

Застосування модуляторів синтезу оксиду азоту при токсичному та холестатичному ураженнях печінки

О.М.Олещук

Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я.Горбачевського
Тернопіль, Україна

Вивчено вплив L-аргініну, N-нітро-L-аргініну та мелатоніну при їх повторному введенні на показники функціонального стану печінки при токсичному гепатиті та холестази. Встановлено, що L-аргінін проявляє більш виражений гепатопротекторний ефект при гострому гепатиті, ніж при холестази. Мелатонін, а не N-нітро-L-аргінін, сприяє покращенню метаболічних процесів в ураженому органі як при холестази, так і при токсичному гепатиті.

Ключові слова: печінка, гепатит, холестаз, L-аргінін, мелатонін, N-нітро-L-аргінін.

ВСТУП

З часу відкриття і до сьогодні продовжується активне вивчення ролі оксиду азоту (NO) як одного із представників месенджерних систем, який бере участь у багатьох фізіологічних та патологічних процесах [15, 17]. Утворення NO відбувається з амінокислоти L-аргініну під впливом NO-синтази (NOS) [16]. Встановлено, що в гепатоцитах знаходиться як конститутивна (eNOS), так і індукцибельна (iNOS) ізоформа ферменту [11]. Активація останньої, на думку деяких науковців, відбувається під впливом провокуючих факторів — ендотоксинів, прозапальних цитокінів, ліпополісахаридів та ін. [20, 21, 25]. У відповідь синтезується велика кількість оксиду азоту [6, 12], що супроводжується змінами в метаболічних процесах печінки, які найчастіше корелюють з активністю амінотрансфераз у плазмі або підтверджуються гістологічними змінами. Відомо, що в патогенезі багатьох захворювань оксид азоту і продукти його

окислення, такі як, наприклад, пероксинітрит, відіграють роль безпосереднього ушкоджуючого фактора або сприяють ініціації додаткових факторів агресії [9, 14, 22]. Однак речовини, які запобігають генерації оксиду азоту (блокатори синтезу NO), або антиоксиданти, які зв'язують проміжні продукти метаболізму оксиду азоту, можуть захищати тканину печінки від пошкодження [15, 18]. На противагу цьому були повідомлення, що блокування продукції оксиду азоту збільшує пошкодження тканини ксенобіотиками [23], а оксид азоту проявляє протективну функцію [10, 19].

Метою дослідження було вивчення впливу попередника синтезу оксиду азоту L-аргініну, неселективного блокатора NO-синтази N-нітро-L-аргініну (L-NAME) і мелатоніну, препарату, який проявляє властивості антиоксиданта та інгібітора і(NOS) [7], на метаболічні процеси в печінці при гострому токсичному гепатиті та холестатичному ураженні печінки.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на 48 білих щурах самцях лінії Wistar масою 170-210 г. Тетрахлорметан вводили внутрішньоочеревинно одноразово з розрахунку 2 г/кг [2]. Холестатичне ураження печінки моделювали введенням α -нафтилізотіоціанату (АНІТ) одноразово в дозі 0,1 г/кг [5]. L-аргінін вводили повторно в дозі 25 мг/кг, N-нітро-L-аргінін та мелатонін — 10 мг/кг кожен. У гомогенатах печінки визначали вміст білірубину, холестерину, ТБК-активних продуктів (ТБК), гідроперекисів ліпідів (ГПЛ), кількість відновленого глутатіону (Г-SH), активність супероксиддисмутази (СОД), каталази (КАТ), сукцинатдегідрогенази (СДГ), цитохромоксидази (ЦХО). У сироватці крові визначали активність АЛАТ та АсАТ, лужної

фосфатази (ЛФ), каталази, кількість ТБК-активних продуктів, церулоплазмину, кількість стабільних метаболітів $\text{NO} - \text{NO}_2^-$ та NO_3^- , сечовини. Статистичну обробку результатів досліджень проводили, використовуючи t-критерій Стьюдента, за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що при гострому токсичному гепатиті відбувається зростання в сироватці крові вмісту стабільного метаболіту оксиду NO_2^- в 2,7 разу, що узгоджується з дослідженнями N.Tanaka et al. (1999) [24]. Активація вільнорадикальних процесів при гострому токсичному гепатиті підтверджується збільшенням вмісту первинних та вторинних продуктів ПОЛ ГПЛ та ТБК в ураженому органі відповідно на 73% та 44%. Про розвиток процесів цитолізу в печінці свідчить зростання активності АлАТ та АсАТ у сироватці крові (у 2,5 та 1,9 разу). Одночасно спостерігається достовірне зниження активності антиоксидантних ферментів у печінці. Так, на 72-й годині ураження активність СОД та КАТ в ураженому органі зменшується на 42% та 45% відповідно. Вміст церулоплазмину в крові зростає на 32%. Відбувається виснаження пулу Г-SH, кількість якого зменшується на 35%. Вміст сечовини в сироватці крові вірогідно зростає на 35%. Встановлено, що ураження чотирихлористим вуглецем призводить до порушення тканинного дихання. Так, активність мітохондріальних ферментів СДГ та ЦХО за умов гепатиту знижується на 23% та 22% відповідно. Можна припустити, що це відбувається за рахунок зростання вмісту оксиду азоту та його похідних, пероксинітриду та супероксид-аніону, а також продуктів ПОЛ [7, 22].

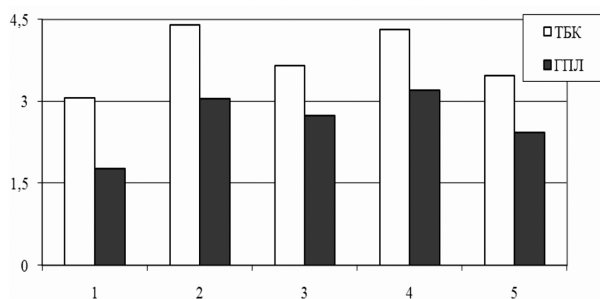


Рис. 1. Вміст продуктів ПОЛ у печінці за введення модуляторів синтезу оксиду азоту при токсичному ураженні печінки.
Примітки: 1 – контроль, 2 – гепатит, 3 – гепатит+L-аргінін, 4 – гепатит+N-нітро-L-аргінін, 5 – гепатит+мелатонін).

Холестатичне ураження печінки супроводжувалося зростанням активності маркерного ферменту ЛФ (у 3,2 рази), вірогідно зростала також активність ферментів цитолізу АлАТ та АсАТ. Спостерігалось зростання компонентів жовчі у сироватці крові – білірубину та холестерину (у 4,3 та 7,3 разу відповідно). Про порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу судили по зростанню активності КАТ (у 2,8 разу) та СОД (у 3,0 разу) у печінці, церулоплазмину (у 2,7 разу) – у сироватці крові та вмісту ГПЛ, ТБК – у гомогенатах печінки (у 3,1 та 2,3 разу відповідно) (рис. 2). Усі ці зміни виникали на фоні вірогідного зростання вмісту NO_2^- та NO_3^- у сироватці крові (в 1,9 та 1,5 разу відповідно). Але концентрація NO_2^- у гомогенатах печінки дещо знижувалась, що може бути зумовлено пригніченням активності конститутивної eNOS при гострому токсичному гепатиті [13].

Введення L-аргініну при CCl_4 -гепатиті призводить до зниження активності АлАТ (на 14%) та АсАТ (на 11%), що свідчить про наявність у цієї амінокислоти цитопротекторної дії та узгоджується з результатами інших дослідників [4]. Підвищення вмісту в гомогенатах печінки NO_2^- під впливом L-аргініну в 1,3 разу порівняно з ураженням є, на нашу думку, результатом зростання концентрації субстрату окислення. Повторне застосування L-аргініну супроводжується підвищенням активності КАТ на 18%, СОД – в 1,3 разу, активність церулоплазмину вірогідно не змінюється. Вміст Г-SH збільшується на 32%, зменшується кількість ГПЛ (на 11%) та ТБК (на 17%) (рис. 1). Пригнічення процесів ПОЛ за введення прекурсорів синтезу оксиду азоту підтверджується результатами досліджень інших науковців [3]. Вміст сечовини в сироватці крові зростає, що може свідчити про активацію орнітинового циклу метаболізму L-аргініну [1]. Повторне введення L-аргініну

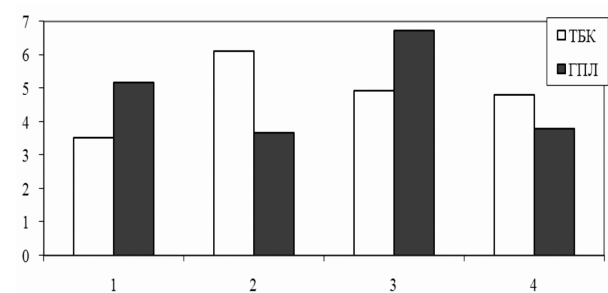


Рис. 2. Вміст продуктів ПОЛ у гомогенатах печінки за введення модуляторів синтезу оксиду азоту при холестатичному ураженні печінки.
Примітки: 1 – контроль, 2 – холестаз, 3 – холестаз+L-аргінін, 4 – холестаз+N-нітро-L-аргінін, 5 – холестаз+мелатонін.

при експериментальному внутрішньопечінковому холестази зумовлює незначне зменшення вмісту компонентів жовчі в сироватці крові — білірубину та холестерину. Вірогідно знижується активність маркерних ферментів ЛФ, АЛАТ. Про пригнічення процесів ліпопероксидації свідчить вірогідне зниження вмісту ГПЛ та ТБК в гомогенатах печінки (на 15% та 18% відповідно) (рис. 2), спостерігається тенденція до нормалізації показників антиоксидантного захисту (СОД, КАТ, Г-SH). Активність ферментів тканинного дихання СДГ та ЦХО зростає в порівнянні з ураженням. Разом із тим концентрація NO_2^- , NO_3^- та сечовини в сироватці крові не знижується, а навіть зростає.

Введення неселективного блокатора NO -синтази N -нітро- L -аргініну при CCl_4 -гепатиті не призводить до вірогідного зниження активності АсАТ порівняно з попередньою групою тварин, а АЛАТ надалі зростає в 1,2 рази. Вірогідно знижується концентрація стабільного метаболіту оксиду азоту NO_2^- в сироватці крові (в 1,4 рази). Відмічено подальше зниження активності КАТ (на 24%) у печінці. Активність КАТ та церулоплазміну крові, СОД, вміст Г-SH у печінці вірогідно не змінюються. Спостерігається тенденція до зростання активності мітохондріальних ферментів СДГ та ЦХО та вмісту продуктів ПОЛ у печінці (рис. 1). Вміст сечовини достовірно зростає на 16% порівняно з ураженням і перевищує показники контрольної групи тварин на 57%.

Встановлено, що при повторному введенні антиоксиданта та селективного блокатора і(NOS) мелатоніну в крові щурів з гострим гепатитом вірогідно знижується вміст NO_2^- на 38%. Це супроводжується пригніченням процесів ПОЛ. Встановлено вірогідне зменшення вмісту ГПЛ та ТБК в ураженому органі та сироватці крові. Про активацію системи антиоксидантного захисту свідчить зростання активності КАТ на 38% у печінці, зниження КАТ та церулоплазміну на 24% та 14% у сироватці крові, спостерігається тенденція до зростання СОД у печінці. Вміст Г-SH зростає на 37%. Мелатонін інгібує утворення пероксинітриду — токсичного оксиданта, який утворюється за участю оксиду азоту та супероксид-аніону в умовах патології [7, 8]. Про покращення функціонального стану печінки за введення препарату свідчить також вірогідне зниження у сироватці крові активності АЛАТ та АсАТ (на 33% та 29% відповідно). Введення мелатоніну попереджувало пригнічення мітохондріального дихання, яке виникало за умов ураження. Так,

активність ферментів мітохондрій СДГ, ЦХО у печінці зростала на 15% та 13% відповідно. Концентрація сечовини в сироватці крові знижується в 1,3 рази, порівняно з ураженням. Встановлено, що при введенні мелатоніну при холестатичному ураженні вірогідно знижується активність маркерних ферментів ЛФ, АЛАТ, АсАт. У крові також дещо зменшується вміст холестерину та білірубину. Застосування препарату призводить до зниження вмісту кінцевих продуктів метаболізму оксиду азоту NO_2^- і NO_3^- та концентрації сечовини в сироватці. Це супроводжується пригніченням процесів ПОЛ, на що вказує вірогідне зменшення вмісту ГПЛ та ТБК (рис. 2), зниження активності КАТ і СОД у печінці та вмісту церулоплазміну в сироватці крові.

ВИСНОВКИ

1. L -аргінін при його повторному введенні проявляє більш виражений гепатопротективний ефект при експериментальному токсичному гепатиті, ніж при холестази.

2. N -нітро- L -аргінін призводить до погіршення стану печінки при CCl_4 -гепатиті та внутрішньопечінковому холестази, що, ймовірно, зумовлено його інгібуючим впливом речовини як на індукцибельну, так і на конститутивну ізоформи NO -синтази.

3. Зважаючи на той факт, що при гострому токсичному та холестатичному ураженнях печінки позитивний вплив на її функціонально-метаболический стан відмічений у мелатоніну, можна припустити, що одним з головних моментів патогенезу уражень є експресія індукцибельної NOS. Відповідно, позитивний вплив мелатоніну на стан печінки пов'язаний не лише з його антиоксидантними властивостями, а також зі здатністю пригнічувати активність тільки даної ізоформи ферменту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гранік В.Г. Метаболизм L -аргинина // Химико-фармацевт. журнал. — 2003. — Т.37, №3. — С. 3-20.
2. Губский Ю.И. Коррекция химического поражения печени. — К.: Здоров'я, 1989. — 168 с.
3. Круглова О.В., Декалюк И.В. Влияние глутаргина на уровень средних молекул и показатели перекисного окисления липидов у больных с хроническими гепатитами невирусной этиологии / Мат. наук.-практ. конференції «Глутаргін — нові принципи фармакотерапії захворювань печінки». — Харків, 2003. — С. 45-48.
4. Меркулова Ю.В., Белостоцкая Л.И., Вертяева О.И. и соавт. Глутамат аргинина при остром токсическом гепатите // Провізор. — 1997. — №5. — С. 18-19.

5. Одынец А.Г., Берзиня Д.А., Кожухов А.Н. Методологические аспекты скрининга гепатопротекторов с использованием моделей поражения печени четыреххлористым углеродом, D-галактозамином и α -нафтилизотиоцианатом // Успехи гепатологии. — 1988. — №14 — С. 255-237.
6. Хаценко О.О. Взаимодействие оксида азота и цитохрома P-450 в печени // Биохимия — 1998. — Т.63, вып.6. — С. 984-991.
7. Cuzzocrea S., Zingarelli B., Gilad E. et al. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced model of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity // J. Pineal. Res. — 1997. — №2. — P. 106-116.
8. Gilad E., Cuzzocrea S., Zingarelli B. et al. Melatonin is a scavenger of peroxynitrite // Life Sci. — 1997. — Vol. 60 (10). — P. 169-174.
9. Heinzl B., John M., Klatt P., Bohme E., Mayer B. Ca_2^+ /Calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase // Biochem. J. — 1992. — Vol. 281 — P. 627.
10. Kim Y.M., De Vera M.E., Watkins S.C. et al. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression // J. Biol. Chem. — 1997. — Vol. 272 — P. 1402-1411.
11. McNaughton L., Puttagunta L., Martinez-Cuesta M.A. et al. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver / Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Vol. 99 (26) — P. 17161-17166.
12. Laskin J.D., Heck D.E., Gardner C.R., Laskin D.L. Prooxidant and antioxidant functions of nitric oxide in liver toxicity // Antioxid. Redox. Signal. — 2001. — №2. — P. 261-71.
13. Liu J., Li C., Waalkes M.P. et al. The nitric oxide donor, V-PYRRO/NO, protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice // Hepatology. — 2003. — Vol. 37. — P. 324-333.
14. Ma T.T., Ischiropoulos H., Brass C.A. Endotoxin-stimulated nitric oxide production increases injury and reduces rat liver chemiluminescence during reperfusion // Gastroenterology. — 1995. — Vol. 108. — P. 463.
15. Miller M.R., Megson I.L. Recent developments in nitric oxide donor drugs // British Journal of Pharmacology. — 2007. — Vol.151. — P. 305-321.
16. Moncada S., Higgs E.A. Mechanism of disease: the L-arginine oxide pathway // New Engl. J. Med. — 1993. — Vol. 329. — P. 2002-2012.
17. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology // Pharmacol. Rev. — 1991. — Vol. 43. — №2 — P. 109-142.
18. Negre-Salvayre A., Coatrieux C., Ingueneau C., Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors // British Journal of Pharmacology. — 2007. — Vol. 151 — P. 1-15.
19. Ochoa J.B., Billiar T.R., Peitzman A.R. The role of nitric oxide in hemorrhagic shock and trauma shock, sepsis and organ failure nitric oxide / Eds: G.Schag, H.Redl. — Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. — P. 84-101.
20. Salvemini D., Misko T.P., Masferrer J.L. et al. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1993. — Vol. 90. — P. 7240-7244.
21. Sarela A.I., Mihaimeed F.M.A., Batten J.J., Davidson B.R., Mathie R.T. Hepatic and splanchnic nitric oxide activity in patients with cirrhosis // Gut — 1999. — Vol. 44. — P. 749-753.
22. Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity // Toxicol. Lett. — 2003. — №11. — P. 105-112.
23. Takemura, S., Y. Minamiyama, Inoue M. et al. Nitric oxide synthase inhibitor increases hepatic injury with formation of oxidative DNA damage and microcirculatory disturbance in endotoxemic rats // Hepatogastroenterology. — 2000. — Vol. 47. — P. 1364-1370.
24. Tanaka N., Takana K., Nagashima Y. et al. Nitric oxide increase hepatic arterial blood flow in rats with carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury // Gastroenterology. — 1999. — Vol. 117. — №1. — P. 173-178.
25. Taylor, B.S., Alarcon L.H., Billiar T.R. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function // Biochemistry (Mosc.). — 1998. — Vol. 63. — P. 766-781.

А.М.Олещук. Применение модуляторов синтеза оксида азота при токсическом и холестатическом поражениях печени. Тернополь, Украина.

Ключевые слова: печень, гепатит, холестаза, L-аргинин, мелатонин, N-нитро-L-аргинин.

Изучено влияние L-аргинина, N-нитро-L-аргинина и мелатонина при их повторном введении на показатели функционального состояния печени при токсическом гепатите и холестазе. Установлено, что гепатопротекторный эффект L-аргинина проявляет более выраженный эффект при остром гепатите, нежели при холестазе. Мелатонин, а не N-нитро-L-аргинин, улучшает метаболические процессы в пораженном органе как при холестазе, так и при токсичном гепатите.

O.M.Oleschuk. The use of modulators of nitric oxide synthesis in toxic and cholestatic liver disease. Ternopil, Ukraine.

Key words: liver, hepatitis, cholestasis, L-arginine, melatonin, N-nitro-L-arginine.

The influence of L-arginine, N-nitro-L-arginine and melatonin on the functional status of the liver in toxic hepatitis and cholestasis. It was found that the hepatoprotective effect of L-arginine exhibits a more pronounced effect in acute hepatitis than in cholestasis. Melatonin, but not N-nitro-L-arginine, improves metabolic processes in the affected organ as in cholestasis and during toxic hepatitis.

Надійшла до редакції 09.11.2010 р.