

УДК: 616.36 - 008.811.5:546.172.6] - 092.4/9

ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИИ НИТРИТОВ/НИТРАТОВ В КРОВИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ХОЛЕСТАЗОМ

Н.Е. МАКСИМОВИЧ, Д.М.Н.; Э.И. ТРОЯН, К.Б.Н.

Кафедра патофизиологии

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

В исследованиях, проведенных на 24-х крысах с экспериментальным холестазом в течение 7 суток, установлено уменьшение содержания нитритов/нитратов в плазме крови. Компоненты желчи обладают нейтрализующей способностью в отношении внутривенно вводимых в организм крыс нитритов.

Ключевые слова: холестаз, нитриты/нитраты.

The experiments on 24 rats with the cholestasis during 7 days showed decreasing of nitrites/nitrates concentration in the blood plasma. The components of bile neutralize nitrites activity in the rat organism after their intravenous introduction.

Key words: cholestasis, nitrites/nitrates.

Введение

Холестаз является распространенной патологией, последствия которого связаны с отсутствием участия желчи в пищеварении, синдромом холемии, а также развитием гепатопульмонального [5, 10, 11, 19], гепаторенального [16], гепатокардиального [9, 15, 17], гепатоцеребрального [4] синдромов.

Однако механизм повреждения различных органов в условиях холестаза изучен недостаточно. На наш взгляд, важное значение в развитии клинических синдромов при данной патологии может играть нарушение гомеостаза оксида азота (NO) и возникновение дисфункции эндотелия. Сведения литературы по этому вопросу противоречивы. Имеются данные как о повышенном образовании NO при участии индуцируемой изоформы NO-синтазы у крыс с холестазом [18], так и о снижении его образования [3, 13], а также о наличии у компонента желчи билирубина свойств, нейтрализующих NO [8, 14], а также ингибирующих его образование свойств у урсодеоксихолиевой кислоты [7, 12].

Целью работы явилось изучение изменений концентрации нитритов и нитратов в плазме крови крыс с экспериментальным холестазом, а также после введения в организм животных нитрита натрия.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 24-х крысах-самках массой 200-220 г: 4 группы по 6 крыс в каждой. Первую группу (контроль - 1) составили ложнооперированные животные, второй группе крыс (контроль - 2) внутривенно вводили нитрит натрия в дозе 30 мг/кг за 5 минут до взятия крови, крысам третьей группы осуществляли моделирование холестаза, четвертая группа животных с холестазом за 5 минут до взятия крови внутривенно получила нитрит натрия в той же дозе.

Холестаз у крыс моделировали за семь дней до взятия крови путем перевязки общего желчного протока в проксимальной части (месте его вхождения в брыжейку 12-перстной кишки) и последующего его пересечения между двумя лигатурами общепринятым методом [2]. Оперативное вмешательство и взятие крови осуществляли в условиях эфирного наркоза. Взятие крови осуществляли с добавлением гепарина из расчета 50 ЕД/мл для предотвращения ее свертывания.

Оценку изменений гомеостаза оксида азота проводили на основании определения продуктов деградации NO (нитритов/нитратов, $[NO_x]$) в плазме крови животных по общепринятому методу с использованием реактива Грисса и кадмия [3].

Также были выполнены эксперименты *in vitro*, в которых изучали $[NO_x]$ в водном растворе нитрита натрия с исходной концентрацией 100 мкМ/л через сутки после добавления в контрольную пробу 1 мл изотонического раствора, в первую опытную пробу 1 мл желчи, забранной у крыс с холестазом из общего желчного протока, а во вторую опытную пробу - 1 мл супернатанта желчи, полученного после добавления к желчи трихлоруксусной кислоты.

Полученные результаты статистически обработаны с помощью критерия Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение

Установлено, что у крыс с холестазом в течение 7 суток (3 группа) $[NO_x]$ в плазме крови уменьшилось по сравнению с контролем I до $66 \pm 4,0$ мМ/л ($99 \pm 5,3$ мМ/л, $p < 0,001$), что указывает либо на наличие у желчи свойств, инактивирующих нитриты и нитраты, либо свойств, инактивирующих образование оксида азота (см. таблицу).

Для подтверждения этого предположения были

выполнены эксперименты с введением в организм крыс с экспериментальным холестазом нитрита натрия.

У ложнооперированных крыс 2-й группы (после в/в введения нитрита натрия), по сравнению с $[NO_x]$ в первой контрольной группе, отмечена тенденция к увеличению $[NO_x]$ в плазме крови ($112 \pm 5,8 \mu\text{M}/\text{л}$, $p > 0,05$).

На фоне холестаза $[NO_x]$ после введения нитрита натрия (группа 4) составила $87 \pm 7,0 \mu\text{M}/\text{л}$, что ниже, чем в группе крыс без холестаза ($p < 0,05$). Это указывает на наличие у компонентов желчи свойств, инактивирующих нитриты.

Таблица. Содержание нитритов/нитратов в плазме крови крыс с холестазом без нитритной нагрузки и после внутривенного введения нитрита натрия (в/в 30 мг/кг).

Группы животных	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Показатели	Контроль – 1	Контроль – 2 (NaNO ₂)	Холестаз	Холестаз + (NaNO ₂)
$[NO_x]$ /мкМ/л	$99 \pm 5,3$	$112 \pm 0,6$	$66 \pm 4,0^{**}$	$87 \pm 7,0^*$

Примечание: * - различие с группой контроль-1 ($p < 0,05$); ** ($p < 0,001$);

Выполненные *in vitro* эксперименты подтвердили выраженный нейтрализующий эффект желчи в отношении нитритов. Добавление желчи к 100 мкМ раствору нитрита натрия препятствовало появлению розовой окраски после внесения реактива Грисса.

Выводы и заключение

Таким образом, полученные результаты, свидетельствующие о снижении $[NO_x]$ в плазме крови крыс с холестазом в экспериментах *in vivo* у крыс, получавших внутривенно NaNO₂, а также в растворе нитрита натрия после добавления желчи *in vitro*, показывают наличие у желчи нейтрализующих NO свойств.

Причинами снижения $[NO_x]$ под влиянием желчи *in vivo* может быть наличие у желчи способности связывать нитриты, инактивировать NO-синтазу, а также активировать окислительные механизмы, ведущие к преобразованию NO в пероксинитрит [1].

Предполагается, что выявленные изменения гомеостаза NO в организме крыс с экспериментальным холестазом могут быть причиной дисфункции эндотелия кровеносных сосудов, ведущие к возникновению множественных клинических синдромов при этой патологии.

Литература

- Бушма М. И., Легонькова Л. Ф., Зверинский И. В. и др. Ингибирование антиоксидантной системы печени крыс при холестазе как один из механизмов нарушения функционирования ферментов биотрансформации ксенобиотиков // Тезисы докладов «Актуальные вопросы гепатологии», Гродно: Беларусь. – 2000. – С. 139.
- Кизюкевич Л. С., Туревский А. А., Шелесная Е. А. К вопросу о моделировании экспериментального холестаза // Тезисы док-

ладов «Актуальные вопросы гепатологии», Гродно: Беларусь. – 2000. – С. 146.

- Baron V., Hernandez J., Noyola M. et al. Nitric oxide and inducible nitric oxide synthase expression are downregulated in acute cholestasis in the rat accompanied by liver ischemia // *Comp. Biochem. C. Toxicol. Pharmacol.* - 2000. - V. 127 (3). - P. 243 - 249.
- Chan C.Y., Huang S.W., Wang T. F. et al. Lack of detrimental effects of nitric oxide inhibition in bile duct-ligated rats with hepatic encephalopathy // *Eur. J. Clin. Invest.* - 2004. - V. 34(2). - P. 122 - 128.
- Fallon M. B., Abrams G.A., Luo B. et al. The role of endothelial nitric oxide synthase in the pathogenesis of a rat model of hepatopulmonary syndrome // *Gastroenterology.* - 1997. - V.113 (2). - P. 682 - 684.
- Granger D. N., Kubes P. Nitric oxide as antiinflammatory agent // *Methods in Enzymology.* - 1996. - V. 269. - P. 434 - 442.
- Joo S. S., Kang H. C., Won T. J., Lee D. I. Ursodeoxycholic acid inhibits pro-inflammatory repertoires, IL-1 beta and nitric oxide in rat microglia // *Arch. Pharm. Res.*- 2003.- V.25 (12).- P. 1067-1073.
- Kaunar H., Hughes M. N., Green C. J. et al. Interaction of bilirubin and biliverdin with reactive nitrogen species // *FEBS Lett.* - 2003. - V. 22; 543. - P. 113 -119.
- Liu H., Ma Z., Lee S. S. Contribution of nitric oxide to the pathogenesis of cirrhotic cardiomyopathy in bile duct-ligated rats // *Gastroenterology.* - 2000. - V. 118 (5). - P. 937 - 944.
- Liu L., Zhang M., Luo B. et al. Biliary cyst fluid from common bile duct-ligated rats stimulates endothelial nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells: a potential role in hepatopulmonary syndrome // *Hepatology.* - 2001. - V. 33(3). - P. 722 - 727.
- Luo B., Abrams G.A., Fallon M. B. Endothelin-1 in the rat bile duct ligation model of hepatopulmonary syndrome: correlation with pulmonary dysfunction // *J. Hepatol.* - 1999. - V. 31(1). - P. 192-193.
- Ma J., Nakajima T., Iwasawa K. et al. Inhibitory effects of ursodeoxycholic acid on the induction of nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells // *Eur. J. Pharmacol.* - 2003. - V. 464 (2-3). - P. 79 - 86.
- Ma Z., Wang X. The changes of serum nitric oxide level in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy // *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* -1998. - V. 33 (3). - P.148-149.
- Mancuso C., Bonsignore A., Di Stasio E. Bilirubin and S-nitrosothiols interaction: evidence for possible role of bilirubin as scavenger of nitric oxide // *Biochem. Pharmacol.* - 2003. - V. 15; 66. - P. 2355 - 2363.
- Nahavandi A., Dehpour A. R., Mani A. R. et al. The role of nitric oxide in bradycardia of rats with obstructive cholestasis // *Eur. J. Pharmacol.* - 2001. - V. 5. - V. 411(1-2). - P.135 - 141.
- Porst M., Hartner A., Krause H. et al. Inducible nitric oxide synthase and glomerular hemodynamics in rats with liver cirrhosis // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* - 2001. - V. 281(2). - P. 293 - 299.
- Utkan Z. N., Utkan T., Sarioglu Y., Gonullu N. N. Effects of experimental obstructive jaundice on contractile responses of dog isolated blood vessels: role of endothelium and duration of bile duct ligation // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* - 2000. - V. 27(5-6). - P. 339 - 344.
- Vazquez_Gil M. J., Mesonero M. J., Flores O., Criado M. Sequential changes in redox status and nitric oxide synthases expression in the liver after bile duct ligation // *Life Sci.* - 2004. - V. 75 (6). - P. 717 - 732.
- Zhang J., Ling Y., Luo B., Tang L. et al. Analysis of pulmonary heme oxygenase-1 and nitric oxide synthase alterations in experimental hepatopulmonary syndrome // *Gastroenterology.* - 2003. - V. 125 (5). - 1441 -1451.

Поступила 21.03.06