

Г.М. Корнійчук, Н.В. Макогон, І.М. Алексеєва, І.В. Лушнікова

## Вплив екзогенних лейкотриєнів і блокаторів ліпоксигеназ на апоптоз та некроз гепатоцитів щурів у первинній культурі

*Два варианта гибели клеток - апоптоз и некроз - в разных соотношениях наблюдаются в печени при патологии. Важным является изучение факторов регуляции этих процессов с целью возможного на них влияния. Есть данные о том, что продукты липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты участвуют в регуляции апоптической гибели некоторых типов клеток. Их роль в процессах гибели гепатоцитов практически не изучена. В данной работе изучали влияние экзогенных лейкотриенов  $B_4$  и  $C_4$ , а также блокаторов липоксигеназ на апоптоз и некроз гепатоцитов крыс в первичной культуре с помощью подсчета живых, некротических и апоптических гепатоцитов (прижизненно окрашенных красителями Хехст 33342 и пропидиум иодид), а также с помощью электронной микроскопии. Показано, что общий блокатор липоксигеназ – нордигидрогуаяретовая кислота и блокатор 5-липоксигеназы – кофейная кислота ( $2 \cdot 10^{-5}$  моль/л) индуцировали апоптоз в культуре гепатоцитов через 4 и 24 ч. В то же время лейкотриены  $B_4$  и  $C_4$  ( $10^{-8}$  моль/л) увеличивали количество некротических и не вызывали существенных изменений количества апоптических гепатоцитов в культуре. Лейкотриены  $B_4$  и  $C_4$  примененные на фоне блокаторов липоксигеназ, оказывали пронекротическое действие и снижали апоптоз, индуцированный блокаторами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что липоксигеназный путь метаболизма арахидоновой кислоты является важным регулятором жизнеспособности и апоптоза гепатоцитов. Увеличение при некоторых заболеваниях печени содержания продуктов липоксигеназ, в частности лейкотриенов, может смещать баланс апоптической и некротической гибели клеток в сторону последней.*

### ВСТУП

Одним із етапів життєвого шляху клітини є її загибель, яка може бути опосередкована апоптозом та некрозом. Ці два варіанти загибелі характеризуються різними морфологічними та молекулярними явищами та різними наслідками для навколишніх тканин. Оскільки апоптоз і некроз у різних співвідношеннях спостерігаються при патології печінки [3,4,16], вивчення факторів, що їх регулюють, дозволить певним шляхом впливати на них. Останнім часом все більше даних свідчать про те, що ліпоксигеназний шлях метаболізму арахідонової кислоти (АК) відіг-

рає важливу роль у регуляції виживання та апоптозу клітин [2, 8, 14]. Так, було показано, що загальні та селективні блокатори ліпоксигеназ індукували апоптичну загибель деяких клітин [8, 12, 14]. Проте є відомості і про здатність цих блокаторів інгібувати апоптоз у деяких клітинах [2]. Також суперечливі дані щодо апоптозіндукуючої дії блокаторів окремих ліпоксигеназ (5, 12 або 15 ліпоксигеназ) [12, 14]. Все це призводить до необхідності детального вивчення участі окремих ліпоксигеназ та їх продуктів у розвитку процесів апоптозу та некрозу в конкретних типах клітин. Відомо, що в гепатоцитах утворюються ліпоксигеназні похідні АК

© Г.М. Корнійчук, Н.В. Макогон, І.М. Алексеєва, І.В. Лушнікова

(5-НЕТЕ, 15-НЕТЕ, лейкотриєни (ЛТ)  $B_4$ ,  $C_4$  тощо) [5, 13, 15]. Однак участь ліпоксигеназ та їх продуктів у процесах апоптозу в гепатоцитах практично не вивчена, є лише окремі відомості відносно трансформованих паренхімних клітин печінки [11]. У наших попередніх дослідженнях (методом прижиттєвого подвійного забарвлення клітин та визначення виходу цитозольного ферменту аланінамінотрансферази з ушкоджених гепатоцитів) показано, що загальний блокатор ліпоксигеназ нордигідрогуаяретова кислота (НДГК) і блокатор 5-ліпоксигенази кофейна кислота (КК) мають проапоптичну та антинекротичну дію [1].

Метою цієї роботи - вивчити зміни апоптозу та некрозу гепатоцитів щурів у первинній культурі при дії екзогенних ЛТ  $B_4$  і  $C_4$  та блокаторів ліпоксигеназ методом прижиттєвого подвійного забарвлення та електронної мікроскопії.

## МЕТОДИКА

Об'єктом дослідження була первинна культура гепатоцитів. Клітини печінки брали у дорослих щурів-самців лінії Вістар. Тварин наркотизували нембуталом (40 мг/кг) та вводили гепарин у хвостову вену. Гепатоцити виділяли за допомогою двоетапної колагеназної перфузії спочатку безкальцієвим розчином Хенкса (7-10 хв), що містив 9 ммоль/л НЕРЕС і 0,5 ммоль/л EGTA, після чого продовжували перфузію 0,05%-м розчином колагенази (тип 1А, "Sigma"; США) в розчині Хенкса з 9 ммоль/л НЕРЕС і 5 ммоль/л  $CaCl_2$  (рН 7,4; 37° С) протягом 25-30 хв. Гепатоцити очищали від непаренхіматозних клітин та нежиттєздатних гепатоцитів центрифугуванням на градієнті густини Перкола.

Культивування клітин проводили в оброблених колагеном планшетах для культур клітин ("Sigma", США) в поживному середовищі RPMI 1640, що містило 15 ммоль/л НЕРЕС, 10 % ембріональної телячої сироватки та антибіотики. Густина клітин в 24-лункових планшетах становила  $1 \cdot 10^5$  гепатоцитів

на лунку. Після 18-годинного культивування при 37°С у вологій камері гепатоцити утворювали моношари. Клітини обробляли блокаторами ліпоксигеназ НДГК і КК («Sigma», США) в кінцевій концентрації  $2 \cdot 10^{-5}$  моль/л. Екзогенні ЛТ  $B_4$  та  $C_4$  («Sigma», США) вносили в культуральне середовище в кінцевій концентрації  $10^{-8}$  моль/л окремо та на фоні блокаторів ліпоксигеназ НДГК і КК (через 15 хв після обробки блокаторами в кінцевій концентрації  $2 \cdot 10^{-5}$  моль/л). Оцінку апоптозу та некрозу клітин проводили через 1, 4 та 24 год після дії блокаторів і ЛТ.

Культури клітин прижиттєво забарвлювали флюоресцентними барвниками нуклеїнових кислот (Хехст 33342 та пропідіум йодид), що дало можливість диференціювати живі, некротичні та апоптичні клітини. Барвник Хехст 33342 проходить крізь мембрани і живих, і мертвих клітин та забарвлює їх ядра у зелений колір. Пропідіум йодид проходить лише крізь мембрани мертвих клітин та забарвлює їх ядра у оранжевий колір. Апоптичні клітини мають характерну конденсацію хроматину чи розпадаються на апоптичні тільця. Гепатоцити відмивали від середовища культивування забуференим фосфатами фізіологічним розчином (ЗФФР), рН 7,4. Живі клітини інкубували протягом 10 хв у темряві при кімнатній температурі при наявності барвників Хехст 33342 і пропідіум йодиду в кінцевій концентрації 10 мкмоль/л. Забарвлені клітини ретельно відмивали ЗФФР і фіксували забуференим фосфатами 5%-м розчином формаліну 5 хв у темряві. Зафіксовані культури ретельно відмивали та висушували. Підрахунок живих, некротичних та апоптичних клітин здійснювали за допомогою люмінесцентного мікроскопа (x40). При кожному впливі підраховували мінімум 600 клітин.

Електронно-мікроскопічні дослідження проводили на гепатоцитах, культивованих у спеціальних, оброблених колагеном, 8-лункових планшетах для електронної мікроскопії (Nunc Inc.). Густина клітин становила  $5 \cdot 10^5$  на лунку. Культури гепатоцитів у відповідні строки після впливів відмивали фосфатним

буфером (ФБ). Клітини фіксували розчином, який містив 0,1 моль/л ФБ, рН 7,4, 2% формальдегіду та 2,5% глютаральдегіду, протягом 1 год при кімнатній температурі. Після відмивання ФБ проводили постфіксацію 1%-м розчином OsO<sub>4</sub> в ФБ, рН 7,4, протягом 1 год при кімнатній температурі. Після фіксації та наступного відмивання зразки обезводнювали етанолом в концентрації, що підвищується, та заливали в епоксидну смолу, яка містила Епон 812, DDSA та Agaldit. Ультратонкі зрізи (40-50 нм) одержували за допомогою діамантового ножа, контрастували їх ураніацетатом і цитратом свинцю за Рейнольдсом і вивчали в електронному мікроскопі JEM 100 – CX (“Jeol”, Японія).

Проведено три окремих експерименти, в кожному з яких використовували триплікати культур гепатоцитів для кожного впливу. Статистична обробка результатів проведена з обчисленням критерію t Стьюдента для пар даних.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Раніше ми показали, що блокатори ліпоксигеназ НДГК і КК викликали зменшення ви-

ходу цитозольного ферменту аланінамінотрансферази (АЛТ) з культивованих гепатоцитів, тобто зменшували некротичні процеси в них [1, 10]. Підрахунок живих, некротичних та апоптичних гепатоцитів за методом прижиттєвого подвійного забарвлення засвідчив, що обидва блокатори значною мірою збільшували кількість апоптичних клітин у культурі вже через 4 год. Цей ефект посилювався на 24 год дослідження (табл.1). Апоптозіндукуюча дія НДГК була сильнішою, ніж КК (P<0,05).

Електронно-мікроскопічні дослідження підтвердили індукцію апоптозу блокаторами ліпоксигеназ і виявили його характерні ультраструктурні риси. Показано, що для первинної культури гепатоцитів, обробленої блокаторами ліпоксигеназ НДГК і КК (кінцева концентрація 2 · 10<sup>-5</sup> моль/л) протягом 4 та 24 год, характерною була наявність значної кількості гепатоцитів з типовими для апоптозу морфологічними змінами, а саме відмічалася виражена конденсація ядерного хроматину, зміна форми ядра, що ставало іноді видовженим, зігнутим, подібним до кільця; ядерна мембрана утворювала інвагінації та вип'ячування (рис.1,а). Гепатоцити мали

**Таблиця 1. Зміни кількості живих, некротичних та апоптичних гепатоцитів (%) при дії блокаторів ліпоксигеназ та екзогенних лейкотриєнів на їх фоні через 24 год після впливу (за даними прижиттєвого подвійного забарвлення)**

Схема досліджу	Живі клітини	Некротичні клітини	Апоптичні клітини
Інтактні клітини	70,4±7,6	26,6±6,8	3,0±0,8
Нордигідрогуаяретова кислота (2 · 10 <sup>-5</sup> моль/л)	64,3±7,3	24,7±6,5	11,0±1,0*(P<0,001)
Нордигідрогуаяретова кислота та лейкотриєн В <sub>4</sub> (10 <sup>-8</sup> моль/л)	50,2±10,6	43,6±10,6**(P<0,05)	6,2±0,6**(P<0,001)
Нордигідрогуаяретова кислота та лейкотриєн С <sub>4</sub> (10 <sup>-8</sup> моль/л)	61,2±10,9	31,4±10,5	7,4±1,0**(P<0,01)
Кофейна кислота (2 · 10 <sup>-5</sup> моль/л)	70,7±5,2	22,3±4,9	7,5±0,9*(P<0,001)
Кофейна кислота та лейкотриєн В <sub>4</sub> (10 <sup>-8</sup> моль/л)	65,0±8,0	30,5±7,6**(P<0,05)	4,5±0,8**(P<0,05)
Кофейна кислота та лейкотриєн С <sub>4</sub> (10 <sup>-8</sup> моль/л)	63,8±8,4	31,6±7,8**(P<0,05)	3,9±0,8**(P<0,01)

\* вірогідна різниця відносно інтактних культур;

\*\* вірогідна різниця відносно культур, оброблених блокаторами ліпоксигеназ відповідно.

нормальну або конденсовану цитоплазму та цілісну плазматичну мембрану. На поверхні клітин спостерігалися вип'ячування плазматичної мембрани, тобто утворювалися так звані "blebs", характерні для апоптозу (рис.1,б). Кількість мікроворсинок істотно зменшувалася, клітини округлювались і втрачали міжклітинні контакти. Зустрічалися також апоптичні клітини з зонами, які містили велику кількість невеликих електронно-прозорих вакуолей, що, зливаючись між собою, можуть відокремлювати частину цитоплазми, тобто утворювати апоптичні тільця (рис.1,в). Часто при формуванні апоптичних тілець утворювались електронно-щільні структури, що містили мітохондрії (МТХ) з конденсованим матриксом та оточуючими їх кількома рядами зернистого ендоплазматичного ретикулула (ЕПР). Спостерігали широкий спектр змін у МТХ (від інтактного до деструктивного стану): слід відмітити їх скупчення поблизу ядер, іноді спостерігалися набухання МТХ і порушення структури крист із утворенням внутрішньомітохондріальних пухирців, вакуоляризація МТХ та зміна їх форми. В апоптичних клітинах була дещо підвищена кількість аутофагосом з м'ялиноподібними структурами. Відмічалися також гепатоцити, що повністю розпалися на апоптичні тільця з інтактною плазматичною мембраною.

Таким чином, нами показано, що блокатори ліпоксигеназ мають проапоптичну та антинекротичну дію на гепатоцити. Можна припустити, що самі ліпоксигенази та їх продукти, зокрема ЛТ, можуть знижувати апоптоз і підсилювати некроз. Раніше ми встановили, що екзогенні ЛТ  $V_4$  і  $C_4$  у широкому діапазоні кінцевих концентрацій (від  $10^{-7}$  до  $10^{-12}$  моль/л) істотно збільшували вихід цитозольного ферменту АЛТ з культивованих гепатоцитів через 1 год після впливу, що свідчить про посилення некротичних процесів і високу чутливість клітин до дії ЛТ [10]. У цій роботі ми використовували екзогенні ЛТ у концентрації, яка мала суттєвий ефект на вихід АЛТ, а саме  $10^{-8}$  моль/л. Показано вірогідне зменшення кількості живих та збіль-

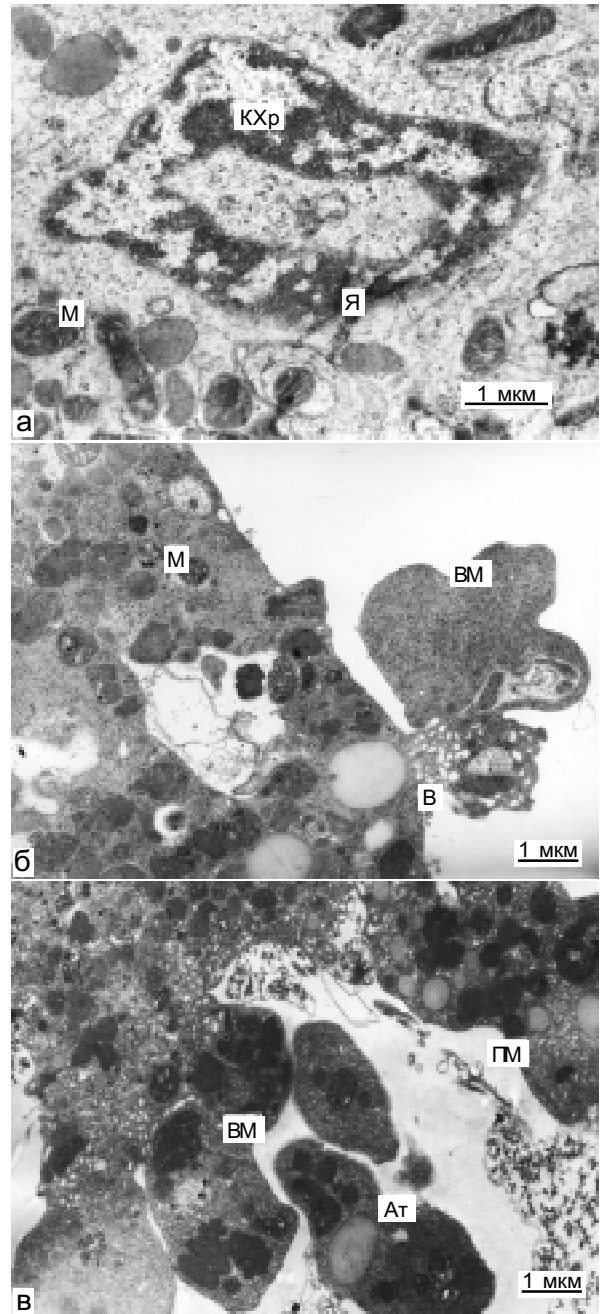


Рис. 1. Ультраструктура гепатоцитів при дії блокаторів ліпоксигеназ у концентрації  $2 \cdot 10^{-5}$  моль/л: а - конденсація ядерного хроматину та зміна форми ядра; б - утворення вип'ячувань на поверхні апоптичного гепатоцита; в - формування апоптичних тілець.

Я - ядро, КХр - конденсований хроматин, М - мітохондрії, В - вакуолі, ПМ - плазматична мембрана, ВМ - вип'ячування плазматичної мембрани, Ат - апоптичні тільця.

шення кількості некротичних клітин при дії ЛТ В<sub>4</sub> та С<sub>4</sub> через 1 год після впливу (табл. 2). Проте обидва лейкотриєни не викликали вірогідної зміни кількості апоптичних клітин в досліджені строки.

Електронно-мікроскопічні дослідження первинної культури гепатоцитів при дії екзогенних ЛТ В<sub>4</sub> та С<sub>4</sub> (10<sup>-8</sup> моль/л) протягом 1 год показали істотне збільшення кількості клітин з типовими рисами некротичних змін (див. рис.2,а). Виявлені клітини на початкових стадіях некрозу, для яких було характерне просвітлення цитоплазми, формування вакуолей, набухання та просвітлення матриксу МТХ та їх вакуоляризація, просвітлення та гомогенізація вмісту ядра; при цьому ядерна мембрана зберігала свою цілісність. Спостерігалася значна кількість клітин на кінцевих стадіях некрозу, а саме: з великою кількістю вакуолей, з деструкцією МТХ, з порушенням цілісності ядерної та плазматичної мембран, і, як наслідок, з вививанням вмісту ядра (див. рис.2,б).

Оскільки існують окремі відомості, що гепатоцити здатні синтезувати похідні АК за ліпоксигеназним шляхом її метаболізму, ми вважали доцільним вивчити дію екзогенних ЛТ на фоні блокади синтезу ендogenous похідних АК. Нами показано суттєве зменшення кількості живих клітин і збільшення кількості некротичних клітин при дії ЛТ В<sub>4</sub> та С<sub>4</sub> за наявності блокаторів ліпоксигеназ НДГК і КК, тобто проявлялася пронекротична дія ЛТ (див. табл.1). У даному дослідженні важливим було те, що обидва ЛТ викликали знач-

не зменшення апоптозу, індукованого блокаторами ліпоксигеназ (див. табл.1). Слід відмітити, що електронно-мікроскопічні дослідження культур гепатоцитів, оброблених блокаторами та ЛТ, окремо та сумісно, виявили клітини, в яких одночасно спостерігались як ознаки апоптозу (конденсація ядерного хроматину, його розташування по периферії ядра, зменшення та зміни форми ядра), так і некрозу (просвітлення цитоплазми, набухання МТХ та їх деструкція, значна

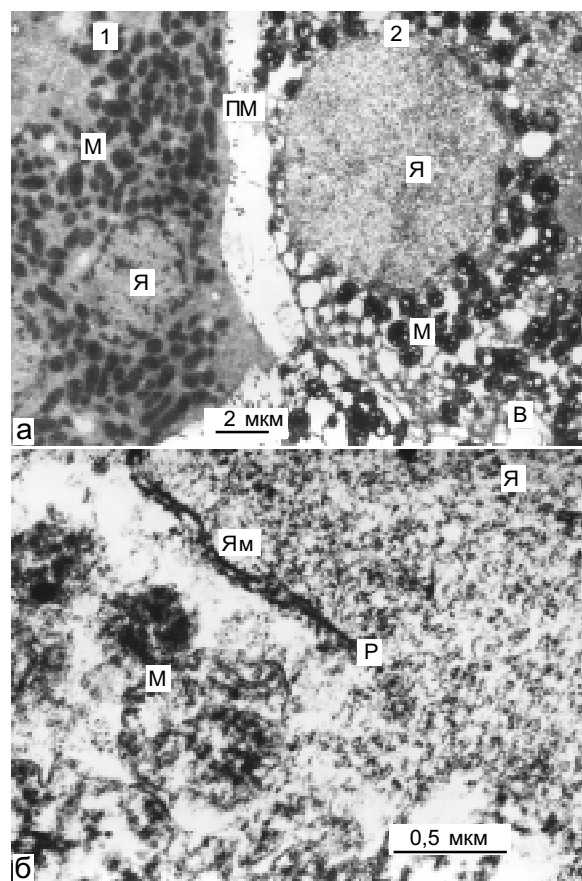


Рис. 2. Ультраструктура моношару гепатоцитів при дії екзогенних лейкотриєнів В<sub>4</sub> та С<sub>4</sub> в концентрації 10<sup>-8</sup> моль/л. а - неушкоджений гепатоцит (1) та початкова стадія некрозу (2), б - гепатоцит на кінцевій стадії некрозу.

Я – ядро, М – мітохондрії, В – вакуолі, ПМ – плазматична мембрана, Ям – ядерна мембрана, Р – розрив ядерної мембрани та витікання вмісту ядра.

**Таблиця 2.** Зміни кількості живих та некротичних гепатоцитів (%) при дії екзогенних лейкотриєнів (ЛТ) В<sub>4</sub> та С<sub>4</sub> через 1 год після впливу (за даними прижиттєвого подвійного забарвлення)

Впливи	Живі клітини	Некротичні клітини
Інтактні клітини	69,6±3,7	26,5±3,5
ЛТ В <sub>4</sub> (10 <sup>-8</sup> моль/л)	63,4±5,8*	32,0±5,6*
ЛТ С <sub>4</sub> (10 <sup>-8</sup> моль/л)	60,4±6,3**	35,8±5,9**

\* P<0,05 - відносно інтактних клітин;

\*\* P<0,01 - відносно інтактних клітин.

вакуоляризація, ушкодження плазматичної мембрани). Ці спостереження свідчать на користь нещодавно висловленої концепції некроаптозу, згідно з якою не існує чітко відокремлених апоптозу та некрозу, вони є полюсами, між якими знаходиться широкий спектр перехідних форм. Сигнали, що ушкоджують клітину, призводять до її загибелі, яка, залежно від функціонального стану клітини, а особливо, від забезпеченості енергією, може відбуватися тим чи іншим шляхом [9]. Наші попередні дослідження встановили, що ЛТ пригнічують активність електронтранспортного ланцюга МТХ, під час функціонування якого утворюється АТФ, а блокатори ліпоксигеназ підвищують цю активність [1, 10]. Це свідчить про те, що вплив продуктів метаболізму АК на загибель гепатоцитів може бути опосередкований через функції мітохондрій.

Аналіз отриманих результатів дозволяє зробити висновок, що ліпоксигеназний шлях метаболізму арахідонової кислоти є важливим регулятором життєздатності та загибелі гепатоцитів. Ліпоксигенази та їх продукти зменшують апоптоз гепатоцитів. Збільшення кількості продуктів ліпоксигеназ, зокрема ЛТ  $V_4$  та  $C_4$ , яке спостерігається при багатьох ураженнях печінки [6, 7], може змістити баланс апоптичної та некротичної загибелі клітин в бік останньої.

**G.M. Korniychuk, N.V. Makogon,  
I.N. Alexeyeva, I.V. Lushnikova.**

#### **THE INFLUENCE OF EXOGENOUS LEUKOTRIENES AND LIPOXYGENASE INHIBITORS ON APOPTOSIS AND NECROSIS IN RAT CULTURED HEPATOCYTES.**

Liver cell death by apoptosis and necrosis occurs upon the liver injury. Lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism is known to regulate the viability and apoptosis in some cell types, but its role in hepatocyte cell death is not fully understood. We studied the influence of leukotrienes (LT) and lipoxygenase inhibitors on apoptosis and necrosis in rat hepatocyte primary culture by double staining with

Hoechst 33342 and propidium iodide and electron microscopy. Treatment with general lipoxygenase inhibitor nordihydroguaiaretic acid and 5-lipoxygenase inhibitor caffeic acid ( $2 \cdot 10^{-5}M$ ) for 4 and 24 h induced hepatocyte apoptosis. LT $B_4$  and LT $C_4$  ( $10^{-8}M$ ) decreased the number of living cells and increased the number of necrotic cells. LTs exerted the same necrotic effect on hepatocytes, treated with lipoxygenase inhibitors. It is important that LTs decreased apoptosis induced by inhibitors treatment. These data suggest that lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism is important regulator of hepatocytes viability and apoptosis. The increase of lipoxygenase product formation, in particular LTs, may diminish apoptosis and increase necrosis in hepatocytes upon the liver injury.

*A.A. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Science of Ukraine, Kiev*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Корнійчук Г.М., Макогон Н.В., Лушнікова І.В., Алексеева І.М. Блокатори ліпоксигеназ індукують апоптоз гепатоцитів щурів в первинній культурі // Укр. біохім. журн. - 2002. - №1. - С.125-127.
2. Матышевская О.П., Пастух В.Н., Солодушко В.А. Ингибирование липоксигеназной активности снижает индуцированную радиацией фрагментацию ДНК в лимфоцитах // Радиационная биология и радиоэкология - 1999. - **39**, №2-3. - С.282-286.
3. Feldmann G., Lamboley C., Moreau A. et al. Fas-mediated apoptosis of hepatic cells // Biomed. Pharmacother. - 1998. - **2**, N9. - P.378-385.
4. Hayashi N., Mita E. Involvement of Fas system-mediated apoptosis in pathogenesis of viral hepatitis // J. Viral. Hepat. - 1999. - **6**, N5. - P.357-365.
5. Huwyler J., Gut J. Single-step organic extraction of leukotrienes and related compounds and their simultaneous analysis by high-performance liquid chromatography // Anal. Biochem. - 1990. - **1**, N188(Pt2). - P.374-382.
6. Kawada N., Mizoguchi Y., Sakagami Y. et al. Changes in leukotrienes and prostaglandins in the liver tissue of rats in experimental massive hepatic cell necrosis model // Prostagland. leukotr. Essent Fatty Acids. - 1990. - **40**, N2. - P.149-155.
7. Keppler D. Leukotrienes: biosynthesis, transport, inactivation, and analysis // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. - 1992. - **121**.-P.1-31.
8. Korystov Yu.N., Shaposhnikova V.V., Levitman M.Kh. et al. The effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on proliferation and death of tumor cells // FEBS Lett. - 1998. - **31**, N2. - P.224-226.

9. Lemasters J.J. Necroptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis // Amer.J.Physiol. - 1999. - **276**. - P.G1-G6.
10. Makogon N.V., Korneitchuk A.N., Lushnikova I.V., Alexeyeva I.N. Effects of exogenous leukotrienes B<sub>4</sub> and C<sub>4</sub> on the viability of cultured rat hepatocytes // Acta Physiol. Pharmacol. Bulg. - 2000. - N25. - P.87-91.
11. Muhlenfeld K., Langner A. Biotransformation and toxicity of the lipoxygenase inhibitor 2-hydroxy-5-methylaurophenone oxime (FLM 5011) on Hep G2 cells // Arch. Pharm. (Weinheim). - 1998. - **331**, N7-8. - P.259-261.
12. Myers CE., Ghosh J. Lipoxygenase inhibition in prostate cancer // Eur.Urol.-1999.- **35**, N5-6.- P.395-398.
13. Otomo Y., Kanda Y., Yoshino Y. et al. Production of leukotrienes in rat Kupffer cells and hepatocytes by various inducers // J. Jap. Surg.Soc. - 1993. - **4**, N3. - P.234-241.
14. Tang D., Chen Y., Honn K. Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis // Cell Biol. - 1996. - **93**. - P. 5241-5246.
15. Titos E., Claria J., Bataller R. et al. Hepatocyte-derived cysteinyl leukotrienes modulate vascular tone in experimental cirrhosis // Gastroenterology. - 2000. - **119**, N3. - P.794-805.
16. Wang J.H., Redmond H.P., Wu Q.D. et al. Nitric oxide mediates hepatocyte injury // Amer. J. Physiol. - 1998. - **257**, N5(Pt1). - G1117-1126.

*Інститут фізіології ім А.А.Богомольца НАН  
України, Київ*

*Матеріал надійшов до  
редакції 1.03.2002*