

© О.М.Олещук, К.А. Посохова, Н.Є. Лісничук, А.Є.Мудра

УДК 616.36-004.001.4-032:615.31:546.17]-092.9

О.М.Олещук, К.А. Посохова, Н.Є. Лісничук, А.Є.Мудра

МОДУЛЯЦІЯ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦИРОЗІ

Тернопільський державний медичний університет
імені І.Я. Горбачевського (м. Тернопіль)

Дана робота є фрагментом НДР, № держ. реєстрації 0110U003642.

Вступ. Цироз печінки (ЦП) займає четверте місце серед основних причин смертності хворих у віці після 40 років. Відомо, що при ЦП виникають порушення системної гемодинаміки, у формуванні яких провідну роль відіграє оксид азоту (NO) – високореактивний вільний радикал, що синтезується за допомогою групи ензимів NO-синтаз з амінокислоти L-аргінін. [18,19]. Ще в 1991 році Valance and Moncada [23] першими висловили припущення, що NO може бути відповідальним за гіпердинамічні зміни при цирозі печінки. Згідно їх гіпотези, гіперпродукція NO при ЦП пов'язана зі зростаннями ендотоксемії, що прямо або опосередковано через систему цитокінів стимулює синтез оксиду азоту. Очевидно це зумовлено активацією індуктибельної NO-синтази [15]. Разом з тим, інші дослідження вказують на зниження синтезу NO при ЦП. Так, Sarela і співавт. (1999) продемонстрували зниження активності конститутивної NO-синтази в печінці у пацієнтів з ЦП [16]. А застосування інгібіторів синтезу NO не призводило до покращення стану пацієнтів та експериментальних тварин при ЦП [13,22].

Метою нашого дослідження стало вивчення функціонального стану печінки при цирозі на фоні активації та пригнічення синтезу оксиду азоту. Експериментальне циротичне ураження печінки моделювали пероральним введенням CCl₄ в дозі 2 г/кг 2 рази на тиждень впродовж 3 місяців [21]. В якості модюляторів NO використовували попередник синтезу NO L-аргінін та неселективний блокатор NOS N-нітро-L-аргінін (L-NAME) внутрішньоочередово повторно впродовж 7 днів в дозі 25 та 10 мг/кг маси тіла відповідно після завершення моделювання ЦП.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проведено на 24 білих щурах-самцях лінії Wistar масою 170-210 г. Маніпуляції з тваринами проводили відповідно до правил "Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних і інших наукових цілей" (м. Страсбург, 1985 р.). У сироватці крові за допомогою стандартних наборів реактивів "Human" (Німчинна) визначали активність ферментів цитолізу та холестази (АлАТ, АсАТ, лужної фосфатази (ЛФ)), вміст сечовини. У сироватці крові визначали вміст кінцевих продуктів метаболізму оксиду азоту: NO₂- та NO₃- [5, 11], вміст церулоплазміну [6], лактату, пірувату [7]. Про активність процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та стан антиоксидантної системи (АОС) судили за вмістом у гомогенатах печінки

ТБК-активних продуктів (ТБП) [1], гідроперексидів ліпідів (ГПЛ) [2], відновленого глутатіону (GSH) [12], активності каталази (КАТ) [8], супероксиддисмутази (СОД) [10], сукцинатдегідрогенази (СДГ) [3] і цитохромоксидази (ЦХО) [9]. Визначали N-деметилазу та р-гідроксилазу активність мікросом печінки [4]. Імуноферментним методом за допомогою наборів реактивів USCN Life Science Inc. в сироватці та гепатоцитах визначали вміст ендотеліальної (eNOS) та індуктибельної (iNOS) NO-синтаз та прозапальних цитокінів IL-1β, IL-6 та ФНП-α. Всі отримані результати були оброблені методом варіаційної статистики з використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з допомогою програми Originpro 7.5.

Результати досліджень та їх обговорення. Результати наших досліджень показали, що ЦП супроводжується вірогідним, у порівнянні з контрольною групою тварин, зростанням активності АлАТ, АсАТ, ЛФ (у 3,4; 2,9; та 1,3 рази відповідно) (**табл. 1**). Відмічено вірогідне зростання вмісту лактату (в 1,1 рази) у сироватці крові. Про активацію ПОЛ свідчило зростання вмісту ТБП, ГПЛ, знижувалась активність каталази та СОД у печінці. Рівень церулоплазміну знижувався на 18,6 % порівняно з інтактними тваринами. Спостерігалось підвищення активності каталази у сироватці крові на 50,9 %, в той час як у печінці показник знижувався на 48,7 %. Рівень GSH знижувався на 40,4 % з одночасним зниженням активності СОД у печінці на 37,3 %. Вміст сечовини зменшувався на 33,3 %. Вірогідно знижувалася активність мітохондріальних ферментів ЦХО та СДГ. Встановлено, що у печінці знижувалася активність eNOS (**рис. 2**) та вміст NO₂- (**табл. 2**). Вміст iNOS зростав як у печінці, так і у сироватці крові (**рис. 2**). При цирозі вірогідно знижуються N-деметилазна та р-гідроксилазна активність мікросом печінки на 44,0 та 42,0 % відповідно. Вміст прозапальних цитокінів IL-1β, IL-6 та ФНП-α зростав в 4,0; 4,1 та в 5,8 рази відповідно порівняно з контролем (**рис. 1**).

Введення впродовж 7 днів L-аргініну при цирозі призводило до зниження активності АлАТ на 36,6 %, АсАТ – на 40,3 % порівняно з контролем. Рівень сечовини зростав на 47,8 %. Вміст церулоплазміну був вищим на 7,5 %, ніж при ураженні (**табл. 1**). Рівень ГПЛ знижувався на 16,2 %, ТБП у сироватці крові – на 20,2 %, у печінці – на 19,6 %. Спостерігалось деяке зниження активності КАТ у сироватці крові (на 9,7 %), в той час як у печінці цей показник зростав на 56,7 %. Вміст GSH підвищувався на 45,7 % у порівнянні з аналогічним показником у тварин із змодельованим цирозом. Активність мітохондріальних

Таблиця 1

Біохімічні показники сироватки крові за введення модуляторів синтезу NO при експериментальному цирозі ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Група тварин			
	Контроль	Цироз	Цироз + L-аргінін	Цироз + L-NAME
АлАТ, ммоль/(л·год)	0,47±0,11	1,59±0,06 p<0,001	1,10±0,09 p<0,01 p ₁ <0,001	1,78±0,03 p<0,001 p ₁ <0,001
АсАТ, ммоль/(л·год)	1,63±0,16	4,80±0,17 p<0,001	2,87±0,17 p<0,01 p ₁ <0,001	5,30±0,09 p<0,001 p ₁ <0,05
Лужна фосфатаза, ммоль/(л·год)	2,37±0,08	3,16±0,05 p<0,005	2,88±0,04 p<0,001 p ₁ <0,005	4,31±0,06 p<0,001 p ₁ <0,001
Сечовина, ммоль/л	5,03±0,12	3,35±0,13 p<0,001	4,95±0,07 p>0,05 p ₁ <0,001	2,95±0,10 p<0,001 p ₁ >0,05
Церулоплазмін, мг/л	239,17±3,85	194,69±4,24 p<0,001	209,27±3,13 p<0,001 p ₁ <0,05	172,81±4,24 p<0,001 p ₁ <0,05

Примітка: У цій і наступних таблицях достовірність відносно: p – контролю; p₁ – групи тварин з цирозом.

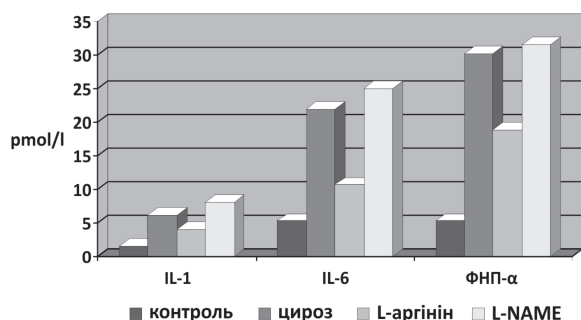


Рис. 1. Вміст прозапальних цитокінів у сироватці крові експериментальних тварин.

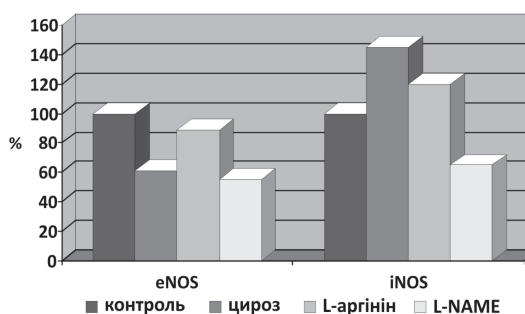


Рис. 2. Вміст eNOS та iNOS у гепатоцитах експериментальних тварин.

Таблиця 2

Вміст нітрат- та нітрит-аніону за введення модуляторів синтезу NO при експериментальному цирозі ($M \pm m$, $n=6$)

Серія дослідів	Показник			
	NO ₂ - (кров), мкмоль/л	NO ₂ - (печінка), мкмоль/кг	NO ₃ - (кров), мкмоль/л	NO ₃ - (печінка), мкмоль/кг
Контроль	1,23±0,06	2,20±0,15	10,02±0,11	8,75±0,26
Цироз	3,68±0,13 p<0,001	1,65±0,07 p<0,05	12,38±0,23 p<0,001	8,18±0,10 p>0,05
Цироз + L-аргінін	3,85±0,16 p<0,001 p ₁ >0,05	2,21±0,15 p>0,05 p ₁ <0,001	12,57±0,16 p<0,001 p ₁ >0,05	8,51±0,11 p>0,05 p ₁ >0,05
Цироз + L-NAME	2,18±0,15 p<0,01 p ₁ <0,001	0,75±0,06 p<0,001 p ₁ <0,001	6,75±0,10 p<0,001 p ₁ <0,001	6,16±0,02 p<0,001 p ₁ <0,001

ферментів СДГ та ЦХО у гомогенатах печінки зростала на 6,8 та 7,2 %. Вміст NO₂- у сироватці крові зростав на 213,6 %, а у печінці – на 33,8 %. Рівень NO₃- у крові та у печінці вірогідно не змінювався у порівнянні з аналогічним параметром у групі тварин з ЦП (**табл. 2**). Встановлено вірогідне підвищення вмісту eNOS в гепатоцитах. Рівень лактату знижувався на 9,2 %, а пірувату зростав на 66,3 %. Спостерігалось підвищення

N-деметилазної та p-гідроксилазної активності міросом печінки на 57,8 та 38,9 %. При застосуванні L-аргініну вміст прозапальних цитокінів вірогідно зменшувався (**рис. 1**).

Застосування неселективного блокатора NOS L-NAME при ЦП не сприяло покращанню функціонального стану печінки, а навпаки призводило до наростання проявів ураження печінки. Так, за щоденного впродовж 7 днів введення препарату активність АлАТ зростала на 12,0 %, АсАТ – на 10,4 % порівняно

з групою тварин з цирозом (табл. 1). Вміст сечовини не змінювався, а концентрація церулоплазміну знижувалася на 11,2 %. Рівень ТБП у печінці був вищим на 13,5 %, ніж у групі нелікованих тварин. Вміст NO₂- та NO₃- у сироватці крові знижувався на 40,9 та 45,4 % відповідно, у печінці – на 54,7 та 24,6 % відповідно (табл. 2). Вміст лактату зростав на 8,1 %. Активність мітохондріальних ферментів СДГ і ЦХО та пірувату залишалися на рівні ураження. Встановлено, що за введення препарату N-деметилазна та р-гідроксилазна активності мікосом печінки знижувалися на 32,9 та 33,0 % у порівнянні з контрольною групою тварин, що вказує на послаблення детоксуючої функції печінки.

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших науковців. Як відомо, у печінці NO утворюється під дією двох ізоформ - eNOS і iNOS. Картина експресії та активності білків NOS в здоровому органі і при патології різна [17]. При хронічних захворюваннях печінки спостерігається значне підвищення активності індукційної ізоформи NOS в зонах цирозу [16, 23]. Отож, високий рівень нітратів і нітритів у сироватці крові у хворих на цироз печінки та при експериментальних моделях імовірно зумовлений підвищеною концентрацією iNOS-залежного NO. З іншого боку, Rockey і Chung [20] виявили зниження активності конститутивної NOS у щурів з тетрахлорметановим цирозом на 75,0 %, що підтверджується результатами, представленими у даній роботі. Показано, що при цьому відбуваються глибокі зміни в клітинному розподілі eNOS, що призводить до її транслокації в ядра гепатоцитів [14]. Можна припустити, що у внутрішньопечінковій мікроциркуляції виникає парадоксальна ситуація: у крові, що притікає міститься величезна кількість NO, в той же час різко збільшений портальний приплив (венозний і артеріальний) створює великий тиск розтягування (shear stress) на стінку синусоїдів, що вимагає активації eNOS і вироблення оксиду азоту в ендотелії синусоїдів. Однак цього не відбувається. Найімовірніше, підвищена концентрація NO в крові, що притікає,

за механізмом зворотного зв'язку різко інгібує експресію eNOS. Розвивається дефіцит вазодилатації, індукованої eNOS, що сприяє зменшенню діаметру синусоїдів і збільшенню загальної портальної судинної резистентності. Таким чином, незважаючи на гіперпродукцію оксиду азоту виникає відносна недостатність медіатора на рівні внутрішньопечінкової мікроциркуляції [24]. Виходячи з вищезазначеного, зрозумілим є те, що застосування попередника синтезу NO сприяло покращанню стану печінки, а його блокування – наростанню проявів ураження.

Висновки.

1. Циротичне ураження печінки супроводжується зниженням вмісту ендотеліальної NOS, активацією ферментів цитолізу, холестази, процесів ліпопероксидації, порушенням стану антиоксидантного захисту, мітохондріального дихання та детоксуючої системи печінки.

2. Застосування попередника оксиду азоту L-аргініну при експериментальному цирозі призводить до покращання функціонального стану печінки, на що вказує зниження активності процесів ліпопероксидації, активація системи антиоксидантного захисту, зростання активності мітохондріальних та мікросомальних ферментів у печінці, які відбуваються на фоні збільшення вмісту eNOS та нітрат- і нітрит-аніону в гепатоцитах.

3. Блокування синтезу NO шляхом введення не-селективного блокатора N-нітро-L-аргініну при цирозі призводить до наростання проявів ураження та порушення функціонального стану печінки.

Перспективи подальших розробок. Встановлення ролі системи L-аргінін – оксид азоту у порушеннях функціонального стану печінки обґрунтовує необхідність подальшого пошуку та вивчення сполук – попередників синтезу оксиду азоту, здатних зменшувати прояви функціональних порушень печінки при її циротичному ураженні, покращувати динаміку перебігу у ній репаративних процесів, а також поліпшувати результати фармакотерапії даного захворювання.

Список літератури

1. 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.
2. Гаврилов В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В.Б. Гаврилов, М.И. Мишкорудная // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33-35.
3. 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.
4. 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.
5. Кіселик І.О. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферійній 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.
6. Колб В.Г. Справочник по клинической химии / В.Г. Колб, В.С. Камышников – Минск: Беларусь, 1982. – 311 с.
7. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М.И. Прохоровой. — Л., 1982. — 272 с.
8. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
9. Современные методы в биохимии / Под ред. акад. АМН СССР В.Н. Ореховича – М.: Медицина, 1977. – 390 с.
10. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, И. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678-684.
11. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids / L.C. Green, A.W. Davie, J. Glogowski et al. // Analyt. Biochem. – 1982. – Vol. 126, № 1. – P. 131-138.
12. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – № 82. – P. 70-77.

13. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats / T.K.Gupta, M.Toruner, M.K.Chung, R.J. Grossmann – *Hepatology*. – 1998. – V. 28. – P. 926–931.
14. Expression of inducible nitric oxide synthase in endotoxemic rat hepatocytes is dependent on the cellular glutathione status / Vos T.A., Van Goor H., Tuyt L. et al. // *Hepatology*. – 1999. – 29 (2). – P. 421–426.
15. Expression of inducible nitric oxide synthase in human gastric cancer / J.Yu, F.Guo, M.P.A. Ebert, P. Malfertheiner // *World J. Gastroenterol.* – 1999. – V.5. – P. 430–431.
16. Hepatic and splanchnic nitric oxide activity in patients with cirrhosis. // Sarela, A.I., F.M. Mihaimeed, J.J. Batten, et al. – *Gut* – 1999. – V. 44. – P. 749–753.
17. Hon W.M. Nitric oxide in liver disease: friend, foe, or just passerby? / W.M. Hon, K.H. Lee, H.E Khoo. // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2002. – V.962. – P. 275–295.
18. Kuo P.C. The emerging multifaceted roles of nitric oxide / P.C. Kuo, R.A. Schroeder // *Ann Surg.* – 1995. – V. 221. – P. 220–235.
19. Moncada S. The L-arginine-nitric oxide pathway / Moncada S., Higgs A. – *N. Engl. J. Med.* – 1993. – V. 329. – P. 2002–2012.
20. Rockey D.C. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension / Rockey D.C., Chung J.J. // *Gastroenterology* – 1998. – V. 114. – P. 344–351.
21. Systemic histopathology of rats with CCl₄-induced hepatic cirrhosis / K. Doi, S. Kurabe, N. Shimazu, M. Inagaki // *Laboratory Animals*. – 1991. – V. 25. – P. 21–25.
22. The effect of nitric oxide synthase inhibition on portal pressure and azygos blood flow in patients with cirrhosis / E.H. Forrest, A.J. Jones, J.F. Dillon, J. Walker et al. // *J. Hepatol.* – 1995. – V. 23. – P. 254–258.
23. Valance P. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role of nitric oxide? // Valance P., Moncada S. – *Lancet*. – 1991. – V. 337. – P. 776–778.
24. Wiest R. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough / R. Wiest, R.J. Grossmann // *Hepatology*. – 2002. – Feb;35(2). – P. 478–491.

УДК 616.36-004.001.4-032:615.31:546.17]-092.9

МОДУЛЯЦІЯ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦИРОЗІ

Олещук О.М., Посохова К.А., Лісничук Н.Є., Мудра А.Є.

Резюме. На моделі CCl₄-індукованого експериментального цирозу досліджували вплив системи L-аргінін – оксид азоту на функціональний стан печінки. Встановлено, що повторне введення попередника оксиду азоту L-аргініну при експериментальному цирозі призводить до покращення функціонального стану печінки, на що вказує зниження активності процесів ліпопероксидації, активація системи антиоксидантного захисту, зростання активності мітохондріальних та мікросомальних ферментів у печінці, що відбуваються на фоні зростання активності eNOS в гепатоцитах. Блокування синтезу NO шляхом введення неселективного блокатора N-нітро-L-аргініну при експериментальному цирозі печінки призводить до наростання проявів ураження та порушення функціонального стану печінки.

Ключові слова: оксид азоту, L-аргінін, N-нітро-L-аргінін, печінка.

УДК 616.36-004.001.4-032:615.31:546.17]-092.9

МОДУЛЯЦІЯ СИСТЕМИ ОКСИДА АЗОТА ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦИРРОЗІ

Олещук А.М., Посохова Е.А., Лісничук Н.Є., Мудра А.Є.

Резюме. На моделі CCl₄-індуцированого експериментального цирроза изучали влияние системы L-аргинин - оксид азота на функциональное состояние печени. Установлено, что применение предшественника синтеза оксида азота L-аргинина приводит к улучшению функционального состояния печени при экспериментальном циррозе, на что указывает снижение активности процессов липопероксидации, активация антиоксидантной защиты, митохондриальных и микросомальных ферментов в печени, что происходит на фоне роста концентрации eNOS в гепатоцитах. Блокирование синтеза NO путем введения неселективного блокатора N-нитро-L-аргинина приводит к нарастанию проявлений поражения и нарушения функционального состояния печени.

Ключевые слова: оксид азота, L-аргинин, N-нитро-L-аргинин, печень

UDC 616.36-004.001.4-032:615.31:546.17]-092.9

Modulation Of Nitric Oxide System In Experimental Cirrhosis

Oleshchuk O.M., Posokhova K.A., Lisnychuk N.Ye., Mudra A.Ye.

Summary. In the model of experimental CCl₄ cirrhosis influence of L-arginine-nitric oxide on the liver function was studied. It was established that administration of nitric oxide precursor L-arginine leads to improvement of the functional state of the liver in experimental cirrhosis that is indicated by the decrease of the lipid peroxidation activity, activation of the antioxidant defense system, mitochondrial and microsomal enzymes in the liver that is accompanied by increased concentration of eNOS in hepatocytes. Blocking of NO synthesis by non-selective blocker N-nitro-L-arginine leads to aggravation of disturbance and destruction of liver function.

Key words. Nitric oxide, L-arginine, N-nitro-L-arginine, liver.

Стаття надійшла 16.12.2011 р.