

DOI: 10.18499/2225-7357-2019-8-1-68-76

УДК 616.37-002.001.6:616.45-001/.3

ОЗ.ОЗ.О4 – клеточная биология, цитология, гистология

© Коллектив авторов, 2019

Окислительный стресс и образование NO при церулеин-индуцированном панкреатите у крыс

К. Тиманн¹, Ю. Шнекенбургер², В. Шик², У. Демус³, У. Мюллер-Вердан⁴,
Д. А. Атякшин⁵, В. Бекер¹, В. Е. Самойлова¹, И. Б. Бухвалов^{1*}

¹Институт гематопатологии Гамбурга, г. Гамбург, Германия

²Центр биомедицинских технологий Университетской клиники Мюнстера,
г. Мюнстер, Германия

³Биоэкологический центр, г. Галле, Германия

⁴Университетская клиника Шарите, г. Берлин, Германия

⁵ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»
Минздрава России, г. Воронеж, Россия

Взаимодействие оксида азота (NO) и супероксидных радикалов является важным механизмом развития панкреатита. В предыдущих исследованиях мы показали роль окислительного стресса и NO синтазы (NOS) в развитии хронического панкреатита человека на модели у крыс с перевязкой протока поджелудочной железы. Выявлено, что развитие окислительного стресса предшествует активации NOS. Это позволяет интерпретировать усиление продукции NO в ходе панкреатита в качестве адаптационного механизма, направленного на поддержание определенного уровня биологически активного NO в клетке. В статье представлены данные о состоянии NOS и маркеров окислительного стресса (нитротирозина и 8-гидроксигуанозина) при остром панкреатите у крыс, вызванном церулеином. Нами показано, что особенности взаимодействия супероксидных радикалов/NO в данной модели острого панкреатита аналогичны тем, которые наблюдаются при перевязке панкреатического протока, а также при хроническом панкреатите у человека. Таким образом, индуцированный церулеином панкреатит аналогичен последствиям воспаления поджелудочной железы при перевязке ее протока и является удобной моделью для дальнейших исследований патогенеза данного заболевания у человека.

Ключевые слова: острый панкреатит, оксид азота, NO синтаза, оксидативный стресс.

Oxidative Stress and NO Generation in Cerulein-Induced Acute Pancreatitis in Rats

© K. Tiemann¹, J. Schnekenburger², V. Schick², U. Demus³, U. Müller-Werdan⁴, D.A. Atiakshin⁵, W. Boecker¹,
V. E. Samoilova¹, I. B. Buchwalow^{1*}

¹Institute for Hematopathology, Hamburg, Germany

²Biomedical Technology Center, University Hospital Muenster, Muenster, Germany

³Department of Medicine B, University Clinic, Muenster, Germany

⁴Bio- and Ecology Center, Halle/Saale, Germany

⁵Charité-Clinic, University Berlin, and Geriatrics Centre, Berlin, Germany

⁶Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia

The interaction between nitric oxide (NO) and superoxides is critical in the development of pancreatitis. Previously, we reported on the up-regulation of oxidative stress and NO-synthase (NOS) in the human chronic pancreatitis and in an animal model of pancreatitis induced by pancreatic duct ligation (PDL) in rats. We have shown that oxidative stress runs ahead of NOS up-regulation, which implies that the NO enhancement in the course of pancreatitis is likely to be an adaptive mechanism aimed at maintaining the homeostatic cellular level of the bioactive NO. Here, we report on the expression of NOS and oxidative stress markers (nitrotyrosine and 8-hydroxyguanosine) in the course of cerulein-induced acute pancreatitis in rats. We found that the pattern of superoxides/NO interaction in this model of acute pancreatitis is similar to that in the PDL-induced rat pancreatitis and in the human chronic pancreatitis. It means that cerulein-induced acute pancreatitis like the PDL-induced pancreatitis is a proper model for further studies of pancreatitis development in humans.

Key words: acute pancreatitis, nitric oxide, NO synthase, oxidative stress

*Автор для переписки:

Бухвалов Игорь Борисович
Институт гематопатологии Гамбурга, Фангдиэкштрассе, 75А, Гамбург, 22547, Германия.

E-mail: buchwalow@pathologie-hh.de

*Corresponding author:

Igor' Bukhvalov

Institute for Hematopathology, Fangdieckstrasse 75A, Hamburg, 22547, Germany

E-mail: buchwalow@pathologie-hh.de

Введение

В течение последних 20 лет убедительно показано значение окислительного стресса в развитии воспаления поджелудочной железы. Окислительный стресс приводит к увеличению уровня супероксидных радикалов, в том числе активных форм кислорода [34]. Взаимодействие между супероксидными радикалами и NO играет одну из ключевых ролей в развитии панкреатита [2], в результате чего развивается дефицит биологически активного внутриклеточного NO [26]. В предыдущих исследованиях мы показали, что окислительный стресс предшествует активации NOS при развитии воспаления поджелудочной железы [6, 7]. Это позволяет считать усиление продукции NO при остром панкреатите в качестве адаптационного механизма, направленного на поддержание баланса его внутриклеточного содержания в биологически активной форме.

Несмотря на то, что негативное влияние супероксидных радикалов при остром панкреатите хорошо известно, экспериментальные данные моделей острого панкреатита являются все еще недостаточными, характеризуются неоднозначными результатами и видоспецифичностью [15]. Очевидные противоречия и недопонимания в этой области требуют пересмотра уже известных знаний о локализации NOS при панкреатите с применением современных технологий иммунной гистохимии и использованием высокочувствительной методологии тирамидной амплификации сигнала. Данная технология была использована в исследовании для изучения динамических изменений образования NOS и показателей оксидативного стресса – нитротирозина и 8-гидроксигуанозина (8OHG).

Материал и методы исследования

Исследование соответствует положениям Руководства по уходу и использованию лабораторных животных, опубликованному Национальным институтом здравоохранения США (публикация Национального Института Здоровья США № 85-23, пересмотренная в 1996 году) и выполнено в соответствии с инструкцией комитета по содержанию и использованию животных Университета Мюнстера.

Исследование выполнено на самцах крыс Вистар массой 280–300 г., которых содержали в условиях фиксированной темпера-

туры и влажности с соблюдением суточных циркадианных ритмов. Крысам проводили анестезию препаратом пентобарбитал в дозе 30 мг/кг. Через яремную вену животным вводили церулеина в дозе (10 мкг/кг/час) в течение 48 часов. В качестве контроля использовали животных, которым вводили физиологический раствор [31, 36]. Поджелудочную железу извлекали, отделяли от жировой ткани и фиксировали в забуференном растворе 4% формальдегида с последующей заливкой в парафин. Часть фрагментов поджелудочной железы замораживали в жидком азоте при температуре -80°C для последующего анализа белка. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм, фиксированные на предметных стеклах с адгезивным покрытием (MenzelGläser, Braunschweig, Germany), депарафинировали ксилолом и батереей спиртов. Демаскирование антигенов проводили с помощью нагревания срезов в цитратном буфере (pH 6.0) при температуре 95°C в течение 30 мин. Затем срезы обводили гидрофобным карандашом (Dianova, Гамбург, Германия) и ополаскивали в фосфатном буфере. Для промывания и достижения требуемого разведения антител использовался стандартный раствор фосфатного буфера.

Иммунное окрашивание биоматериала проводили в соответствии со стандартными протоколами [8]. Поскольку ранее мы продемонстрировали отсутствие способности эндогенных Fc-рецепторов связывать Fc-фрагменты антител в стандартно фиксированных клетках и образцах тканей [5], то из протокола исключался этап их блокирования до инкубации с первичными антителами.

После извлечения антигена срезы инкубировали с первичными антителами в течение ночи при температуре 4°C . Характеристика первичных поликлональных кроличьих антител для селективного выявления NOS1, NOS2 и NOS3 (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA), включая Вестерн-блоттинг, была подробно представлена в ранее проведенном исследовании [11].

Первичные антитела к NOS использовали в концентрации 0.2–0.5 мкг/мл. Козья антисыворотка к 8-гидроксигуанозину (маркеру окислительного повреждения нуклеиновых кислот) была получена от Serotec Ltd (Оксфорд, Великобритания) и использовалась в разведении 1:200. Для блокирования эндогенной пероксидазы после иммунной реакции с первичными антителами и промывки в фосфатном буфере срезы обрабатывали в течение 10 мин в метаноле с 0.6% H_2O_2 .

Для светлопольной микроскопии первичные антитела визуализировали с помощью системы амплификации AmpliStain™ HRP (SDT GmbH, Baesweiler, Германия) [7] и конъюгированного с биотином тирамина в сочетании с комплексом HRP–авидин–биотин

(Vectastain "Elite" ABC-kit, Vector Laboratories, США).

Биотин-тираминовый конъюгат был синтезирован из гидрохлорида тирамина (Sigma, T2879) и биотин-сукцинимидилового эфира (BIO-NHS, Pierce, Rockford, IL, 12062-22-0) в DMF [8]. Инкубация с биотин-тираминовым конъюгатом (разведение 1:1000 в PBS вместе с 0.02% H_2O_2) составляла 3–8 мин.

Таким образом, детекция биотиновой метки проводилась с помощью авидин-биотинной системы с пероксидазой хрена (HRP) (Vectastain «Elite»; ABC-kit, Vector Laboratories, USA). Для визуализации метки, конъюгированной с HRP, образцы обрабатывали раствором диаминобензидина в течение 5–10 минут, а затем окрашивали гематоксилином Эрлиха. Метод тирамидного усиления позволяет увеличить степень амплификации сигнала до 100 раз по сравнению с традиционным протоколом. Для флуоресцентной визуализации кожных первичных антител к 8OHG использовали вторичные антитела, конъюгированные с FITC (Dianova, Гамбург, Германия). В завершение протокола срезы окрашивали в течение 15 с DAPI (5 мкг/мл PBS; Sigma) и заключали в среду VectaShield (Vector Laboratories, США).

Средствами контроля являлась инкубация без первичных антител или замена первичных антител соответствующими IgG в той же конечной концентрации, что и у первичных антител.

Иммуноокрашенные срезы исследовали на микроскопе Zeiss Axioskop, оборудованном соответствующими фильтрами и цифровой камерой AxioCam (Carl Zeiss Vision GmbH, Германия). Микроскопия и обработка изображений подробно изложена в монографии [8]. Показанные изображения являются репрезентативными по крайней мере для 3 независимых экспериментов, которые предоставили аналогичные результаты.

Образцы поджелудочной железы гомогенизировали в модифицированном RIPA-буфере (50 мМ Трис-HCl, pH 7.4, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 0.25% Na-дезоксихолат), комплексе ингибитора протеазы (Roche, Mannheim, Germany) и выдерживали в течение 20 мин на льду. После 15 мин центрифугирования (20000 g, 4°C) концентрацию белка в супернатанте определяли с использованием BCA-kit (Pierce, Rockford, USA). Для лучшего разделения белковые лизаты были очищены с использованием набора для очистки (GE Healthcare, Amersham, Freiburg, Germany). Белки (50 мкг) были разделены на 6% акриламидном геле и перенесены в течение ночи при 30 В на мембраны PVDF (trans-blot cell apparatus, Biorad, München, Germany). Перенос на мембраны проверяли окрашиванием прочным зеленым. После обесцвечивания

блоты блокировали в течение 1 ч в 5% обезжиренном молоке (растворяется в TBS с 0.1% Tween 20). Первичные антитела разводили в блокирующем растворе (NOS1 1: 500, NOS3 1: 250 (Transduction Laboratories) и инкубировали на блотах в течение ночи при 40°C.

Положительный контроль проводился для NOS1 лизата головного мозга крысы, для NOS3 лизата эндотелиальных клеток человека (Transduction Laboratories). Сигналы меток обнаруживались с помощью хемилюминесценции при использовании системы ECLplus (GE Healthcare, Amersham, Freiburg, Germany). Сравнение содержания белка в образцах образцов было доказано путем определения экспрессии GAPDH.

Результаты и их обсуждение

Экспериментальная модель

Крысам в течение 48 ч вводили аналог холецистокинина – церулеин. Как и ожидалось, развитие панкреатита с течением времени приводило к постепенному увеличению масштаба патологических изменений [31]. Для подтверждения того, что у крыс экспериментальной группы развился панкреатит, использовался комплекс критериев: макроскопические признаки, увеличение соотношения веса органа к сухой массе, результаты патоморфологического исследования, трансформация ацинарных клеток с приобретением морфологических признаков клеток протоков, интерстициальный отек, инфильтрация клетками воспаления, вакуолизация ацинарных клеток и повышенная активность амилазы в сыворотке [23, 32, 33, 6, 7].

Восстановление поджелудочной железы завершалось по истечении 48 часов. Панкреатит, вызванный церулеином, обладал сходными патофизиологическими признаками по сравнению с острым панкреатитом человека и проявлялся дисрегуляцией пищеварительных ферментов и вакуолизацией цитоплазмы, гибелью ацинарных клеток, образованием отека и инфильтрацией клетками воспалительного ответа ткани поджелудочной железы [20, 21].

Экспрессия NOS при панкреатите

Ранее сообщалось, что, в отличие от общепринятого представления, все три изоформы NOS экспрессируются не только в островках Лангерганса [13, 1, 22, 38], но также и в экзокринной части, и в сосудистой сети. При панкреатите экспрессия NOS увеличивалась, особенно в экзокринной части [6, 7], что свидетельствовало о ее большей уязвимости. В процессе развития панкреатита у крыс, вызванного перевязкой протоков поджелудочной железы [6], динамические изменения в экспрессии всех изоформ NOS (NOS1, NOS2 и NOS3) протекали параллельно.

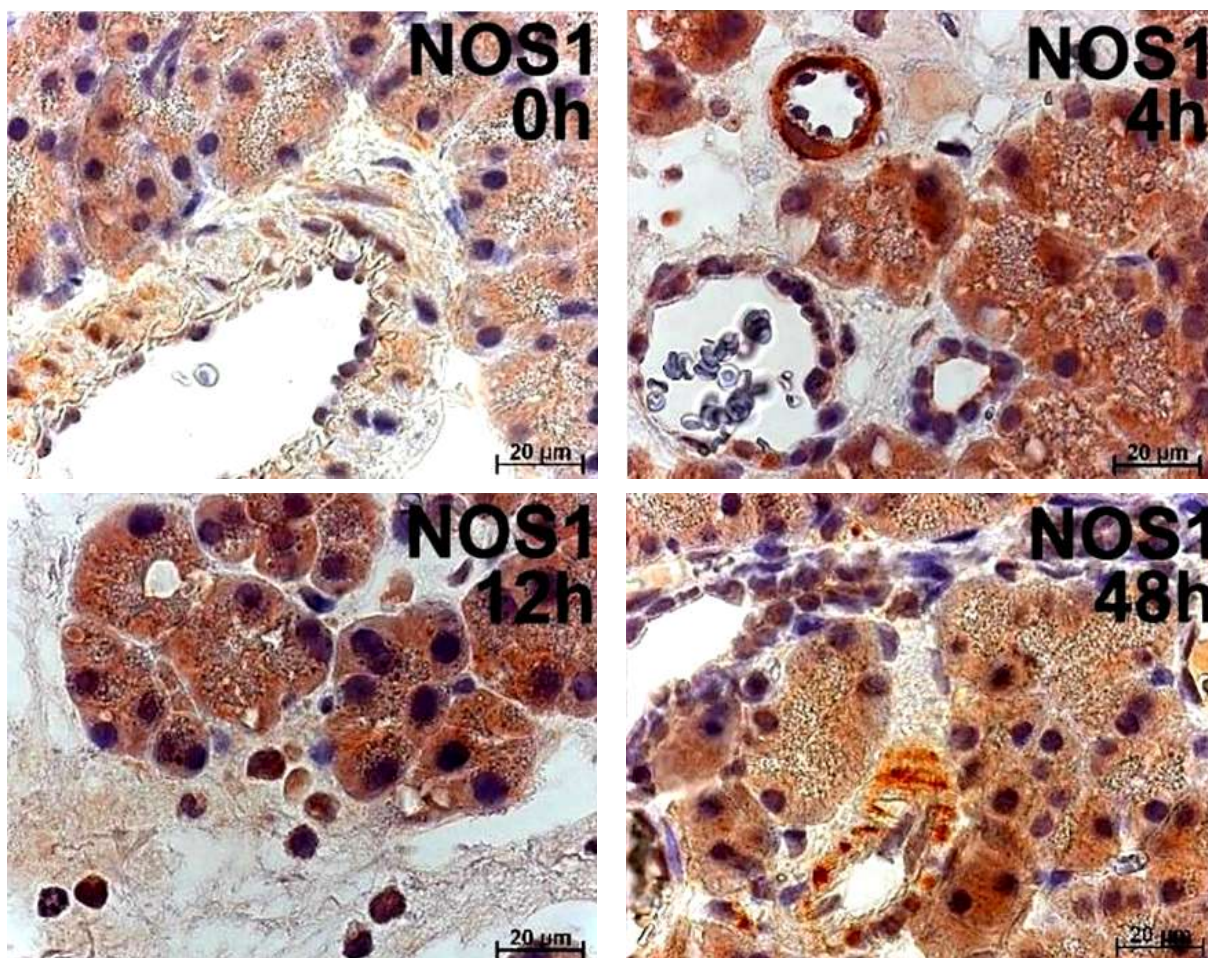


Рис. 1. Динамика экспрессии синтазы оксида азота в поджелудочной железе крыс при церулеин-индуцированном панкреатите.

Сходная динамика экспрессии NOS была зарегистрирована и в церулеин-индуцированном панкреатите у крыс (рис. 1). Время проявления острого панкреатита в данном исследовании повлияло на степень выраженности иммуноокрашивания NOS в клетках экзокринного компартмента поджелудочной железы, которая постепенно увеличивалась и достигала наибольших значений к 4 и 12 ч, особенно в ацинусах и инфильтрирующих клетках в области воспаления. Восстановление поджелудочной железы практически завершалось через 48 ч, когда экспрессия трех изоформ NOS приближалась к нормальному уровню.

Из-за довольно высокого положительного базального уровня иммуноокрашивания NOS в островках Лангерганса поджелудочной железы в норме не удалось зарегистрировать существенного усиления ее экспрессии при панкреатите. Наблюдалось резкое увеличение доли клеток с положительно иммуноокрашенными ядрами в экзокринном компоненте поджелудочной железы при развитии панкреатита (рис. 1). В предыдущих исследованиях сообщалось о ядерной локализации NOS в кардиомиоцитах новорожденных крыс [12] и в

мышечных волокнах пациентов с мышечной дистрофией Дюшенна [10].

Скорее всего, локализацию NOS можно обнаружить в ядрах и других типов клеток как в физиологических, так и при патологических состояниях [18]. Ядерная локализация NOS и перенос изоформ NOS в ядра может обеспечить более подходящую субклеточную среду, чем цитозоль, для эффективного действия систем NOS и непосредственного молекулярно-биологического контроля состояния внутриядерных структур. Гладкие миоциты в стенке сосудистого русла обладают более высоким уровнем экспрессии NOS1, в то время как эндотелий крупных кровеносных сосудов характеризуется положительной иммунореакцией NOS3, как и было уже показано ранее в поджелудочной железе человека [11].

Согласно другим критериям, описанным в литературе, мышечная оболочка кровеносных сосудов обладает различными физиологическими характеристиками и селективно реагирует на используемые миорелаксанты, такие как ацетилхолин, независимо от состояния эндотелия [9]. Из-за достаточно высокого положительного базального уровня иммуноокрашивания NOS1 в структурах кро-

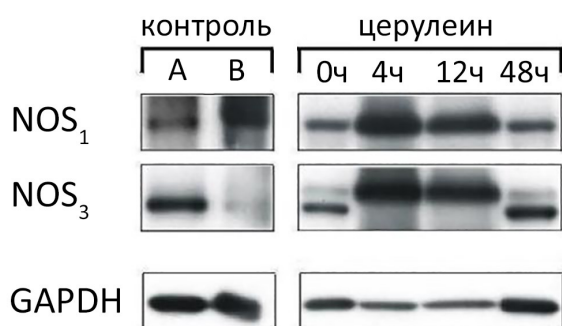


Рис. 2. Динамика экспрессии синтазы оксида азота при церулеин-индуцированном панкреатите крыс по данным Вестерн блоттинга.

веносных сосудов мы не смогли выявить в них при панкреатите какое-либо существенное увеличение содержания NOS.

Появление экспрессии NOS при церулеин-индуцированном панкреатите у крыс было подтверждено методом Вестерн-блоттинга (рис. 2) с применением антител к NOS1 и NOS3, показавшего наличие характерных иммунореактивных белковых полос для NOS1 (155 кДа) и NOS3 (140 кДа).

Выявление белков синтазы оксида азота в поджелудочной железе с помощью Вестерн-блоттинга в течение 48 часов показало увеличение их уровня к 4 и 12 часам наблюдения, что согласуется с данными об усилении образования NO ацинарными клетками в ответ на церулеиновую гиперстимуляцию [3]. Двойные полосы для NOS3 с выраженным сдвигом молекулярной массы к более высокому молекулярному весу были обнаружены через 4 и 12 ч наблюдения. Также ранее была обнаружена двойная белковая полоса для NOS3 при Вестерн-блоттинге биоматериала кровеносных сосудов [11]. Сдвиг молекулярной массы NOS3 во время острого панкреатита можно объяснить повышенным фосфорилированием белка. Известно, что фосфорилирование NOS3 в нескольких сайтах необходимо для активации процессов синтеза оксида азота [17].

Схема экспрессии маркеров окислительного стресса при остром панкреатите – нитротирозина и 8OHG

Нитротирозин, образующийся в результате пероксинитрит-опосредованного нитрования тирозина, является показателем окислительного повреждения белка [4, 30], тогда как 8OHG является биомаркером окислительного повреждения оснований ДНК [14]. При панкреатите, вызванном церулеином, проявление обоих маркеров окислительного стресса (нитротирозина и 8OHG) достигало своей высшей точки уже через 30 мин, сохранялось до 4 ч и заметно снижалось к 12 ч (рис. 3), тогда как пик проявления NOS был зарегистрирован через 4 и 12 ч.

В отличие от положительного иммуноокрашивания нитротирозина в экзокринных

клетках при панкреатите, в сосудистом русле не было обнаружено его заметного увеличения, что наблюдалось также у пациентов с хроническим течением заболевания [7]. Панкреатические островки обладали значительной иммунореактивностью к антинитротирозиновым антителам, как и в нормальной поджелудочной железе, что было продемонстрировано ранее [28].

Выраженная экспрессия нитротирозина свидетельствует о том, что нитрование может являться важным физиологическим путем метаболизма оксида азота, а не просто признаком окислительного стресса.

8OHG как маркер окислительного повреждения оснований ДНК является производным гуанозина – модифицированного основания, которое встречается в ДНК в результате окислительного стресса [14]. По данным производителя, козья антисыворотка к 8OHG реагирует перекрестно также с 8-оксо-2'-дезоксигуанозином (8OHdG), что было доказано нами с помощью контроля преабсорбции с 10-кратным молярным избытком соответствующих субстратов.

Рис. 4 демонстрирует резкое увеличение иммуноокрашивания 8OHG при индуцировании острого панкреатита, которое сохраняется на одном уровне до 4 часов. После 48-часового восстановительного периода показатели 8OHG в поджелудочной железе возвращаются к норме. Усиление иммуноокрашивания на 8OHG при панкреатите наблюдалось как в цитоплазме, так и в ядрах экзокринных клеток поджелудочной железы. Окрашивание цитоплазмы свидетельствует о выраженном окислительном повреждении цитоплазматических нуклеиновых кислот.

Наши результаты показывают, что окислительные модификации белков и повреждения ДНК являются очень ранними в первые 30 минут развития церулеин-индуцированного панкреатита. Как утверждает Reinhecke et al [29], это свидетельствует о том, что окислению белка предшествуют образование малонового диальдегида, продукта перекисного окисления липидов, а также развитие отека и увеличение содержания амилазы в сыворотке крови. Это означает, что биологическое значение окислительного стресса можно рассматривать как способ повышения NOS при панкреатите, в то время как увеличение уровня оксида азота является вторичным. Таким образом, в данном случае мы наблюдаем адаптивный механизм, направленный на поддержание уровня биологически активного оксида азота в клетке.

NO при панкреатите: взаимодействие NO и супероксидных радикалов

Граница между биологией и патофизиологией передачи сигналов NO является весьма тонкой и определена балансом между скоро-

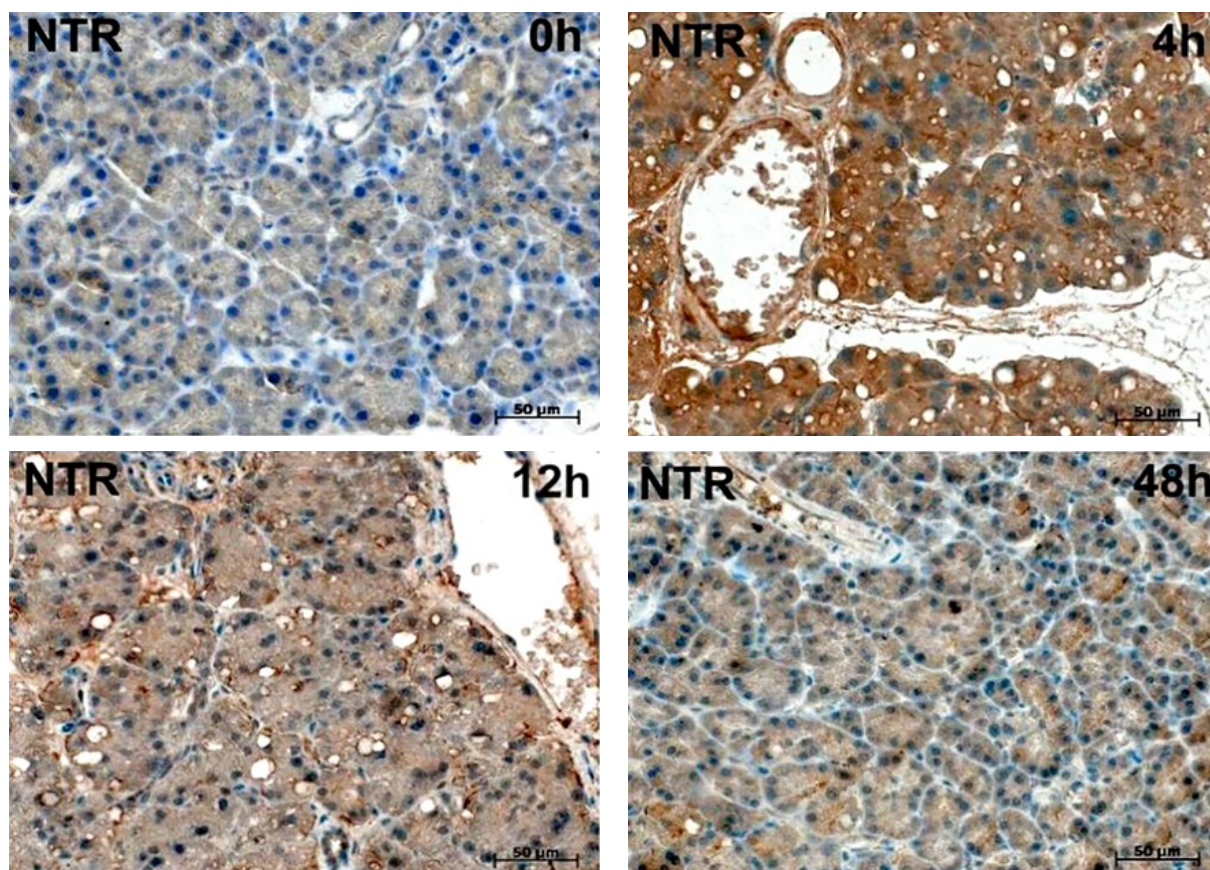


Рис. 3. Экспрессия маркеров оксидативного стресса – нитротирозина и 8-оксогуанина при развитии церулеин-индуцированного панкреатита. Максимальный уровень наблюдается к 4 часам эксперимента, существенное снижение – к 12 и 48 часам.

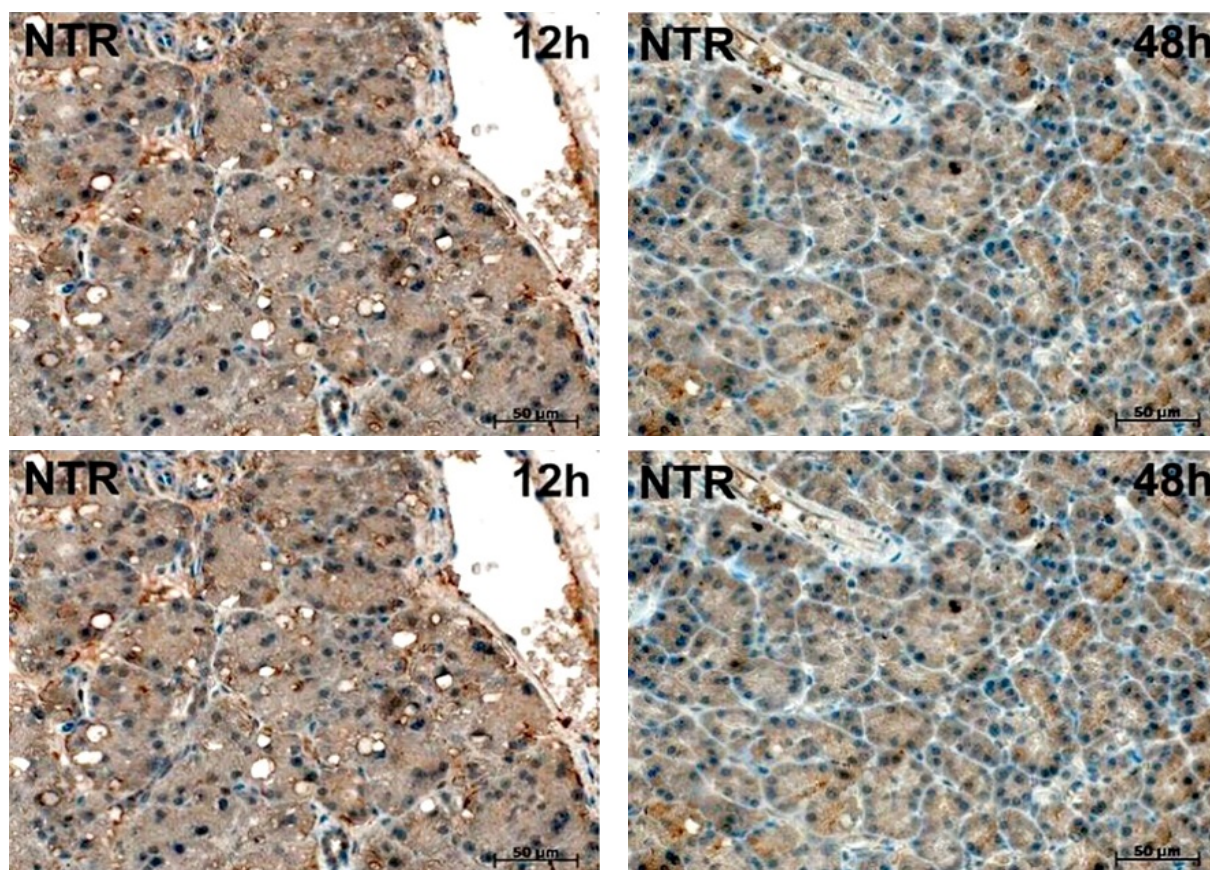


Рис. 4. Экспрессия 8-оксогуанина (8ОГН) в поджелудочной железе крыс при развитии панкреатита после введения церулеина. Отмечается существенное возрастание экспрессии 8ОГН к 30 минутам эксперимента и 4 часам наблюдения.



Рис. 5. Факторы, влияющие на биоактивность и содержание NO в поджелудочной железе.

стью образования супероксидных радикалов и способностью организма поддерживать определенный уровень биологически активного NO в клетке (рис. 5).

В связи с тем, что супероксидные радикалы, известные как утилизаторы оксида азота, снижают его обычный физиологический уровень, тем самым уменьшая биоактивность и биодоступность NO, использование антиоксидантов для подавления свободнорадикальных реакций привлекли внимание ряда исследователей.

Антиоксидантная терапия может облегчить симптомы или предотвратить развитие панкреатита. Тем не менее, уровни дозировки и продолжительности антиоксидантной терапии должны быть тщательно определены, поскольку хроническое введение высоких доз антиоксидантов может иметь негативные последствия [38].

Начало антиоксидантной терапии так же является важным. Некоторые исследования смогли продемонстрировать положительное влияние антиоксидантов на такие показатели, как выживаемость, отек, уровень амилазы, макроскопические или гистологические изменения в том случае, если их применяли до развития экспериментального панкреатита [16, 27]. В то же время попытки лечения экспериментальных животных различными схемами антиоксидантной терапии после развития панкреатита не являлись успешными [29].

Различия в показателях успешности применения антиоксидантов в зависимости от их введения в начале экспериментального панкреатита или во время его прогрессирования можно объяснить тем, что окислительный стресс и окислительные модификации белков

и ДНК являются весьма ранними событиями в начальном периоде панкреатита, вызванного церулеином. Различия также могут объясняться сложным, а иногда даже парадоксальным взаимодействием между NO и супероксидными радикалами. При воспалительных заболеваниях, таких как панкреатит, супероксидные радикалы активируют и другие ферменты, участвующие в L-аргинин–NO–cGMP-сигналинге, включая циклические нуклеотид-фосфодиэстеразы (PDE) [19] и аргиназу [35].

NO активирует sGC [24], а последняя преобразует GTP to cGMP. PDE ухудшает передачу сигналов NO, деградируя cGMP до его неактивного изомера GMP. Аргиназа ограничивает образование оксида азота на конкурентной основе. В результате клетке не хватает биологически активного оксида азота, и она отвечает реакцией с повышением NOS и ферментов, участвующих в детоксикации свободных радикалов, включая каталазу и супероксиддисмутазу [26]. Более подробно способы взаимодействия оксида азота и супероксидов при панкреатите были описаны нами ранее в предыдущей публикации [7].

Заключение

Для подтверждения роли кислородных радикалов в развитии воспаления поджелудочной железы необходимы четко определенные клинические исследования с участием пациентов, страдающих панкреатитом. Восстановление уровня биологически активного оксида азота с помощью экзогенных доноров оксида азота или антиоксидантов, которые являются дефицитными у пациентов с пан-

креатинитом, может служить возможным вариантом для разработки новых дополнительных методов лечения заболеваний поджелудочной железы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Данная работа была поддержана исследовательским грантом DFG для J.S. (DFG SFB 293 Teilprojekt B7).

Список литературы

1. Alm P, Ekström P, Henningsson R, Lundquist I. Morphological evidence for the existence of nitric oxide and carbon monoxide pathways in the rat islets of Langerhans: An immunocytochemical and confocal microscopical study. *Diabetologia*. 1999 Jul 29;42(8):978–86. doi: 10.1007/s001250051256
2. Andraus W, Jukemura J, Dutra F, Bechara E, Cunha JEM, Machado MCC. Oxidative stress is enhanced by hypothermia imposed on cerulein-induced pancreatitis in rats. *Clinics*. 2007;62(4):483–90. doi: 10.1590/s1807-59322007000400016
3. Ang AD, Adhikari S, Ng SW, Bhatia M. Expression of Nitric Oxide Synthase Isoforms and Nitric Oxide Production in Acute Pancreatitis and Associated Lung Injury. *Pancreatol*. 2009 Jan;9(1–2):150–9. doi: 10.1159/000178886
4. Beckman JS. Oxidative Damage and Tyrosine Nitration from Peroxynitrite. *Chemical Research in Toxicology*. 1996 Jan;9(5):836–44. doi: 10.1021/tx9501445
5. Buchwalow I, Samoilova V, Boecker W, Tiemann M. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Scientific Reports*. 2011 Jul 1;1(1). doi:10.1038/srep00028
6. Buchwalow I, Schnekenburger J, Atiakshin D, Samoilova V, Wolf E, Boecker W, et al. Oxidative stress and NO generation in the rat pancreatitis induced by pancreatic duct ligation. *Acta Histochemica* [Internet]. 2017 Apr [cited 2019 Mar 24];119(3):252–6. doi: 10.1016/j.acthis.2017.01.010
7. Buchwalow I, Schnekenburger J, Tiemann K, Samoilova V, Bankfalvi A, Poremba C, et al. L-arginine-NO-cGMP signalling pathway in pancreatitis. *Scientific Reports* [Internet]. 2013 May 28 [cited 2019 Mar 24];3(1). doi: 10.1038/srep01899
8. Buchwalow IB, Böcker W. Immunohistochemistry: Basics and Methods. Berlin Springer Berlin; 2014.
9. Buchwalow IB, Cacanyiova S, Neumann J, Samoilova VE, Boecker W, Kristek F. The role of arterial smooth muscle in vasorelaxation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008 Dec;377(2):504–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.10.019
10. Buchwalow IB, Minin EA, Müller F-U, Lewin G, Samoilova VE, Schmitz W, et al. Nitric oxide synthase in muscular dystrophies: a re-evaluation. *Acta Neuropathologica*. 2006 May 9;111(6):579–88. doi: 10.1007/s00401-006-0069-5
11. Buchwalow IB, Podzuweit T, Bocker W, Samoilova VE, Thomas S, Wellner M, et al. Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase. *The FASEB Journal*. 2002 Apr;16(6):500–8.
12. Buchwalow IB, Schulze W, Kostic MM, Wallukat G, Morwinski R. Intracellular localization of inducible nitric oxide synthase in neonatal rat cardiomyocytes in culture. *Acta Histochemica*. 1997 Jun;99(2):231–40. doi: 10.1016/s0065-1281(97)80046-3
13. Burrell MA, Montuenga LM, García M, Villaro AC. Detection of nitric oxide synthase (NOS) in somatostatin-producing cells of human and murine stomach and pancreas. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1996 Apr;44(4):339–46. doi: 10.1177/44.4.8601693
14. Cattley RC, Glover SE. Elevated 8-hydroxydeoxyguanosine in hepatic DNA of rats following exposure to peroxisome proliferators: relationship to carcinogenesis and nuclear localization. *Carcinogenesis*. 1993;14(12):2495–9. doi: 10.1093/carcin/14.12.2495
15. Chvanov M, Petersen O, Tepikin A. Free radicals and the pancreatic acinar cells: role in physiology and pathology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2005 Dec 29;360(1464):2273–84. doi: 10.1098/rstb.2005.1757
16. Esrefoglu M. Experimental and clinical evidence of antioxidant therapy in acute pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology*. 2012;18(39):5533. doi: 10.3748/wjg.v18.i39.5533
17. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2003 Jan;284(1):R1–12. doi: 10.1152/ajpregu.00323.2002
18. Giordano A, Tonello C, Bulbarelli A, Cozzi V, Cinti S, Carruba MO, et al. Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus. *FEBS Letters*. 2002 Jan 18;514(2–3):135–40. doi: 10.1016/s0014-5793(02)02245-7
19. Gomez-Cambronero L, Camps B, de La Asuncion JG, Cerda M, Pellin A, Pallardo FV, et al. Pentoxifylline ameliorates cerulein-induced pancreatitis in rats: role of glutathione and nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 May;293(2):670–6.
20. Hyun JJ, Lee HS. Experimental Models of Pancreatitis. *Clinical Endoscopy*. 2014;47(3):212. doi: 10.5946/ce.2014.47.3.212
21. Kim H. Cerulein Pancreatitis: Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. *Gut and Liver*. 2008 Sep 30;2(2):74–80. doi: 10.5009/gnl.2008.2.2.74
22. Lajoix A-D, Reggio H, Chardès T, Péraldi-Roux S, Tribillac F, Roye M, et al. A Neuronal Isoform of Nitric Oxide Synthase Expressed in Pancreatic β -Cells Controls Insulin Secretion. *Diabetes*. 2001 Jun;50(6):1311–2. doi: 10.2337/diabetes.50.6.1311
23. Lerch MM, Adler G. Experimental animal models of acute pancreatitis. *Int J Pancreatol*. 1994;15:159–70.
24. Martin E, Berka V, Tsai AL, Murad F. Soluble guanylyl cyclase: the nitric oxide receptor. *Methods Enzymol*. 2005;396:478–92.

25. McCord JM. Superoxide dismutase in aging and disease: an overview. *Methods Enzymol.* 2002;349:331–341.
26. Munoz-Casares FC, Padillo FJ, Briceno J, Colado JA, Munoz-Castaneda JR, Ortega R, et al. Melatonin reduces apoptosis and necrosis induced by ischemia/reperfusion injury of the pancreas. *Journal of Pineal Research.* 2006 Apr;40(3):195–203. doi: 10.1111/j.1600-079x.2005.00291.x
27. Nakazawa H, Fukuyama N, Takizawa S, Tsuji C, Yoshitake M, Ishida H. Nitrotyrosine formation and its role in various pathological conditions. *Free Radical Research.* 2000 Jan;33(6):771–84. doi: 10.1080/10715760000301291
28. Reinheckel T, Prause J, Nedeliev B, Augustin W, Schulz H-U, Lippert H, et al. Oxidative Stress Affects Pancreatic Proteins during the Early Pathogenesis of Rat Caerulein Pancreatitis. *Digestion.* 1999;60(1):56–62. doi: 10.1159/000007589
29. Sampson JB, Rosen H, Beckman JS. Peroxynitrite-dependent tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase, myeloperoxidase, and horseradish peroxidase. *Methods Enzymol.* 1996; 269:210–218.
30. Schick V, Scheiber JA, Mooren FC, Turi S, Ceyhan GO, Schnekenburger J, et al. Effect of magnesium supplementation and depletion on the onset and course of acute experimental pancreatitis. *Gut.* 2013 Nov 25;63(9):1469–80. doi: 10.1136/gutjnl-2012-304274
31. Schnekenburger J, Mayerle J, Krüger B, Buchwalow I, Weiss FU F, Albrecht E, et al. Protein tyrosine phosphatase and SHP-1 are involved in the regulation of cell-cell contacts at adherens junctions in the exocrine pancreas. *Gut.* 2005 Oct 1;54(10):1445–55. doi: 10.1136/gut.2004.063164
32. Strobel O, Dor Y, Stirman A, Trainor A, Fernandez-del Castillo C, Warshaw AL, et al. Beta cell transdifferentiation does not contribute to preneoplastic/metaplastic ductal lesions of the pancreas by genetic lineage tracing in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007 Mar 7;104(11):4419–24. doi: 10.1073/pnas.0605248104
33. Tandon RK, Garg PK. Oxidative Stress in Chronic Pancreatitis: Pathophysiological Relevance and Management. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2011 Nov 15;15(10):2757–66. doi: 10.1089/ars.2011.4115
34. Waddington SN. Arginase in glomerulonephritis. *Kidney International.* 2002 Mar;61(3):876–81. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00236.x
35. Weber IA, Buchwalow I, Hahn D, Domschke W, Lerch MM, Schnekenburger J. The potential role of kinesin and dynein in Golgi scattering and cytoplasmic vacuole formation during acute experimental pancreatitis. *Cell Research.* 2010 Apr 6;20(5):599–602. doi: 10.1038/cr.2010.42
36. Yu JH, Kim H. Oxidative stress and inflammatory signaling in cerulein pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology.* 2014;20(46):17324–9. doi: 10.3748/wjg.v20.i46.17324
37. Yu W, Niwa T, Miura Y, Horio F, Teradaira S, Ribar TJ, et al. Calmodulin Overexpression Causes Ca²⁺-Dependent Apoptosis of Pancreatic β Cells, Which Can Be Prevented by Inhibition of Nitric Oxide Synthase. *Laboratory Investigation.* 2002 Sep;82(9):1229–39. doi: 10.1097/01.lab.0000027921.01548.c5

Поступила в редакцию 13.01.2019
Принята в печать 27.02.2019

Received 13.01.2019
Accepted 27.02.2019

Для цитирования: Тиманн К., Шнекенбургер Ю., Шик В., Демус У., Мюллер-Вердан У., Атякшин Д.А., Беккер В., Самойлова В.Е., Бухвалов И.Б. Окислительный стресс и образование NO при церулеин-индуцированном панкреатите у крыс. *Журнал анатомии и гистопатологии.* 2019; 8(1): 68–76. doi: 10.18499/2225-7357-2019-8-1-68-76.

For citation: Tiemann K, Schnekenburger J, Schick V, Demus U, Müller-Werdan U, Atiakshin DA, Boecker W, Samoilova VE, Buchwalow IB. Oxidative stress and NO generation in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Journal of Anatomy and Histopathology.* 2019; 8(1): 68–76. doi: 10.18499/2225-7357-2019-8-1-68-76.