

## ЗМІНИ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ПЕЧІНКИ ТА НИРОК ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ПАНКРЕАТИТІ ТА ЗА ДІЇ МОДУЛЯТОРІВ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ І РЕКОМБІНАНТНОЇ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ

О. З. ЯРЕМЧУК, К. А. ПОСОХОВА

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського», Україна;  
e-mail: yaremchukolya@rambler.ru

Досліджено функціональний стан печінки і нирок при ураженні підшлункової залози щурів та за дії аміногуанідину, L-аргініну та рекомбінантної супероксиддисмутази. Встановлено порушення рівноваги у функціонуванні прооксидантно-антиоксидантної системи (зниження активності супероксиддисмутази, каталази, вмісту відновленого глутатіону, зростання рівня гідропероксидів ліпідів, ТБК-активних продуктів), електронно-транспортного ланцюга мітохондрій (зниження активності сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази), підвищення рівня нітрит-аніону в печінці та нирках, зростання активності  $\alpha$ -амілази та концентрації фактора  $\alpha$  некрозу пухлин у сироватці крові тварин при експериментальному ураженні підшлункової залози за гострого панкреатиту. У цих умовах інгібітор індукцибельної NO-синтази аміногуанідин сприяє зниженню проявів оксидативного стресу в печінці та нирках на тлі нормалізації синтезу оксиду азоту. Доведено можливість підвищення активності антиоксидантної системи шляхом комбінованого введення рекомбінантної супероксиддисмутази та аміногуанідину. Встановлено, що рекомбінантна супероксиддисмутаза частково нівелює негативний вплив L-аргініну на біохімічні показники печінки та нирок щурів при експериментальному гострому панкреатиті.

*Ключові слова:* антиоксидантна система, печінка, нирки, експериментальний панкреатит, аміногуанідин, L-аргінін, рекомбінантна супероксиддисмутаза.

Печінка є органом-мішенню панкреатогенної токсемії, яка розвивається внаслідок потрапляння у кров активованих панкреатичних лізосомних ензимів, біологічно активних речовин, токсичних продуктів розпаду підшлункової залози (ПЗ) [1]. Це призводить до порушень детоксикаційної, жовчечутворювальної, білоксинтезувальної та інших функцій печінки, що погіршує перебіг гострого панкреатиту (ГП) за рахунок накопичення в організмі великої кількості токсичних речовин і метаболітів, які концентруються у крові і виявляють пошкоджувальну дію на печінку через блокування ензиматичних систем [2]. Зростання некротичних процесів, які призводять до деструкції органа та гострої печінкової недостатності обумовлено пригніченням функціональних компенсаторних можливостей антирадикального та антиоксидантного захисту печінки [2, 3]. Усі токсичні речовини та ензими, які не були затримані печінкою, виділяються із сечею, ушкоджуючи нирки. Ниркова недостатність при ГП спостерігається

у 7 разів частіше, ніж при інших гострих захворюваннях [4].

ГП супроводжується зниженням рівня АТР, гіперпродукцією активних форм кисню (АФК) – супероксидних, пероксидних та гідропероксидних радикалів, оксиду азоту (NO). АФК, які беруть участь у патогенезі початкового етапу захворювання, виявляють виражений токсичний і прямий пошкоджувальний вплив відповідно до ступеня розвитку ГП [5–8]. Пошкоджувальній дії АФК протистоить антиоксидантна система (АОС), яка попереджає утворення, забезпечує зв'язування та модифікацію вільних радикалів, руйнування пероксидів, екранування функціональних груп протеїнів й інших молекул [3, 8]. Оцінка стану прооксидантно-антиоксидантної системи має важливе значення в діагностиці і визначенні форми ГП [3, 7, 9], але стан печінки та нирок в умовах ураження ПЗ залишається недостатньо вивченим.

Однією з ланок, що відіграють роль у механізмах ураження печінки та нирок при ГП є система оксиду азоту (NO). Основним стиму-

лятором експресії синтаз оксиду азоту (NOS, 1.14.13.39) є активація вільнорадикальних процесів, яка пов'язана з активацією синтезу цитокінів, а також із пригніченням активності антиоксидантних ензимів [6]. Роль NO в патогенезі ГП обумовлена як прямою, так і опосередкованою дією. Активуючи розчинну гуанілатциклазу, NO підвищує активність  $\text{Ca}^{2+}$ -АТР-ази і сприяє виходу  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму. Вільний  $\text{Ca}^{2+}$  активує деякі протеази і спричинює вивільнення із тромбоцитів фібриногену. Перераховані явища призводять до підвищення судинної проникності, зміни рН і активації фосфоліпази  $\text{A}_2$  з наступною активацією каскаду протеолітичних реакцій в ПЗ [10].

Рівень NO, який продукується ендотелієм змінюється (знижується або підвищується) за різних моделей експериментального ГП [1, 10, 11]. Посилення синтезу NO спостерігається при багатьох патологіях, що сприяє формуванню адаптаційних процесів у живому організмі. Однак у разі надлишкової продукції NO втрачає свої захисні функції та виявляє вазодепресивну і цитотоксичну дію [12]. Цитотоксичні властивості NO, як відомо, в більшості випадків реалізуються через утворення пероксинітриду ( $\text{ONOO}^-$ ) внаслідок взаємодії NO з активним радикалом кисню супероксид-аніоном ( $\text{O}_2^-$ ). У разі високої концентрації  $\text{ONOO}^-$  призводить до генерації каскаду високотоксичних прооксидантів, які можуть окислювати ліпіди, тіолові групи та пошкоджувати клітинні мембрани [12, 13].

Водночас не з'ясовано, чи є порушення мікроциркуляції (МЦ) в ПЗ ініціюючими факторами, або наслідком прогресування ГП [1], які характеризуються локальним звільненням панкреатичних ензимів, вазоактивних медіаторів, вазодилатацією і вазоконстрикцією, адгезією лейкоцитів, внутрішньосудинним зсіданням крові, стазом у капілярах тощо [1, 6].

Але дані щодо ролі системи оксиду азоту за ураження підшлункової залози і у разі пошкодження печінки та нирок при ГП є недостатні і доволі суперечливі [1, 4, 6, 7, 10, 11, 14]. Тому метою роботи було дослідити стан окремих показників прооксидантно-антиоксидантної системи, електронно-транспортного ланцюга мітохондрій печінки та нирок при експериментальному ураженні підшлункової залози за дії модуляторів рівня NO і АФК (аміногуанідину, L-аргініну, рекомбінантної супероксиддисмутази).

## Матеріали і методи

Дослідження проводили на нелінійних білих щурах-самцях масою 170–200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Експерименти проводили відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених на I Національному конгресі з біоетики (Київ, 2000) та узгоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Піддослідних тварин було розділено на 7 груп: 1 (контроль) – несправжньо оперовані тварини, яким проводили серединну лапаротомію; 2 – тварини з експериментальним ураженням ПЗ (ГП моделювали за методикою С.О. Шалімова [15] шляхом локального охолодження поверхні підшлункової залози хлоретилом протягом 10 с в умовах загального знеболювання (кетамін, внутрішньом'язове введення в дозі 0,2 мл на 100 г маси тварини), 3–5 групи – тварини з ГП, яким вводили відповідно аміногуанідин (10 мг/кг, Хімлаборреактив, Україна) [16], L-аргінін гідрохлорид (25 мг/кг, Sigma, США) [14], препарат рекомбінантної супероксиддисмутази – рексод (0,05 мг/кг, ВАР РЭСБИО, Росія) [17]; 6–7 групи – тварини з ГП, яким вводили рексод у комбінації з аміногуанідином та L-аргініном відповідно. Всі речовини вводили внутрішньочеревинно один раз на день упродовж 7 діб перед моделюванням гострого панкреатиту, та одноразово через 12 год після заморожування ПЗ. Тварини контрольних груп одержували внутрішньочеревинно ідентичні об'єми розчинника. По 6 тварин із кожної групи, в умовах тіопентал-натрієвого наркозу (внутрішньочеревинне введення 1%-го розчину з розрахунку 50 мг/кг маси тварини), виводили з експерименту через 7 діб після моделювання ГП. Для дослідження використовували гомогенати печінки, нирок та сироватку крові. Печінку та нирки охолоджували у середовищі виділення, яке містило 0,25 М сахарози, 1 мМ EDTA та 10 мМ трис-НСІ-буфера (рН 7,4). Готували 10%-ні гомогенати органів, охолоджену наважку (1 г) гомогенізували у скляному гомогенізаторі із слабо притертим тефлоновим поршнем.

Активність супероксиддисмутази (СОД, 1.15.1.1) визначали за ступенем зниження відновлення нітротетразолію синього у присутності NADH і феназинметасульфату [18]. Активність каталази (КАТ, 1.11.1.6) встановлювали згідно з методом [19], фіксуючи

зміну оптичного поглинання внаслідок реакції пероксиду водню з молібдатом амонію. Вміст відновленого глутатіону (G-SH) визначали за здатністю його вільних SH-груп взаємодіяти з 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойною кислотою з утворенням тіонітрофенільного аніону, кількість якого прямопропорційна вмісту G-SH [20].

Рівень продуктів вільнорадикального окислення ліпідів визначали за вмістом гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) [21]. Метод ґрунтується на здатності екстрагованих гептанізопропіловою сумішшю ГПЛ інтенсивно поглинати світло при довжині хвилі 232 нм та визначенні ТБК-активних продуктів [22] в реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою.

Стан енергозабезпечувальних процесів мітохондрій оцінювали за активністю сукцинатдегідрогенази (СДГ, 1.3.99.1) та цитохромоксидази (ЦХО, 1.9.3.1). Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування 10%-го гомогенату печінки та нирок. Мітохондріальну фракцію одержували, центрифугуючи без'ядерний супернатант протягом 10 хв при 6500 об./хв. Одержаний осад мітохондрій ресуспендували в середовищі виділення. Всі операції проводили на холоді. Активність СДГ визначали за відновленням фериціаніду калію до фероціаніду сукцинатом під дією СДГ [23]. Принцип методу визначення ЦХО ґрунтується на здатності останньої окислювати диметил-пара-фенілендіамін і

$\alpha$ -нафтол з утворенням індофенолового синього [24].

Про вміст NO у гомогенатах органів робили висновок за кількістю його стабільного метаболіту нітрит-аніону ( $\text{NO}_2^-$ ), який визначали методом Green L. C. et al. за даними кольорової реакції з реактивом Гріса [25] на спектрофотометрі СФ-46. У сироватці крові визначали концентрацію фактора некрозу пухлин  $\alpha$  (ФНП- $\alpha$ ) методом імуноферментного аналізу (використовуючи стандартний набір реактивів), активність  $\alpha$ -амілази (3.2.1.1.) методом Каравея (використовуючи стандартний набір реактивів ТОВ НВП Філісіт-Діагностика, Україна).

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

### Результати та обговорення

Внаслідок проведених досліджень встановлено, що у сироватці крові щурів 2-ї групи з експериментальним ураженням ПЗ спостерігається підвищення активності  $\alpha$ -амілази (у 9,5 раза через 7 діб після охолодження ПЗ), порівняно із показниками у тварин контрольної групи (рис. 1).

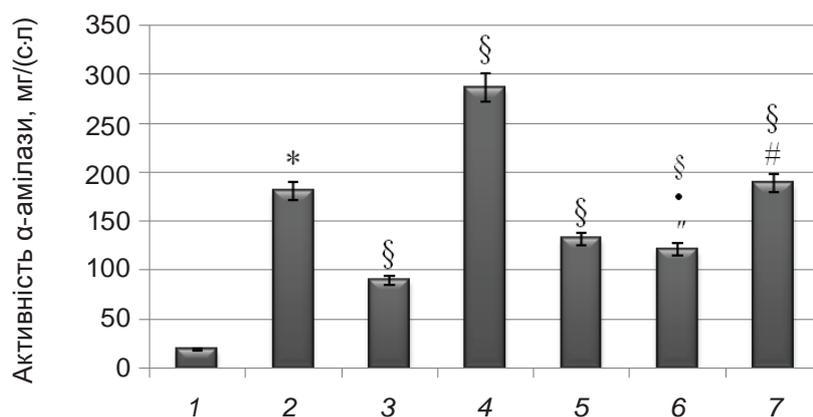


Рис. 1. Активність  $\alpha$ -амілази в сироватці крові щурів з експериментальним ураженням підшлункової залози та введенні L-аргініну, аміногуанідину і рекомбінантної супероксиддисмутази ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ). Тут і на рис. 2, 3: 1 – контроль; 2 – тварини з експериментальним ГП; 3 – ГП + аміногуанідин; 4 – ГП + L-аргінін; 5 – ГП + рексод; 6 – ГП + рексод + аміногуанідин; 7 – ГП + рексод + L-аргінін. \*  $P < 0,05$  по відношенню до контролю; § –  $P < 0,05$  по відношенню до групи тварин з експериментальним ураженням підшлункової залози; #  $P < 0,05$  по відношенню до групи тварин з ГП, яким вводили L-аргінін; •  $P < 0,05$  по відношенню до групи тварин, яким вводили аміногуанідин; "  $P < 0,05$  по відношенню до групи тварин, яким вводили рексод

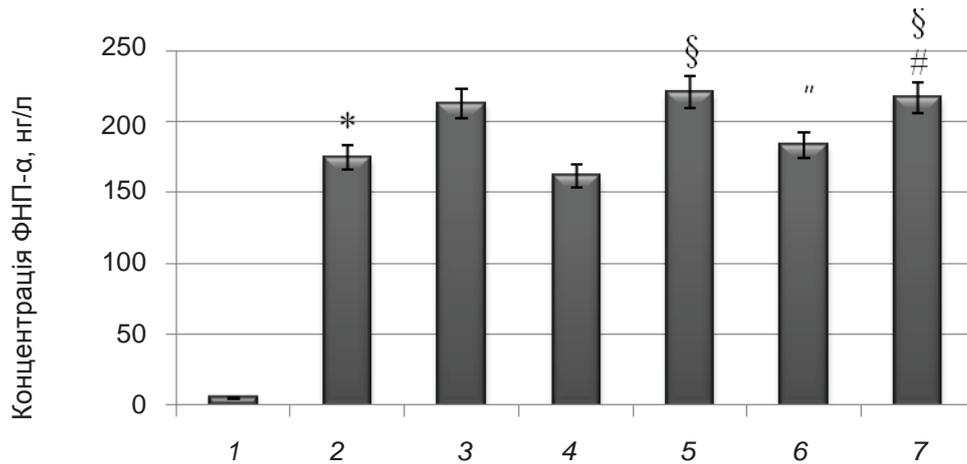


Рис. 2. Концентрація ФНП-α у сироватці крові щурів з експериментальним ураженням підшлункової залози та за введення L-аргініну, аміногуанідину і рекомбінантної супероксиддисмутази ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

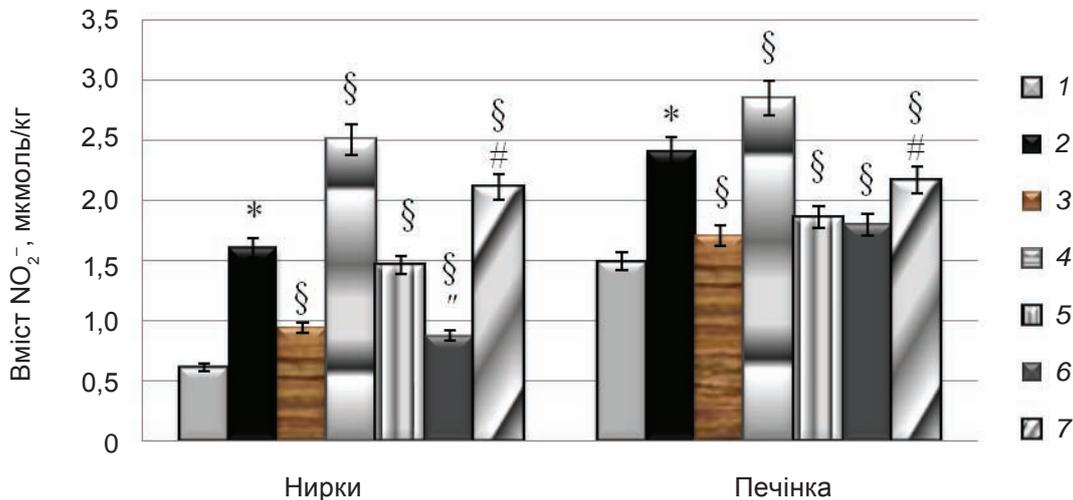


Рис. 3. Вміст нітрит-аніонів у печінці та нирках щурів з експериментальним ГП та за введення L-аргініну, аміногуанідину і рекомбінантної супероксиддисмутази ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Нами встановлено зростання концентрації ФНП-α у сироватці крові тварин з ГП у 37 разів порівняно з несправжньо оперованими тваринами (рис. 2). Цитокіни, які є продуктами активованих мононуклеарних фагоцитів і ендотеліальних клітин, зокрема ФНП-α, беруть участь у розвитку ендогенної інтоксикації, синдрому системної запальної відповіді, оксидативного стресу, а також активації цілого каскаду імунологічних реакцій [6].

Відомо, що цитокіни, зокрема ФНП-α, прискорюють синтез NO [6, 7, 26]. При ГП у наших дослідках відмічено зростання рівня його стабільного метаболіту  $\text{NO}_2^-$  в гомогенатах тканини печінки (на 62%) та нирок (на 162%)

(рис. 3). За даними літератури, підвищення рівня NO при ГП є одним із факторів активації процесів вільнорадикального окислення [13].

В останні роки саме з інтенсифікацією ПОЛ та активацією цитокінового каскаду пов'язують ураження позаочеревинної клітковини, ПЗ та органів черевної порожнини при деструктивному ГП [3, 6].

Нами встановлено зростання вмісту продуктів ліпопероксидації при ГП у досліджуваних органах, що узгоджується із даними інших дослідників [3], якими встановлено зростання показників ПОЛ у сироватці крові тварин при ГП. Зокрема, вміст ГПЛ зростає у печінці на 143%, у нирках – на

Таблиця 1. Показники прооксидантно-антиоксидантної системи в печінці та нирках при експериментальному ГП та за введення L-аргініну, аміногуанідину і рекомбінантної супероксиддисмутази ( $M \pm m, n = 6$ )

Група	Показники				
	СОД, ум.од./кг	КАТ, мкат/кг	G-SH, ммоль/кг	ГПЛ, 10 <sup>3</sup> ум. од./кг	ТБК- активні продукти, мкмоль/кг
<i>Печінка</i>					
Контроль	3,69±0,08	10,25±0,07	4,13±0,05	4,48±0,01	5,10±0,09
ГП	1,16±0,08*	4,97±0,08*	1,61±0,04*	10,90±0,09*	12,29±0,05*
ГП + аміногуанідин	2,22±0,11§	8,47±0,20§	3,01±0,04§	7,50±0,24§	7,85±0,06§
ГП + L-аргінін	1,21±0,04	4,29±0,10§	1,41±0,03§	12,47±0,19§	13,60±0,15§
ГП + рексод	2,19±0,13§	7,78±0,13§	2,40±0,04§	7,07±0,17§	9,41±0,27§
ГП + рексод + аміногуанідин	2,95±0,18§•"'	9,89±0,10§•"'	3,51±0,09§•"'	6,07±0,32§•"'	5,88±0,17§•"'
ГП + рексод + L-аргінін	1,53±0,08§.#	5,58±0,05§.#	1,75±0,02§.#	9,47±0,34§.#	9,40±0,22§.#
<i>Нирки</i>					
Контроль	3,11±0,04	7,52±0,08	3,11±0,06	4,05±0,05	4,60±0,09
ГП	1,30±0,04*	3,41±0,19*	1,23±0,05*	8,63±0,19*	10,01±0,18*
ГП + аміногуанідин	1,85±0,08§	4,99±0,23§	1,94±0,06§	6,20±0,08§	7,75±0,15§
ГП + L-аргінін	1,01±0,02§	2,46±0,05§	0,98±0,05§	10,43±0,48§	12,08±0,53§
ГП + рексод	2,40±0,09§	5,53±0,11§	1,74±0,04§	5,10±0,24§	8,86±0,15§
ГП + рексод + аміногуанідин	2,54±0,07§•"	5,11±0,15§	1,99±0,06§•"	5,9±0,11§•"	6,88±0,07§•"
ГП + рексод + L-аргінін	1,53±0,06§.#	2,92±0,04§.#	1,35±0,02#	7,40±0,44§.#	8,16±0,14§.#

Тут і в табл. 2: \*  $P < 0,05$  по відношенню до контролю; §  $P < 0,05$  по відношенню до групи тварин з експериментальним ураженням підшлункової залози; #  $P < 0,05$  по відношенню до групи тварин з ГП, яким вводили L-аргінін; •  $P < 0,05$  по відношенню до групи тварин, яким вводили аміногуанідин; "  $P < 0,05$  по відношенню до групи тварин, яким вводили рексод

113%, кількість ТБК-активних продуктів збільшується у печінці – на 141%, у нирках – на 117% відносно контролю (табл. 1).

Згідно із сучасними уявленнями, інтенсифікація ПОЛ поєднується зі змінами антирадикального захисту, що виявляється дисрегуляцією в системі організму прооксидантно-антиоксиданти [3, 27].

Внаслідок проведених досліджень встановлено зниження активності та вмісту компонентів АОС в печінці та нирках щурів при ГП. Так, активність СОД зменшується в гомогенатах печінки на 68%, в гомогенатах нирок – на 58%, функціональна здатність КАТ знижується в печінці на 51%, в нирковій тканині – на 55% (табл. 1). В той же час відбувається зменшення пулу G-SH в печінці та в нирках на 61% порівняно з контроль-

ною групою. G-SH бере безпосередню участь у знешкодженні вільних радикалів та їхніх токсичних продуктів, а також у відновленні сульфгідрильних груп ензимів [27]. Зниження вмісту G-SH може бути пов'язано як з інтенсифікацією процесів ПОЛ в ураженому органі, так і підсиленням катаболізму глутатіону [3].

Відомо, що за активації процесів перекислення мембранних ліпідів знижується енергозабезпечення клітин внаслідок роз'єднання дихання і окисного фосфорилування в мітохондріях та спостерігається розвиток їхньої дисфункції [28, 29]. Внаслідок наших досліджень при ГП виявлено порушення функціонування мітохондрій, про що свідчить зменшення активності СДГ у печінці (на 50%) та у нирках (на 45%) і ЦХО – на 37% у печінці

Таблиця 2. Показники системи мітохондріального транспорту електронів у печінці та нирках щурів при ГП та введенні L-аргініну, аміногуанідину і рекомбінантної супероксиддисмутази ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Показники	Нирки		Печінка	
	СДГ, ммоль/(кг·хв)	ЦХО, ммоль/(кг·хв)	СДГ, ммоль/(кг·хв)	ЦХО, ммоль/(кг·хв)
Контроль	5,65 ± 0,05	8,53 ± 0,14	7,25 ± 0,11	7,53 ± 0,15
ГП	3,11 ± 0,03*	5,26 ± 0,08*	3,65 ± 0,02*	4,74 ± 0,14*
ГП + аміногуанідин	4,91 ± 0,05 <sup>§</sup>	7,25 ± 0,05 <sup>§</sup>	6,41 ± 0,08 <sup>§</sup>	7,08 ± 0,13 <sup>§</sup>
ГП + L-аргінін	2,94 ± 0,04 <sup>§</sup>	4,51 ± 0,18 <sup>§</sup>	3,17 ± 0,05 <sup>§</sup>	4,26 ± 0,05 <sup>§</sup>
ГП + рексод	3,65 ± 0,07 <sup>§</sup>	6,43 ± 0,26 <sup>§</sup>	5,08 ± 0,06 <sup>§</sup>	5,33 ± 0,15 <sup>§</sup>
ГП + рексод + аміногуанідин	3,94 ± 0,07 <sup>§,·</sup>	6,63 ± 0,24 <sup>§,·</sup>	4,98 ± 0,26 <sup>§,·</sup>	5,60 ± 0,11 <sup>§,·</sup>
ГП + рексод + L-аргінін	3,74 ± 0,05 <sup>§,#</sup>	6,05 ± 0,22 <sup>§,#</sup>	4,23 ± 0,05 <sup>§,#</sup>	5,95 ± 0,21 <sup>§,#</sup>

та на 38% у нирках по відношенню до контролю (табл. 2).

Зниження активності ЦХО у мітохондріях печінки та нирок при ГП, яке спостерігається, може бути пов'язане з обмеженням у цих умовах надходження електронів від субстратної ланки дихального ланцюга через цитохроми *b-c* [29]. Встановлені зміни активності ферментів дихального ланцюга свідчать про пригнічення функції мітохондрій, що може супроводжуватись зниженням вмісту макроергічних сполук [28, 29] та негативно позначається на перебігу біохімічних процесів у печінці та нирках при ураженні ПЗ.

Отже, за умов експериментального ураження ПЗ у тканині печінки та нирок щурів встановлено порушення рівноваги у прооксидантно-антиоксидантній системі, яке супроводжується накопиченням продуктів ПОЛ, зниженням активності ферментів антиоксидантного захисту та дихального ланцюга мітохондрій.

Для детальнішого з'ясування ролі NO у механізмах ураження печінки і нирок в умовах ГП щурам вводили інгібітор (аміногуанідин) та субстрат (L-аргінін) NO-синтаз.

За результатами проведених нами експериментів встановлено, що на фоні введення інгібітора iNOS аміногуанідину спостерігається вірогідне зниження активності  $\alpha$ -амілази (на 50%) у сироватці крові (рис. 1) порівняно з показниками групи тварин з ГП. Це дає можливість припустити, що гіперпродукція NO відіграє суттєву роль у патогенезі ГП, зокрема в механізмах пошкодження ПЗ, печінки та нирок в умовах ГП.

Разом з тим, за введення аміногуанідину концентрація ФНП- $\alpha$  вірогідно не змінюється

відносно групи тварин з експериментальним ураженням ПЗ (рис. 2). Відомо, що цитокіни, зокрема ФНП- $\alpha$ , через активацію макрофагів, прискорюють синтез NO, що поєднується із зростанням кількості протеїнів гострої фази запалення та АФК і призводить до пошкодження тканин [6, 7, 26]. Тому дія аміногуанідину пов'язана з безпосереднім впливом на каталітичні центри NO-синтаз, а не з інгібуванням індукції їхньої відповідної форми.

На фоні застосування аміногуанідину встановлено зниження вмісту  $\text{NO}_2^-$  у печінці та нирках (на 29 та 42% відповідно) по відношенню до тварин 2-ї групи (рис. 3). Зазначені зміни узгоджуються з результатами інших дослідників, які відмічали зменшення продукції NO у сироватці крові піддослідних тварин, які одержували інгібітори NOS [26].

У разі застосування аміногуанідину відмічено пригнічення активності процесів переокислення мембранних ліпідів: зниження вмісту ГПЛ (на 31 та 28%) та ТБК-активних продуктів (на 36 та 23%) у печінці та нирках відповідно порівняно із показниками групи тварин з ГП (табл. 1). Про активацію системи антиоксидантного захисту в цій серії свідчить підвищення активності СОД (у печінці – на 91%, у нирках – на 42%). Зростає активність КАТ (у печінці – на 70%, у нирках – на 46%) та вміст G-SH (у печінці – на 86%, у нирках – на 58%). Встановлено також зростання активності мітохондріальних ферментів під впливом аміногуанідину: СДГ (в печінці – на 75%, у нирках – на 58%) та ЦХО (у печінці – на 49%, у нирках – на 38%) відносно групи щурів з експериментальним ураженням ПЗ (табл. 2).

Отже, дія інгібітора NO-синтази аміногуанідину спрямована на відновлення активності та вмісту компонентів АОС, ензимів електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, зниження рівня ПОЛ у печінці та нирках при експериментальному ураженні ПЗ на тлі нормалізації процесів синтезу NO.

Результати наших експериментів свідчать, що на фоні введення попередника синтезу NO L-аргініну спостерігається підвищення активності  $\alpha$ -амілази (у сироватці крові на 59%) (рис. 1) та концентрації  $\text{NO}_2^-$  (у печінці – на 18%, у нирках – на 60%) (рис. 3) відносно таких показників у групі тварин з експериментальним ураженням ПЗ. Рівень ФНП- $\alpha$  на фоні застосування L-аргініну вірогідно не змінюється. Встановлено активацію процесів ПОЛ у печінці, про що свідчить підвищення вмісту ГПЛ (на 14%) та ТБК-активних продуктів (на 11%) (табл. 1). Одночасно у гомогенаті нирок встановлено зростання вмісту ГПЛ (на 21%) та ТБК-активних продуктів (на 21%), зниження активності СОД (на 23%) та КАТ (у печінці – на 14%, у нирках – на 28%), а також вмісту G-SH (у печінці – на 13%, у нирках – на 20%) порівняно із показниками групи тварин з ГП. Пригнічення активності антиоксидантних ензимів та одночасне зменшення рівня G-SH на тлі введення L-аргініну, ймовірно, опосередковано дією NO, наприклад, його здатністю пригнічувати активність КАТ та SH-вмісних ензимів через взаємодію з SH-групами [28] тощо. Водночас одержані дані можна пояснити негативним впливом вільних радикалів кисню та продуктів переокислення мембранних ліпідів на функціонування АОС.

Введення L-аргініну спричинює зниження активності СДГ (у печінці – на 13%, у нирках – на 6%) та активності ЦХО (у печінці – на 10%, у нирках – на 14%) порівняно з показниками у тварин 2-ї групи (табл. 2). Це також можна пов'язати з дією NO, що утворюється в мітохондріях, та продуктів його взаємодії з  $\text{O}_2^-$  [28, 14].

При ГП в умовах зростання вмісту NO та розвитку оксидативного стресу ймовірність утворення токсичної сполуки  $\text{ONOO}^-$  збільшується. Отже, NO з фактора регуляції перетворюється на чинник патогенезу [13]. Ці дані стали підґрунтям для застосування в наших дослідженнях препарату рексод, що містить рекомбінантну Cu-Zn СОД, одержану методом генної інженерії з культури штаму дріжджів-продуцентів *Saccharomyces cerevisiae* Y 2134 [17]. Як видно з рис. 1, цей ензим, що усуває  $\text{O}_2^-$  сприяє зниженню активності

$\alpha$ -амілази (на 27% – у сироватці крові) та рівня  $\text{NO}_2^-$  (на 23% – у печінці, на 9% – у нирках) (рис. 3) порівняно з показниками групи щурів з ураженням ПЗ. Водночас відбувається зростання концентрації ФНП- $\alpha$  на 26% (рис. 2). До того ж, відмічено зниження активності процесів переокислення мембранних ліпідів: вміст ГПЛ у печінці зменшується на 35%, у нирках – на 41%, ТБК-активних продуктів у печінці – на 23%, у нирках – на 12% (табл. 1). Одержані результати можна пояснити тим, що антиоксиданти, зокрема СОД, гальмують процеси вільнорадикального окислення на різних етапах генерації АМК, попереджаючи їхню пошкоджувальну дію [27]. Про активацію АОС на фоні застосування рекомбінантної СОД свідчить підвищення активності ендогенної СОД у печінці – на 89% та у нирках – на 84%. Підвищується активність КАТ (у печінці – на 56%, у нирках – на 62%). Одночасно зростає вміст G-SH у печінці (на 49%) та у нирках (на 42%). Відновлення функціональної активності мембранозв'язаних ензимів мітохондрій виявляється збільшенням показників СДГ у печінці (на 39%) та у нирках (на 17%), ЦХО у печінці (на 12%) та у нирках (на 21%) порівняно із показниками групи тварин з ГП (табл. 2).

Можна припустити, що позитивний вплив рекомбінантної супероксиддисмутази на стан АОС печінки та нирок при експериментальному ураженні ПЗ реалізується через постачання активної форми СОД та нейтралізації  $\text{O}_2^-$  з наступним зменшенням утворення високореактивного  $\text{ONOO}^-$ . Для перевірки цієї тези ми використовували рексод у комбінації з попередником синтезу NO L-аргініном.

За введення L-аргініну в комбінації з рекомбінантною СОД встановлено зростання концентрації ФНП- $\alpha$  на 34% (рис. 2) та зниження активності  $\alpha$ -амілази на 34% (рис. 1) порівняно із показниками тварин з ГП, яким вводили лише L-аргінін. Одночасно встановлено гальмування процесів ПОЛ, про що свідчить зниження вмісту ГПЛ (у печінці – на 24%, у нирках – на 29%) та ТБК-активних продуктів (у печінці – на 31%, у нирках – на 32%) (табл. 1), зниження концентрації  $\text{NO}_2^-$  (у печінці – на 24%, у нирках – на 18%) (рис. 3). Відмічено зростання активності антиоксидантних ензимів: СОД (на 26 та 52%), КАТ (на 30 та 18%) та вмісту G-SH (на 24 та 38%) у печінці та нирках відповідно. Встановлено зростання активності мітохондріальних СДГ (у печінці – на 33%, у нирках – на 27%) та ЦХО (у печінці – на 40%, у нирках – на 34%) відносно таких показників у групі тварин з

експериментальним ураженням ПЗ, яким вводили L-аргінін (табл. 2).

Встановлено, що комбіноване застосування попередника синтезу оксиду азоту L-аргініну з препаратом рексод дозволяє частково нівелювати негативний вплив L-аргініну на біохімічні показники печінки та нирок щурів при ураженні підшлункової залози. Ймовірно, це обумовлено тим, що у механізмах пошкоджувальної дії NO в цьому разі можуть відігравати роль, крім утворення високоагресивного ONOO<sup>-</sup>, пригнічення дихання мітохондрій, порушення процесів мікроциркуляції [1, 17, 28].

З іншого боку, ми вивчали вплив комбінованого застосування рекомбінантної СОД та інгібітора iNOS аміногуанідину, чинників, які по-різному впливають на негативні наслідки гіперпродукції оксиду азоту.

За комбінованого застосування рексоду та аміногуанідину встановлено вірогідне зниження активності  $\alpha$ -амілази (на 33%) (рис. 1), вмісту NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (у печінці – на 25%, у нирках на 45%) (рис. 2) порівняно з показниками тварин 2-ї групи. Встановлено зниження вмісту ГПЛ (у печінці – на 44%, у нирках – на 32%) та ТБК-активних продуктів (у печінці – на 52%, у нирках – на 31%) (табл. 1). Спостерігається активація компонентів антиоксидантного захисту: підвищується активність СОД (на 154 та 95%), КАТ (на 99 та 50%) та вміст G-SH (на 117 та 63%) у печінці та нирках відповідно. Встановлено зростання активності мітохондріальних СДГ (у печінці – на 36%, у нирках – на 27%) та ЦХО (у печінці – на 18%, у нирках – на 26%) порівняно із показниками групи тварин з експериментальним ураженням ПЗ (табл. 2).

Причому, порівнюючи показники серії, де використовувалося поєднання рекомбінантної СОД та аміногуанідину, з аналогічними даними у групах тварин, які одержували окремо аміногуанідин чи рексод, встановлено вірогідні позитивні відмінності активності СОД, КАТ, вмісту G-SH, ГПЛ та ТБК-активних продуктів у печінці піддослідних тварин (табл. 1). У нирках тварин, яким для корекції стану вводили комбінацію рексоду та аміногуанідину відмічено вірогідне підвищення активності СОД та зниження ТБК-активних продуктів порівняно з тваринами, яким вводили лише інгібітор iNOS. Одночасно в нирках встановлено зростання вмісту G-SH, активності СДГ, зниження вмісту ТБК-активних продуктів та NO<sub>2</sub><sup>-</sup> на фоні зниження активності  $\alpha$ -амілази та ФНП- $\alpha$  у сироватці крові (рис. 1–3) порівняно із відповідними показниками тварин, яким вводили лише рекомбінантну СОД.

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать, що під час експериментального ураження ПЗ у тканині печінки та нирок щурів відбувається порушення окислювального гомеостазу, яке супроводжується накопиченням продуктів пероксидного окислення ліпідів, зниженням активності ензимів антиоксидантного захисту та дихального ланцюга мітохондрій, зростанням концентрації нітрит-аніону, ФНП- $\alpha$ , активності  $\alpha$ -амілази. У цих умовах аміногуанідин та препарат рекомбінантної супероксиддисмутази виявляють виражені антиоксидантні властивості. Отже, одержані дані підтверджують припущення про те, що в механізмах ураження печінки та нирок при ГП важливу роль відіграє гіперпродукція пероксинітриту за рахунок підвищеного утворення оксиду азоту з одночасним зменшенням активності супероксиддисмутази.

#### **ИЗМЕНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕЧЕНИ И ПОЧЕК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАНКРЕАТИТЕ И ПОД ДЕЙСТВИЕМ МОДУЛЯТОРОВ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА И РЕКОМБИНАНТНОЙ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ**

*О. З. Яремчук, Е. А. Посохова*

ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского», Украина;  
e-mail: yaremchukolya@rambler.ru

Исследованы показатели функционального состояния печени и почек при экспериментальном панкреатите у крыс при действии амингуанидина, L-аргинина и рекомбинантной супероксиддисмутазы. Установлено нарушение равновесия в функционировании прооксидантно-антиоксидантной системы (снижение активности супероксиддисмутазы, каталазы, содержания восстановленного глутатиона, рост уровня гидропероксидов липидов, ТБК-активных продуктов), митохондриального транспорта электронов (снижение активности сукцинатдегидрогеназы, цитохромоксидазы), повышение уровня нитрит-аниона в печени и почках, повышение активности  $\alpha$ -амилазы и концентрации фактора  $\alpha$  некроза опухолей в сыворотке крови животных при экспериментальном поражении поджелудочной железы. В этих условиях селективный ингибитор индуцибельной NO-синтазы амингуанидин способствует снижению проявлений оксида-

тивного стресса в печени и почках на фоне нормализации синтеза оксида азота. Доказана возможность повышения активности антиоксидантной системы путем комбинированного введения рекомбинантной супероксиддисмутазы и аминогуанидина. Установлено, что рекомбинантная супероксиддисмутаза частично нивелирует негативное влияние L-аргинина на биохимические показатели печени и почек крыс при остром экспериментальном панкреатите.

**Ключевые слова:** антиоксидантная система, печень, почки, экспериментальный панкреатит, аминогуанидин, L-аргинин, рекомбинантная супероксиддисмутаза.

**THE LIVER AND KIDNEYS  
BIOCHEMICAL INDICES AT THE  
EXPERIMENTAL PANCREATITIS  
IN CASE OF THE ADMINISTRATION  
OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS  
MODULATORS AND RECOMBINANT  
SUPEROXIDE DISMUTASE**

*O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova*

SHEI «I. Ya. Horbachevsky Ternopil  
State Medical University», Ukraine;  
e-mail: yaremchukolya@rambler.ru

**S u m m a r y**

The rats liver and kidneys function indices were studied in case of administration of recombinant superoxide dismutase drug, precursor of nitric oxide L-arginine and the blocker of inducible NO-synthase aminoguanidine. The disturbances in functioning of prooxidant-antioxidant system (a decrease of activity of superoxide dismutase, katalaze, amount of restored glutathione, growth of the level of hydroperoxide lipids, TBA-active products), mitochondrial electron-transport pathways (a decrease in activity of succinate dehydrogenase, cytochrome oxidase), a rise of nitrite-anion level in the liver and kidneys, increase of  $\alpha$ -amylase activity and tumor necrosis factor  $\alpha$  serum concentration were established on the model of pancreas injury in white male rats. Under these circumstances aminoguanidine attenuated the oxidative stress in the liver and kidneys due to normalization of nitric oxide synthesis. The ability to activate the antioxidant system was proved by combined usage of recombinant superoxide dismutase and aminoguanidine. It was determined that recombinant superoxide dismutase partially decreases the negative influence of L-arginine and improves the biochemical indices of the liver and

kidneys function in rats with acute experimental pancreatitis.

**Key words:** antioxidant system, liver, kidneys, experimental pancreatitis, aminoguanidine, L-arginine, recombinant superoxide dismutase.

1. Dobosz M., Hac S., Mionskowska L. et al. // *Physiol. Res.* — 2005. — **54**. — P. 363–368.
2. Чудных С. М., Соловьев Н. А., Иванов Ю. В. // *Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал.* — 2001. — 3. Вып. 4 [Электронный ресурс] <http://www.smolensk.ru/user/sgma/mmorph/n-7-html/ivanov-2.html>.
3. Морозов С. В., Долгих В. Т., Полуэктов В. Л. // *Бюллетень СО РАМН.* — 2005. — **118**, № 4. — С. 32–35.
4. Посохова К. А., Яремчук О. З. // *Біологія тварин.* — 2010. — **12**, №1. — 2010. — С. 212–219.
5. Сибірна Н., Вовк О., Бурда В., Федорович А. // *Вісн. Львівського університету. Серія біологічна.* — 2004. — Вип. 38. — С. 50–56.
6. Винник Ю. С., Черданцев Д. В., Маркелова Н. М. и др. // *Сибирский мед. журн.* — 2005. — № 1. — С. 5–8.
7. Chvanov M., Petersen O. H., Tepikin A. // *Philos. Trans. R. Soc. Biol. Sci.* — 2005. — **360**. — P. 2273–2284.
8. Johnson C. D. // *Gut.* — 2007. — **56**. — P. 1344–1345.
9. Hilal M. A., McPhail M. J. W., Marchand L. et al. // *J. Pancreas.* — 2006. — **7**, N 2. — P. 185–192.
10. Попик М. П., Федорович А. А., Гниденко Ю. П. // *Врачебная практика.* — 2005. — № 6. — С. 57–61.
11. Chen T., Zamora R., Zuckerbraun B. // *Curr. Mol. Med.* — 2003. — N 3. — P. 519–526.
12. Сибірна Н. О., Люта М. Я., Климишин Н. І. // *Біологічні студії.* — 2010. — **4**, № 1. — С. 143–160.
13. Salvemini D., Doyle T. M., Cuzzocrea S. // *Biochem. Soc. Transactions.* — 2006. — **34**, N 5. — P. 965–970.
14. Werner J., Castillo C. F., Rivera J. A. et al. // *Gut.* — 1998. — **43**. — P. 401–407.
15. Шалимов С. А. *Руководство по экспериментальной хирургии / С. А. Шалимов, Ф. П. Радзиховский, Л. В. Кейсевич — М.: Медицина, 1989. — 272 с.*
16. Teng C. H., Mochhala S. M. // *Shock.* — 1999. — **11**, N 1. — P. 51–57.
17. Деримедвідь Л. В. // *Ліки.* — 1999. — № 3–4. — С. 14–17.
18. Чевари С., Чаба И., Секей И. // *Лаб. дело.* — 1985. — № 11. — С. 678–681.

19. *Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. та ін.* // Там же. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
20. *Ellman G. L.* // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – N 82. – P. 70–77.
21. *Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И.* // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33–35.
22. *Андреева Л. И., Кожемякин Л. А., Кишкун А. А.* // Там же. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
23. *Ещенко Н. Д., Вольский Г. Г.* / Методы биохимических исследований. – Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1982. – С. 207–210.
24. *Кривченкова Р. С.* Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 47–49.
25. *Green L. C., Davie A. W., Golawski J. et al.* // Anal. Biochem. – 1982. – **126**, N 1. – P. 131–138.
26. *Лобенко А. О., Демидов В. М., Демидов С. М.* // Журн. АМН України. – 2002. – **8**, № 2. – С. 385–393.
27. *Бленічев І. Ф., Левицький Є. Л., Губський Ю. І. та ін.* // Современ. пробл. токсикол. – 2002. – № 2. – С. 14–23.
28. *Іккерт О., Кургалюк Н., Ткаченко Г. та ін.* // Вісн. Львівського університету. Серія біологічна. – 2002. – Вип. 29. – С. 157–164.
29. *Лукьянова Л. Д.* // Фізіол. журн. – 2003. – **49**, № 3. – С. 17–35.

Отримано 17.02.2011