

## Аміногуанідин при внутрішньопечінковому холестази

О.М.Олещук

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я.Горбачевського»,  
кафедра фармакології з клінічною фармакологією  
Тернопіль, Україна

Вивчали вплив селективного інгібітора індуцибельної NO-синтази аміногуанідину на функціональний стан печінки при експериментальному внутрішньопечінковому холестази, викликаному  $\alpha$ -нафтилізотіоціанатом. Встановлено, що повторне введення аміногуанідину при  $\alpha$ -нафтилізотіоціанатіндукованому холестази призводить до деякого покращання функціонального стану ураженого органа, яке проявляється зниженням активності маркерних ферментів цитолізу і холестази, рівня оксиду азоту в сироватці крові, пригніченням процесів перекисного окислення ліпідів, спостерігається тенденція до відновлення структурно-функціональної організації печінкової часточки, зменшення гістологічних проявів токсичного ураження та холестази.

**Ключові слова.** печінка,  $\alpha$ -нафтилізотіоціанат, холестази, оксид азоту, аміногуанідин.

### ВСТУП

Провідну роль у розвитку патологічного процесу відіграють активні форми кисню: супероксидний аніон-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), гідроксильний радикал, оксид азоту (NO), які мають неспарений електрон і є надзвичайно реакційноздатними [1]. За фізіологічних умов відбувається знешкодження утворених вільнорадикальних продуктів клітинними та позаклітинними антиоксидантними системами (АОС). Однак, коли інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) переважає над здатністю АОС компенсувати вплив надмірної кількості вільних радикалів, як це простежується за різних патологічних станів,

зокрема при холестази, вільні радикали починають взаємодіяти з макромолекулами клітин, пошкоджуючи їх. Зростання вмісту NO значно підвищує ефект вільнорадикального окислення за рахунок утворення при взаємодії з  $O_2^{\cdot-}$  потужного оксиданта – пероксинітриду ( $NOO^{\cdot}$ ), який проявляє цитотоксичну дію [20]. Тому виникає нагальна потреба пошуку нових фармакологічно активних речовин, здатних коригувати розвиток патологічного процесу шляхом послаблення токсичної дії вільних радикалів кисню й азоту за умов ураження печінки. З огляду на це надзвичайно перспективним є застосування інгібіторів NO-синтаз (NOS) селективної дії, які пригнічують передусім індуцибельну форму ферменту, яка активується за умов ураження. Аміногуанідин (AG) позиціонується як високоселективний інгібітор індуцибельної NOS (iNOS) [19]. Раніше нами було показано, що за введення  $\alpha$ -нафтилізотіоціанату (АНІТ) розвивається внутрішньопечінковий стаз жовчі, і така експериментальна модель холестази дозволяє вивчити характер порушень, які розвиваються в гепатоцитах, і компенсаторні механізми при спонтанному відновленні функції печінки [12].

Метою дослідження було вивчити вплив аміногуанідину на функціональний стан печінки за умов експериментального внутрішньопечінкового холестази.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на 18 білих щурах-самцях масою 170-210 г. Холестатичне ураження печінки моделювали введенням АНІТ одноразово (0,1 г/кг) [11]. AG вводили щоденно повторно інтраперитонеально в дозі 10 мг/кг протягом 4 днів, вперше через 6 год. після введення токсичного агента. Дослідження проводили на 5 добу від початку

експерименту. У гомогенатах печінки визначали вміст ТБК-активних продуктів (ТБП) [2], гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) [4], кількість відновленого глутатіону (G-SH) [18], лактату та пірувату [9], активність супероксиддисмутази (СОД) [14], каталази (КАТ) [10], сукцинатдегідрогенази (СДГ) [5], цитохромоксидази (ЦХО) [13], а також N-деметилазну та р-гідроксилазну активність мікросом печінки [6]. У сироватці крові визначали активність Алат та АсАт, лужної фосфатази (ЛФ), КАТ [10], вміст ТБП [2], церулоплазміну [7], стабільних метаболітів NO<sup>•</sup> – NO<sub>2</sub><sup>-</sup> та NO<sub>3</sub><sup>-</sup> [8, 15], сечовини, білірубину, холестерину, жовчних кислот. Усі отримані результати були оброблені методом варіаційної статистики з використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA за допомогою програми Originpro 7.5. Мікроскопічно оцінювали загальну картину структур печінки на гістопрепаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином [3], що дозволяє вивчити характер і глибину морфологічних змін.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При холестатичному ураженні печінки, викликаному АНІТ, на 5 добу експерименту спостерігали підвищення активності маркерного ферменту холестази — лужної фосфатази на 166,9% у порівнянні з контрольною групою досліджуваних тварин. Активність ферментів цитолізу Алат, АсАт зростала у 3,5 та 2,2 разу відповідно порівняно з контролем. Також спостерігалось збільшення вмісту компонентів жовчі в сироватці крові: рівень загального білірубину зростав на 188,5%, холестерину та жовчних кислот на 218,2% та 496,8% відповідно в порівнянні з контрольною групою тварин (табл. 1).

Введення АНІТ призвело до посилення процесів вільнорадикального окислення ліпідів та накопичення молекулярних продуктів ПОЛ. Зокрема, рівень ГПЛ у тканині печінки зростав на 68,2%, ТБП — на 64,3%, у сироватці крові останній показник був достовірно вищим за контрольний на 36,6%. Активація ПОЛ суп-

ТАБЛИЦЯ 1

Біохімічні показники сироватки крові при введенні аміногуанідину при холестазі (5 день) (M±m, n=6)

| Показники                       | Групи тварин |                         |  |
|---------------------------------|--------------|-------------------------|--|
|                                 | Контроль     | АНІТ                    | АНІТ + АГ  |
| Алат, ммоль/(л*год.)            | 0,57±0,02    | 2,00±0,06<br>p<0,001    | 1,74±0,04<br>p<0,001<br>p <sub>1</sub> <0,05     |
| АсАт, ммоль/(л*год.)            | 1,76±0,09    | 3,87±0,18<br>p<0,001    | 3,28±0,14<br>p<0,001<br>p <sub>1</sub> <0,05     |
| Лужна фосфатаза, ммоль/(л*год.) | 2,42±0,03    | 6,46±0,09<br>p<0,001    | 5,18±0,05<br>p<0,001<br>p <sub>1</sub> <0,001    |
| Білірубін, мкмоль/л             | 9,20±0,53    | 26,55±0,84<br>p<0,001   | 23,23±0,80<br>p<0,001<br>p <sub>1</sub> <0,05    |
| Холестерин, ммоль/л             | 2,62±0,13    | 8,34±0,35<br>p<0,001    | 7,05±0,28<br>p<0,001<br>p <sub>1</sub> <0,05     |
| Жовчні кислоти, ммоль/л         | 226,04±4,57  | 1349,0±33,70<br>p<0,001 | 838,54±76,70<br>p<0,001<br>p <sub>1</sub> <0,001 |
| Сечовина ммоль/л                | 4,40±0,14    | 3,10±0,20<br>p<0,01     | 3,85±0,13<br>p<0,05<br>p <sub>1</sub> <0,05      |
| Церулоплазміл, мг/л             | 227,50±3,50  | 427,29±8,36<br>p<0,001  | 332,50±7,42<br>p<0,001<br>p <sub>1</sub> <0,001  |

**Примітки:** p — достовірність відносно контролю; p<sub>1</sub> — достовірність відносно групи тварин з АНІТ.

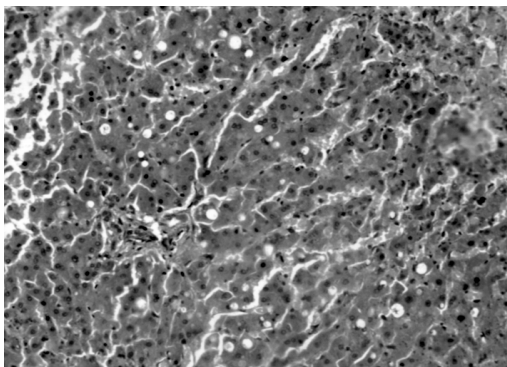


Рис. 1. Гістологічні зміни структури печінки при внутрішньопечінковому холестазі, викликаному *α*-нафтилізотіоціанатом, на 5 добу експерименту. Забарвлення гематоксиліном та еозином. *x160*.

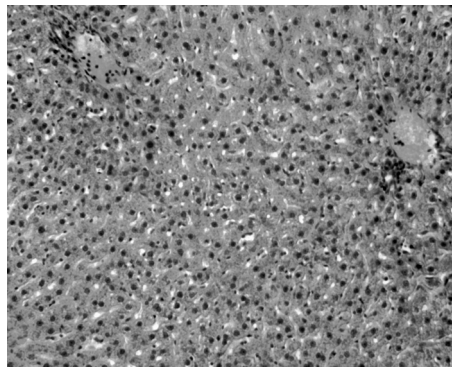


Рис. 2. Гістологічна структура печінкової часточки при моделюванні холестазу та використанні аміногуанідину. Забарвлення гематоксиліном та еозином. *x160*.

роводжується зміною активності та рівня компонентів ферментативної та неферментативної ланок АОС.

Рівень церулоплазміну зростав на 87,8% порівняно з інтактними тваринами. Спостерігалось підвищення активності КАТ у сироватці крові на 38,2%, у той час як у печінці показник знижувався на 33,6%. Рівень G-SH зростав на 32,9% з одночасним зниженням активності СОД у печінці на 60,0% (табл. 2). Зростання рівня небілкових сульфгідрильних груп може бути причиною або сприяти токсичності АНІТ [17]. Відомо, що в процесі детоксикації в гепатоцитах АНІТ зв'язується з G-SH і транспортується білком MRP2 у жовч, де відділяється від останнього. У вільному стані АНІТ вибірково руйнує епітеліальні клітини жовчних протоків і є причиною холангіту та в подальшому внутрішньопечінкового холестазу [16]. Про порушення процесів мітохондріального дихання за даної моделі холестазу свідчить зниження активності мітохондріальних ферментів СДГ та ЦХО на 29,5% та 23,8% відповідно у порівнянні з контрольною групою тварин.

Встановлено, що АНІТ-індукований холестаза супроводжується зміною рівня стабільних метаболітів NO нітрит- та нітрат-аніону. Так, вміст  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  у сироватці крові зростав на 76,0% та 11,0%, а у печінці знижувався на 21,9% та 22,1% відповідно. Вміст сечовини, яка є кінцевим продуктом аргіназного шляху метаболізму L-аргініну та маркерним показником функції нирок і печінки, знижувався на 29,5%. Рівень лактату в групі тварин з модельованим АНІТом холестазом зростав на 46,9%, а пірувату знижувався на 44,4%, що вказує на порушення білкового обміну при даному виді ураження печінки. N-деметилазна та р-гідроксилазна активність мікросом печінки знижувалась на

16,5% та 16,4% відповідно до контрольної групи тварин, що вказує на порушення детоксуючої здатності печінки, а саме зниження активності ізоформ цитохрому P450 2E1 та 3A.

Результати біохімічних досліджень підтверджуються гістологічними даними. На 5 добу експерименту поліморфноклітинна інфільтрація портальних ділянок була слабо вираженою. Більшість жовчних протоків містили компоненти жовчі, мали чіткі контури та епітеліальну вистилку. В окремих міжчасточкових жовчних протоках спостерігалось потовщення стінки за рахунок формування сполучної тканини (рис. 1). Окремі некротизовані гепатоцити поступово заміщувалися грануляційною тканиною. У частині гепатоцитів, які локалізувались в основному в перипортальних ділянках, спостерігалась гіпертрофія, яка проявлялась збільшенням розмірів клітин та гіперхромністю ядер. Таким чином, результати наших досліджень вказують на те, що введення АНІТ спричиняє розвиток ознак внутрішньопечінкового холестазу та дистрофічно-некротичних змін у печінці [12], разом з тим на 5 день експерименту з'являються ознаки відновлення структурної організації печінки зі зменшенням проявів стазу жовчі, некротизована тканина починає заміщуватись сполучною.

Повторне введення селективного інгібітора iNOS — AG частково усувало токсичний та холестатичий ефект АНІТ, на що вказувало зниження активності АлАТ, АсАТ та лужної фосфатази на 12,9%, 15,1% та 19,7% відповідно у порівнянні з нелікованими тваринами. Вміст білірубину, холестерину та жовчних кислот у сироватці крові був нижчим на 12,5%, 15,4% та 37,8% відповідно (табл. 1).

Вміст  $\text{NO}_2^-$  у сироватці крові та печінці знижувався на 37,0% та 20,0%, а  $\text{NO}_3^-$  у сироватці

ТАБЛИЦЯ 2

**Показники ліпопероксидації та стану антиоксидантної системи при введенні аміногуанідину при холестазі (5-й день) (M±m, n=6)**

| Показники                  | Групи тварин |                       |  |
|----------------------------|--------------|-----------------------|--|
|                            | Контроль     | ANIT                  | ANIT + AG                                    |
| ГПЛ (печінка), ум.од./кг   | 3,25±0,19    | 5,47±0,11<br>p<0,001  | 5,27±0,07<br>p<0,001<br>p <sub>1</sub> >0,05 |
| ТБП (печінка), мкмоль/кг   | 2,99±0,12    | 4,91±0,12<br>p<0,001  | 3,63±0,12<br>p<0,01<br>p <sub>1</sub> <0,001 |
| ТБП (кров), мкмоль/кг      | 1,75±0,07    | 2,39±0,05<br>p<0,001  | 2,29±0,04<br>p<0,001<br>p <sub>1</sub> >0,05 |
| Каталаза (печінка), кат/кг | 4,50±0,10    | 2,99±0,10<br>p<0,001  | 3,40±0,19<br>p<0,01<br>p <sub>1</sub> >0,05  |
| Каталаза (кров), кат/л     | 14,14±0,59   | 19,54±0,44<br>p<0,001 | 17,42±0,43<br>p<0,01<br>p <sub>1</sub> <0,05 |
| СОД (печінка), ум.од./кг   | 5,21±0,29    | 2,09±0,13<br>p<0,001  | 2,97±0,26<br>p<0,01<br>p <sub>1</sub> <0,05  |
| G-SH, ммоль/кг             | 3,74±0,20    | 4,98±0,23<br>p<0,01   | 4,89±0,26<br>p<0,05<br>p <sub>1</sub> >0,05  |

крові — на 22,8%. У печінці вміст NO<sub>3</sub> зростав на 21,4% відповідно. Рівень сечовини зростав на 24,2%.

Пригнічення AG активності iNOS веде до зменшення утворення NO та, відповідно, його перетворення в пероксинітрит та інші вільно-радикальні сполуки. Рівень ТБП у печінці при введенні досліджуваного агента знижувався на 26,1% і спостерігалася тенденція до зменшення цього показника в крові. Активність КАТ у сироватці крові була нижчою, ніж у групі тварин, які отримували ANIT, на 10,8%. Активність СОД у печінці зростала на 42,5%. Вміст церулоплазміну знижувався на 45,7%. Зазначені результати вказують на деяке відновлення захисних механізмів АОС при введенні AG. Частково відновлювалися й енергетичні процеси в мітохондріях гепатоцитів, на що вказує зростання активності СДГ на 11,1%, хоча активність ЦХО вірогідно не змінювалася. Про деяке відновлення білкового обміну свідчить зниження вмісту лактату на 44,0% та зростання концентрації пірувату на 39,0% у гомогенатах печінки в порівнянні з групою тварин без корекції.

Результати проведених досліджень свідчать, що інгібування iNOS за умов холестази призводить лише до часткового відновлення метаболічних процесів та функціонального стану печінки.

При гістологічному дослідженні тканини печінки тварин при моделюванні холестази та застосуванні AG нами виявлено, що трабекулярна структура печінкової часточки була збереженою. Центральні вени були значно розширеними та виповнені еритроцитами (рис. 2).

Просвіти синусоїдів звужувались та були вільними від еритроцитів у централобулярних ділянках і звуженими та густо насиченими макрофагами в центральних та периферичних ділянках печінкової часточки. Портальні тракти розширювались за рахунок клітинних інфільтратів та повнокрів'я судин. У жовчних протоках портальних трактів спостерігали явище проліферації внутрішньопотокових епітеліоцитів, без ознак внутрішньопотокового холестази. В окремих полях зору просвіти жовчних протоків були розширеними та помірно інфільтрованими компонентами жовчі та клітинними інфільтратами.

Гепатоцити залишались збереженими лише в централобулярних ділянках печінкової часточки. Клітини центральної та периферичної ділянки печінкової часточки мали блідо-еозинофільну дрібнозернисту цитоплазму, місцями відділену від оболонки клітини світлим обідком, та частково зміщене на периферію ядро (рис. 2).

Під впливом AG при експериментальному внутрішньопечінковому холестазі покращується



ся структурно-функціональна організація печінкової часточки, зменшуються прояви токсичного ураження та холестаза, при цьому має місце зростання макрофагальної активності в синусоїдальних просторах та дистрофічні зміни в гепатоцитах центральної та перипортальних зон.

## ВИСНОВКИ

Повторне введення АГ при внутрішньопечінковому холестазі призводить до часткового покращення морфофункціонального стану ураженого органа, яке проявляється в зниженні активності маркерних ферментів цитолізу і холестаза, рівня оксиду азоту в сироватці крові, пригнічені процеси ПОЛ, тенденції до відновлення активності антиоксидантних ферментів у печінці, покращенні структурно-функціональної організації печінкової часточки.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Активні форми кисню та їх роль у метаболізмі клітин / М.І.Колісник, Г.В.Колісник, Є. Нідзюлка [та ін.] // Біологія тварин. — 2009. — Т.11, №1-2. — С. 59-70.
2. Андреева Л.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И.Андреева, Л.А.Кожемякин, А.А.Кишкун // Лаб. дело. — 1988. — №11. — С. 41-43.
3. Волкова О.В. Основы гистологии с гистологической техникой / О.В.Волкова, Ю.К.Елецкий. — М.: Медицина, 1982. — 304 с.
4. Гаврилов В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В.Б.Гаврилов, М.И.Мишкорудная // Лаб. дело. — 1983. — №3. — С. 33-35.
5. Ещенко Н.Д. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы / Н.Д.Ещенко, Г.Г.Вольский // Методы биохимических исследований. — Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1982. — С. 207-212.
6. Карузина И.И. Выделение микросомной фракции печени и характеристика ее окислительных систем / И.И.Карузина, А.И.Арчаков / В кн.: Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С. 49-62.
7. Колб В.Г. Справочник по клинической химии / В.Г.Колб, В.С.Камышников. — Минск: Беларусь, 1982. — 311 с.
8. Кіселик І.О. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології / І.О.Кіселик, М.Д.Луцик, Л.Ю.Шевченко // Лабораторна діагностика. — 2001. — №3. — С. 43-45.
9. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М.И.Прохоровой. — Л., 1982. — 272 с.
10. Метод определения активности каталазы / М.А.Королюк, Л.И.Иванова, И.Г.Майорова [и др.] // Лаб. дело. — 1988. — №1. — С. 16-19.
11. Одынец А.Г. Методологические аспекты скрининга гепатопротекторов с использованием моделей поражения печени четыреххлористым углеродом, Д-галактозаминоном и  $\alpha$ -нафтилизотиоцианатом / А.Г.Одынец, Д.А.Берзиня, А.Н.Кожухов // Успехи гепатологии. — В. 14 — Рига, 1988. — С. 255-237.
12. Олещук О.М. Особливості гістологічних змін печінки при холестазі, викликаному  $\alpha$ -нафтилизотиоцианатом // О.М.Олещук, Т.В.Дацко // Вісник морфології. — 2011. — Т.17 (1). — С. 103-106.
13. Современные методы в биохимии / Под ред. акад. АМН СССР В.Н.Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — 390 с.
14. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С.Чевари, И.Чаба, И.Секей // Лаб. дело. — 1985. — №11. — С. 678-684.
15. Analysis of nitrate, nitrite and [ $^{15}\text{N}$ ] nitrate in biological fluids / L.C.Green, A.W.Davie, J.Glogowski [et al.] // Analyt. Biochem. — 1982. — Vol. 126. — №1. — P. 131-138.
16. ANIT-Induced Intrahepatic Cholestasis Alters Hepatobiliary Transporter Expression via Nrf2-Dependent and Independent Signaling / Yuji Tanaka, Lauren M. Aleksunes, Yue Julia Cui, Curtis D. Klaassen // Toxicological sciences. — 2009. — Vol. 108 (2). — P. 247-257.
17. Dahm L.J. Protection against alpha-naphthylisothiocyanate-induced liver injury by decreased hepatic non-protein sulfhydryl content // L.J.Dahm, R.A.Roth // Biochem Pharmacol. — 1991 — №42 (6). — P. 1181-1188.
18. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L.Ellman // Arch. Biochem. Biophys. — 1959. — №82. — P. 70-77.
19. Nilsson B.O. Biological effects of aminoguanidine: An update / B.O.Nilsson // Inflammation Res. — 1999. — №48. — P. 509-515.
20. Nitric oxide: biology and pathobiology / edited by Louis J. Ignarro. — San Diego, Calif.; London: Academic, 2000. — 900 p.

**А.М.Олещук. Аминогуанидин при внутріпечінковому холестазі. Тернополь, Україна.**

**Ключевые слова:** печень,  $\alpha$ -нафтилизотиоцианат, холестаз, оксид азота, аминогуанидин.

*Изучали влияние селективного ингибитора индуцибельной NO-синтазы аминогуанидина на функциональное состояние печени при экспериментальном внутріпечінковому холестазі, вызванном  $\alpha$ -нафтилизотиоцианатом. Установлено, что повторное введение аминогуанидина при  $\alpha$ -нафтилизотиоцианатиндуцированном холестазі приводит к некоторому улучшению функционального состояния пораженного органа, которое проявляется в снижении активности маркерных ферментов цитоліза и холестаза, уровня оксид азота в сыворотке крови, угнетении процессов перекисного окисления липидов, тенденции к восстановлению структурно-функциональной организации печеночной частицы, уменьшению гистологических проявлений токсического поражения и холестаза.*

**O.M.Oleshchuk. Aminoguanidine at intrahepatic cholestasis. Ternopil, Ukraine.**

**Key words:** liver, *α*-nafilizothiocyanat, cholestasis, nitric oxide, aminoguanidine.

The effect of selective inhibitor of inducible NO-synthase aminoguanidine on the functional liver state at experimental intrahepatic cholestasis induced by *α*-nafilizothiocyanat was studied. It was found that repeated administration of aminoguanidine at *α*-naf-

tilizothiocyanat-induced cholestasis leads to partial improvement of the affected organ functional state, which manifests in reducing the activity of marker enzymes of cytolysis and cholestasis, levels of nitric oxide in the blood serum, inhibition of lipid peroxidation, the tendency to restore the structural and functional organization of the hepatic particles, reduce the histological manifestations of toxic injury and cholestasis.

Надійшла до редакції 21.06.2012 р.