольной зависимостью. Выявлено активацию NO-синтазы на начальных этапах исследований (4 недели) в результате индукции как iNOS, так и ее конститутивных изоформ (nNOS та eNOS), тогда как длительное употребление алкоголя сопровождается активацией только cNOS, которая зависит от концентрации ионов кальция. Исследование пула стабильных метаболитов NO: нитрит- и нитрат анионов (NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>) и нитрозотіолів выявило увеличение их содержания на всех этапах исследований.*

*Ключевые слова:* NO-синтаза, мозг, алкогольная зависимость.

Yu. Omelchenko, PhD stud., O. Sokur, DSc., O. Harchenko, PhD., L. Ostapchenko, DSc.  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

### OXIDE METABOLISM IN RAT BRAIN WITH FORMED ALCOHOL DEPENDENCE

*Identified activation of NO-synthase in the initial stages of the research (4 weeks) as a result of the induction of both iNOS and its constitutive isoforms (nNOS and eNOS), whereas prolonged system alcohol using is accompanied by activation of only cNOS, which depends on the calcium ions concentration. The pools study of stable NO metabolites exposed: nitrite and nitrate anions (NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>) and nitrosothiols revealed an increase in their content at all stages of the research.*

*Key words:* NO-synthase, brain, alcohol dependence.