

Reheda M. S., Melekh B. Ya., Kachmarska M. O. Metabolites content of stable forms of nitric oxide in the lungs of guinea pigs with experimental allergic alveolitis in different periods of its formation. *Journal of Education, Health and Sport*. 2017;7(4):707-714. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.573919>  
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/4453>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 1223 (26.01.2017).  
1223 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7

© The Author (s) 2017;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland  
Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.  
This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.  
The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.  
Received: 12.04.2017. Revised: 10.04.2017. Accepted: 25.04.2017.

## **METABOLITES CONTENT OF STABLE FORMS OF NITRIC OXIDE IN THE LUNGS OF GUINEA PIGS WITH EXPERIMENTAL ALLERGIC ALVEOLITIS IN DIFFERENT PERIODS OF ITS FORMATION**

**M. S. Reheda, B. Ya. Melekh, M. O. Kachmarska**

**Lviv National Medical University named after Danylo Galitsky**

### **Abstract**

In this paper was found that the conditions for the development of experimental allergic alveolitis on the 44-th day increased the activity of inducible nitric oxide synthase and stable forms of nitric oxide metabolites. These changes were probably related to proinflammatory properties of nitric oxide and the development of adequate immune response. Significant increase of nitric oxide metabolites can be used as a diagnostic method of development of allergic alveolitis by determining the concentration of these metabolites in exhaled air.

**Key words: nitric oxide, L-arginine, NO-synthase, experimental allergic alveolitis.**

**СОДЕРЖАНИЕ СТАБИЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА В ЛЕГКИХ  
МОРСКИХ СВИНОК С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ АЛЛЕРГИЧЕСКИЙ  
АЛЬВЕОЛИТОМ В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ ЕГО ФОРМИРОВАНИЕ**

**М. С. Регада, Б. Я. Мелех, М. О. Качмарска**

**Львовский национальный медицинский университет им. Даниила Галицкого**

**Резюме**

В данной работе установлено, что в условиях развития экспериментального аллергического альвеолита на 44-е сутки возрастает активность индуцибельной синтазы оксида азота и концентрация стабильных метаболитов оксида азота. Данные изменения вероятно связаны с провоспалительными свойствами оксида азота и развитием достаточного иммунологического ответа организма. Значительное повышение метаболитов оксида азота может быть использовано как диагностический метод развития аллергического альвеолита посредством определения концентрации данных метаболитов в выдыхаемом воздухе.

**Ключевые слова:** оксид азота, L-аргинин, NO-синтаза, экспериментальный аллергический альвеолит.

# **ВМІСТ СТАБІЛЬНИХ МЕТАБОЛІТІВ ОКСИДУ АЗОТУ В ЛЕГЕНЯХ МОРСЬКИХ СВИНОК З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ АЛЕРГІЧНИМ АЛЬВЕОЛІТОМ У РІЗНІ ПЕРІОДИ ЙОГО ФОРМУВАННЯ**

**М. С. Регада, Б. Я. Мелех, М. О. Качмарська**

**Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького**

## **Резюме**

В даній роботі встановлено, що за умов розвитку експериментального алергічного альвеоліту на 44-ту добу зростає активність індукцибельної синтази оксиду азоту та концентрація стабільних метаболітів оксиду азоту. Дані зміни імовірно пов'язані з прозапальними властивостями оксиду азоту та розвитком достатньої імунологічної відповіді організму. Значне підвищення метаболітів оксиду азоту може бути використано як діагностичний метод розвитку алергічного альвеоліту за допомогою визначення концентрації даних метаболітів у видихуваному повітрі.

**Ключові слова:** оксид азоту, L-аргінін, NO-синтаза, експериментальний алергічний альвеоліт.

## **Актуальність**

Екзогенний алергічний альвеоліт відноситься до групи захворювань дихальної системи, яка характеризується запальними процесами в термінальних бронхах та альвеолах, пов'язаних з інгаляцією алергенів органічного та неорганічного походження [4, 5].

Через високу варіабельність клінічних проявів даного захворювання на даний час не існує специфічних чітких критеріїв встановлення діагнозу. Тому встановлення правильного і точного діагнозу є у більшості випадках запізніле, що призводить до високого рівня інвалідності пацієнтів [10].

Діагностика екзогенного алергічного альвеоліту часто базується на рентгенологічних даних, які проявляються видимими лише на пізніх етапах. Тому останнім часом все більше і більше дослідників намагаються розширити діагностичний

набір для своєчасного виявлення патологічних змін вже на ранніх етапах розвитку хвороби [8, 11, 12].

Одним з цікавих методів дослідження є визначення рівня оксиду азоту (NO) у повітрі, яке видихає пацієнт. Істотні зміни рівня NO були виявленні у пацієнтів з хронічним обструктивним захворюванням легень (ХОЗЛ), бронхіальною астмою (БА).

Відомо, що у пацієнтів з бронхіальною астмою було виявлено значне підвищення концентрації NO у видихуваному повітрі. Дані зміни виникали внаслідок активації індукцйбельної синтази оксиду азоту (iNOS) внаслідок впливу прозапальних цитокінів, таких як інтерлейкін 4 (IL-4). Також був встановлений корелятивний зв'язок між рівнем NO у видихуваному повітрі з ступенем фіброзу легень у пацієнтів з ХОЗЛ [6, 15, 16, 17, 20].

З іншого боку відомо, що за умов оксидативного стресу та виснаження антиоксидантної системи при посиленій продукції NO відбувається зростання перебігів пероксидного окиснення ліпідів за рахунок утворення токсичної сполуки пероксинітриду через взаємодію NO з супероксидним радикалом [2, 3, 18, 19, 20].

У доступній нам літературі відсутні дані, які стосуються вивчення процесів метаболізму NO у пацієнтів з екзогенним алергічним альвеолітом.

**Мета дослідження:** оцінити стан системи оксиду азоту у гомогенаті легень морських свинок з експериментальним алергічним альвеолітом у різні періоди його формування.

#### **Матеріали та методи дослідження**

Експериментальні дослідження були проведені на 45-ох морських свинках самцях середньою масою тіла 280-320 г. Контрольна група складалася з 15-ти інтактних самців. Першу дослідну групу становили 15 тварин з експериментальним алергічним альвеолітом (ЕАА), які були виведені з експерименту на 34-ту добу від початку дослідження. Друга дослідна група містила 15 тварин з ЕАА, які були виведені з експерименту на 44-ту добу від початку дослідження. Усіх експериментальних тварин утримували в стандартних умовах віварію Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Експериментальний ЕАА відтворювався за методом О. О. Орехова, Ю. А. Кирилова [7]. Попередньо тварин імунізували повним ад'ювантом Фрейнда (0,2 мл у задню лапку

внутрішньом'язово). Через 2 тижні після імунізації тваринам кожні 10 днів вводили внутрішньовенно по 0,2 мл 1%-го розчину бацили Кальмета-Жерена (БЦЖ). Експериментальні тварини виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом та визначали біохімічні показники відносно встановлених методик у гомогенаті легень.

Вміст стабільних метаболітів оксиду азоту визначали на підставі кольорової реакції з реактивом Гріса [18], активність iNOS та cNOS – за методом В.В. Сумбаєва [9], концентрацію L-аргініну (L-Arg) – за методом Т. М. Алейнікова [1].

Статистичну обробку даних проводили з використанням програми Statistica 6.0.

### Результати дослідження та їх обговорення

Проведені експериментальні дослідження виявили зміни метаболізму оксиду азоту за умов розвитку ЕАА. Отримані дані в ході експерименту представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Зміни в системі оксиду азоту в гомогенаті легень морських свинок з ЕАА у різні періоди його формування

Група	Показник	Стабільні метаболіти NO мкмоль/г	iNOS нмольНАДФН/ (в*мг)	cNOS нмольНАД ФН/(хв*мг)	L-Arg мкг/мл
Контрольна група (інтактна група тварин), (n=15)		0,03±0,007	0,11±0,003	0,23±0,008	0,07±0,005
Перша дослідна група, 34 доба (n=15)		0,04±0,002	0,13±0,009	0,25±0,01	0,06±0,004
Друга дослідна група, 44 доба (n=15)		0,09±0,003*	0,18±0,006*	0,24±0,006	0,02±0,009*

Примітка:

\*-  $p < 0,05$  у порівнянні з контрольною групою тварин

Представлені дані показують достовірне зростання концентрації стабільних метаболітів оксиду азоту у другій дослідній групі у порівнянні з контрольною групою на 200,0% ( $p < 0,05$ ). Також наявне достовірне зростання активності iNOS спостерігалось у

другій дослідній групі у порівнянні з контрольною групою на 63,6% ( $p < 0,05$ ). Дані зміни вказують на активацію системи оксиду азоту за умов розвитку експериментального алергічного альвеоліту в легеневій тканині. Відомо, що активація системи оксиду азоту часто супроводжується стимуляцією процесів ліпопероксидації та синтезом нітрит-аніону і є проявом ендотеліальної дисфункції [13]. З іншого боку активація системи оксиду азоту імовірно зумовлена імунологічною відповіддю організму за умов розвитку експериментального алергічного альвеоліту [14].

Достовірне зниження концентрації L-Arg, як донатора оксиду азоту, на 71,4% ( $p < 0,05$ ) спостерігалось лише на 44-ту добу у порівнянні з контрольною групою, дані зміни пов'язані з підвищенням активності iNOS.

Достовірної різниці в активностях sNOS у дослідних групах у порівнянні з контрольною групою не було встановлено.

### **Висновок**

Результати даного дослідження вказують на важливу роль системи оксиду азоту в патогенезі розвитку експериментального алергічного альвеоліту. Значне підвищення концентрації метаболітів оксиду азоту та активності iNOS на 44-ту добу імовірно пов'язане з прозапальними властивостями оксиду азоту та розвитком достатньої імунологічної відповіді організму. Значне підвищення метаболітів оксиду азоту може бути використано як діагностичний метод розвитку алергічного альвеоліту за допомогою визначення концентрації даних метаболітів у видихуваному повітрі.

### **Reference (Ukrainian Russian)**

1. Aleynikova TL. Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po biohimii [Guide to practical exercises in biochemistry]. *Meditcina*, 2000; 128. (in Russian)

2. Bezrukov LO, Koloskova OK, Vorotnyak TM. Vmist oksidu azotu v kondensati vidihualnogo povitrya u ditey z tyazhkoyu bronhialnoyu astmoyu zalezno vid mistysya meshkannya [Nitrogen oxides in the condensate of exhaled air in children with severe asthma depending on habitat]. *Odeskiy medichniy zhurnal*, 2009; 3:28–29. (in Ukrainian)

3. Zabolotniy DI, Derev'yanko MI. Oksid azotu v rozvitku i progresuvanni alergichnogo rinitu [Nitric oxide in the development and progression of allergic rhinitis]. *Rinologiya*, 2010; 3:55–66. (in Ukrainian)

4. Krushevskiy VD. Hronichni obstruktyvni zahvoryuvannya legen, tyutyunopalinnya i endogennyi oksid azotu [Obstruktyvni chronic lung disease, smoking and endogenous nitric oxide]. *Medichni perspektivi*, 2007; 12; 3:33–37. (in Ukrainian)
5. Ilkovich MM, Novikova LN. Ekzogennyiy allergicheskyy alveolit [Exogenous allergic alveolitis]. *Interstitsialnyie zabolevaniya legkih. Pod red. M. M. Ilkovicha, A. N. Kokosova*, 2005; 183–211. (in Russian)
6. Menschikova EB, Zenkov NK, Reutov, VP. Oksid azota i NO-sintazyi v organizme mlekopitayuschih pri razlichnyih funktsionalnyih sostoyaniyah [Nitric oxide and NO-synthase in mammals at different functional states]. *Biohimiya*, 2000; 65; 4:485–503. (in Russian)
7. Orehov OO, Kirilov YuA. Patomorfologiya legkih i mikrotsirkulyatornogo rusla malogo kruga krovo- obrascheniya pri hronicheskom eksperimentalnom allergicheskom alveoli [Pathomorphology of the lungs and microcirculatory bed of a small circle of circulation in a chronic experimental allergic alveolitis]. *Arhiv patologii*, 1985; 10:54–61. (in Russian)
8. Regeda MS, Gritsko RYu, Gayduchok IG. Ekzogennyiy alergicheskyy alveolit: monografiya [Exogenous allergic alveolitis: monograph]. *2-ge vidannya, dopovnene i pereroblene*, 2007; 200. (in Ukrainian)
9. Sumbaev VV, Yasinskaya IM. Vliyanie DDT na aktivnost sintazyi oksida azota v pecheni, legkih i golovnom mozge kryis [The effect of DDT on the activity of nitric oxide synthase in the liver, lungs and brain of rats]. *Sovremennyye problemy toksikologii*, 2000; 3: 3–7. (in Russian)
10. Fomenko IS, Sklyarov PO, Panasyuk NB. ZmIny aktivnosti NO-sintazy ta arginazy u slizoviy obolontsi товstoyi kishki pri blokuvanni prozapalnih enzymiv za umov eksperimentalnogo kolitu [Changes in the activity of NO-synthase and arginase in the mucosa of the colon blocking inflammatory enzymes under the experimental colitis]. *Tavrisheskiy Mediko-Biologicheskyy Vestnik*, 2012; 15(3): 361–363. (in Ukrainian)
11. Ashutosh K. Nitric oxide and asthma: a review. *Curr. Opin. Pulm. Med*, 2000; 6; 1:21–25 (in English)
12. Berlyne G, Barnes N. No role for NO in asthma? *Lancet*, 2000; 355: 1029–1030. (in English)
13. Fernandez N, Jancar S, Crespo MS. Blood and endothelium in immune complex-mediated tissue injury. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 2004; 10: 512–517. (in English)

14. Ferreira HH, Bevilacqua E, Gagiotti SM. Nitric oxide modulates eosinophil infiltration in antigeninduced airway inflammation in rats. *Eur. J. Pharmacol*, 1998; 358: 253–259. (in English)
15. Folkerts G, Nijkamp FP. Airway epithelium: more than just a barrier! *Trends Pharmacol. Sci*, 1998; 19: 180. (in English)
16. Janson L, Wiklund L. Nitric oxide, nitrogen metabolism and inflammatory respiratory disease. An hypothesis. *Ups. J. Med. Sci*, 1997; 102: 21–33. (in English)
17. Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *J. Biosci. Rep*, 1999; 19; 3:133–154. (in English)
18. Shirai T, Ikeda M, Morita S. Elevated alveolar nitric oxide concentration after environmental challenge in hypersensitivity pneumonitis. *Respirology*, 2010; 15: 721–722. (in English)
19. Tan X, Sun WD, Li JC. L-arginine prevents reduced expression of endothelial nitric oxide synthase (NOS) in pulmonary arterioles of broilers exposed to cool temperatures. *Vet. J*, 2007; 173; 1: 151–157. (in English)
20. Zhu GF, Sun B, Niu SF. Combined surfactant therapy and inhaled nitric oxide in rabbits with oleic acid-induced acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1998; 158; 2: 437–443. (in English)