

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОПЕРЕДНИКІВ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ ПРИ ЦИРОЗІ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОПЕРЕДНИКІВ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ ПРИ ЦИРОЗІ – На моделі  $CCl_4$ -індукованого експериментального цирозу досліджували вплив системи L-аргінін – оксид азоту на функціональний стан печінки. Встановлено, що повторне введення попередників синтезу оксиду азоту L-аргініну та препарату “Глутаргін” (L-аргініну L-глутамат) при експериментальному цирозі призводить до покращання функціонального стану печінки, зростання активності мітохондріальних ферментів, активізації метаболічних процесів в ураженому органі, що відбувається на фоні зростання вмісту eNOS, зменшення iNOS та зниження рівня IL-1 $\beta$ , IL-6 та TNF- $\alpha$ .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА ПРИ ЦИРРОЗЕ – На модели  $CCl_4$ -индуцированного экспериментального цирроза исследовали влияние системы L-аргинин – оксид азота на функциональное состояние печени. Установлено, что повторное введение предшественников синтеза оксида азота L-аргинина и препарата “Глутаргин” (L-аргинина L-глутамат) при экспериментальном циррозе приводит к улучшению функционального состояния печени, повышению активности митохондриальных ферментов, активизации метаболических процессов в пораженном органе, что происходит на фоне роста содержания eNOS, уменьшения iNOS и снижения уровня IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ .

EXPERIMENTAL STUDY OF HEPATOPROTECTIVE PROPERTIES OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS PRECURSOR IN THE CIRRHOTIC LIVER – In the model  $CCl_4$ -induced experimental cirrhosis the impact of L-arginine - nitric oxide on the functional state of the liver was investigated. Established that repeated administration precursor of nitric oxide and L-arginine and Glutargine (L-arginine L-glutamate) in experimental cirrhosis leads to improvement of the functional state of the liver, increased activity of mitochondrial enzymes, activation of metabolic processes in the affected organ, that is, given on the base of the growing content of eNOS, iNOS decreasing and reduction of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  concentration.

**Ключові слова:** оксид азоту, L-аргінін, глутаргін, печінка.

**Ключевые слова:** оксид азота, L-аргинин, глутаргин, печень.

**Key words:** nitric oxide, L-arginine, glutargine, liver.

**ВСТУП** Згідно з даними літератури, на диспансерному обліку в Україні перебуває понад 280 тис. хворих на хронічний гепатит різної етіології та більше 40 тис. пацієнтів із цирозом печінки (ЦП) [1]. Тому пошук нових та обґрунтування механізмів дії вже відомих лікарських засобів є надзвичайно актуальним [2].

Відомо, що у патогенезі цирозу печінки, а саме, порушень системної гемодинаміки та розвитку метаболічних порушень при даній патології, провідну роль відіграє оксид азоту (NO). Вчені Valance і Monsada (1991) висунули гіпотезу про те, що гіперпродукція NO при цирозі печінки пов'язана зі зростанням ендотоксемії, яка через систему цитокінів стимулює синтез оксиду азоту [3]. Результати інших дослідників засвідчили, що в умовах цирозу виникає зниження біодоступності NO та наростання явищ органної вазоконстрикції, що веде до розвитку портальної гіпертензії при даній патології [4, 5].

Враховуючи вищезазначене, з метою вивчення ролі системи оксиду азоту в патогенезі циротичного

ураження печінки ми провели дослідження впливу попередників синтезу NO функціональний стан та метаболічні процеси в ураженому органі при експериментальному цирозі, що викликаний тривалим введенням тетрахлорметану.

**МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** Дослідження проведено на 24 білих щурах-самцях лінії Wistar масою 170–210 г. Маніпуляції з тваринами проводили відповідно до правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (м. Страсбург, 1985 р.). Експериментальне циротичне ураження печінки моделювали пероральним введенням  $CCl_4$  в дозі 2 г/кг 2 рази на тиждень впродовж 3 місяців [6]. В якості модуляторів NO використовували L-аргінін фірми “Sigma” (США) та L-аргініну L-глутамат L-A-L-Г (препарат “Глутаргін” фармацевтичної компанії “Здоров'я”). Досліджувані агенти вводили внутрішньочеревно повторно впродовж 7 днів у дозі 25 та 45 мг/кг маси тіла відповідно після завершення моделювання патологічного процесу.

У сироватці крові за допомогою стандартних наборів реактивів “Human” (Німеччина) визначали активність ферментів цитолізу та холестази (АлАТ, АсАТ, лужної фосфатази (ЛФ)), вміст компонентів жовчі (холестерину, білірубину та жовчних кислот). У сироватці крові визначали вміст кінцевих продуктів метаболізму оксиду азоту:  $NO_2^-$  та  $NO_3^-$  [7, 8], вміст церулоплазміну [9], лактату, пірувату [10]. Активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) [11] і цитохромоксидази (ЦХО) [12]. Імуноферментним методом за допомогою наборів реактивів USCN Life Science Inc. в сироватці та гепатоцитах визначали вміст ендотеліальної (eNOS) та індукцибельної (iNOS) NO-синтаз, концентрацію прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$ , IL-6 та TNF- $\alpha$ . Для статистичної значимості різниці між середніми величинами у вибірках використовували непараметричний метод із застосування критерію Манна-Уїтні. Статистичну обробку результатів проведено у відділі системних статистичних досліджень ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України” в програмному пакеті Statsoft STATISTIKA. Достовірними вважали відмінності при  $p \leq 0,05$  (95,5 %).

Робота є фрагментом планової науково-дослідної теми ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України” “Пошук способів корекції уражень внутрішніх органів медикаментозного та іншого ґенезу” (№ державної реєстрації 0110U003642).

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ** Введення впродовж 7 днів піддослідним тваринам попередників синтезу оксиду азоту L-аргініну та L-A-L-Г при уже сформованому експериментальному цирозі печінки призводило до зниження активності маркерних ферментів цитолізу та холестази (табл. 1). Активність АлАТ зменшувалась на 36,6 та 61,7 %, АсАТ – на 40,3 та 50,0 %, ЛФ – на 8,7 та 7,1 % відповідно до

досліджуваних чинників та порівняно із показниками контролю, що вказує на зменшення інтенсивності переробки цитолітичних та холестатичних процесів у печінці при повторному застосуванні прекурсорів оксиду азоту на фоні цирозу печінки.

Результати наших досліджень узгоджуються з даними інших науковців, які встановили пригнічення процесів цитолізу при застосуванні аргінінвмісних препаратів у хворих із цирозом печінки [13, 14].

На це також опосередковано вказує зниження, за введення обох препаратів із групи прекурсорів оксиду азоту, концентрації таких компонентів жовчі в сироватці крові, як білірубін (на 21,7 та 19,6 %), холестерин (на 22,3 та 25,7 %) та жовчні кислоти (на 11,8 та 11,6 %) порівняно з аналогічними показниками у тварин зі змодельованим цирозом печінки. Причому, за введення L-аргініну вміст останніх вірогідно не відрізняється від показників контролю (табл. 2).

За введення L-аргініну та L-A-L-Г на фоні цирозу наростала концентрація стабільних метаболітів оксиду азоту – нітритів та нітратів. Так, вміст  $\text{NO}_2^-$  у сироватці крові зростає у 3,1 та 3,2 раза, а у печінці – на 33,8 та 35,8 %. Рівень  $\text{NO}_3^-$  зростає на 8,8 % тільки у печінці за введення L-A-L-Г (табл. 3).

Встановлено вірогідне підвищення вмісту eNOS в гепатоцитах за введення обох досліджуваних агентів на 45,2 та 57,4 %, а концентрація індукбельної форми ферменту знижувалася, порівняно з групою тварин без корекції, на 24,6 та 21,1 %, залишаючись вищою за показники контролю на 84,8 та 88,4 % відповідно. Таку ж закономірність ми спостерігали й у сироватці крові: рівень eNOS зростає за введення обох коригуючих чинників на 45,2 та 57,4 %, а iNOS – знижувався на 37,9 та 40,2 % порівняно з групою тварин зі змодельованим цирозом. Причому вміст ендотеліальної форми ферменту вірогідно не відрізнявся від показників контролю (табл. 4).

Зростання концентрації нітриту аніону, на нашу думку, зумовлено активацією ендотеліальної форми NO-синтази, вміст якої за введення прекурсорів оксиду азоту достовірно зростає в обох досліджуваних середовищах. Це в умовах цирозу може бути пояснено як усуненням роз'єднання eNOS при підвищенні концентрації субстрату, так і зниженням концентрації асиметричного диметиларгініну (ADMA), з яким аргінін конкурує за зв'язок із NO-синтазою [15, 16].

Як випливає із даних, представлених у таблиці 5, при застосуванні L-аргініну вміст прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$ , IL-6 та TNF- $\alpha$  вірогідно зменшувався на

**Таблиця 1. Біохімічні показники сироватки крові за введення попередників синтезу оксиду азоту при цирозі печінки**

Показник	Група тварин			
	контроль	цироз	цироз +L-аргінін	цироз +L-A-L-Г
АлАТ, ммоль/(лхгод)	0,47 $\pm$ 0,11	1,59 $\pm$ 0,06*	1,10 $\pm$ 0,09*#	1,01 $\pm$ 0,07*#
АсАТ, ммоль/(лхгод)	1,63 $\pm$ 0,16	4,80 $\pm$ 0,17*	2,87 $\pm$ 0,17*#	2,40 $\pm$ 0,14*#
Лужна фосфатаза, ммоль/(лхгод)	2,37 $\pm$ 0,08	3,16 $\pm$ 0,05*	2,88 $\pm$ 0,05*#	2,93 $\pm$ 0,06*#

Примітка. У цій та інших таблицях статистично значуща достовірність відмінностей \* – відносно контролю; # – групи тварин із цирозом.

**Таблиця 2. Вміст компонентів жовчі у сироватці крові за введення попередників синтезу оксиду азоту при цирозі**

Показник	Група тварин			
	контроль	цироз	цироз + L-аргінін	цироз +L-A-L-Г
Білірубін, мкмоль/л	1,18 $\pm$ 0,08	2,08 $\pm$ 0,12*	1,63 $\pm$ 0,10*#	1,67 $\pm$ 0,07*#
Холестерол, ммоль/л	1,67 $\pm$ 0,11	3,43 $\pm$ 0,14*	2,67 $\pm$ 0,16*#	2,55 $\pm$ 0,20*#
Жовчні кислоти, мг %	230,42 $\pm$ 5,35	290,21 $\pm$ 3,85*	255,94 $\pm$ 10,03	256,67 $\pm$ 13,76

**Таблиця 3. Вміст нітрит- та нітрат-аніону за введення попередників синтезу оксиду азоту при цирозі печінки**

Серія досліджу	Показник			
	кров		печінка	
	$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/л	$\text{NO}_3^-$ , мкмоль/л	$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/кг	$\text{NO}_3^-$ , мкмоль/кг
Контроль	1,23 $\pm$ 0,06	10,02 $\pm$ 0,11	2,20 $\pm$ 0,15	8,75 $\pm$ 0,26
Цироз	3,68 $\pm$ 0,13*	12,38 $\pm$ 0,23*	1,65 $\pm$ 0,07*	8,18 $\pm$ 0,10
Цироз +L-аргінін	3,85 $\pm$ 0,16*	12,57 $\pm$ 0,16*	2,21 $\pm$ 0,15#	8,51 $\pm$ 0,11
Цироз +L-A-L-Г	3,94 $\pm$ 0,15*	12,71 $\pm$ 0,03*	2,24 $\pm$ 0,04#	8,90 $\pm$ 0,19#

**Таблиця 4. Вміст eNOS та iNOS у гепатоцитах та сироватці крові за введення попередників синтезу оксиду азоту при цирозі печінки**

Серія досліджу	Сироватка крові		Печінка	
	eNOS, од./мл	iNOS, нг/мл	eNOS, од./мл (1 мл – $1 \times 10^6$ клітин)	iNOS, нг/мл (1 мл – $1 \times 10^6$ клітин)
Контроль	2,24 $\pm$ 0,14	15,73 $\pm$ 0,79	7,95 $\pm$ 0,60	2,35 $\pm$ 0,28
Цироз	0,93 $\pm$ 0,10*	64,47 $\pm$ 5,10*	4,87 $\pm$ 0,24*	5,76 $\pm$ 0,20*
Цироз + L-аргінін	1,45 $\pm$ 0,08*#	40,03 $\pm$ 4,02*#	7,07 $\pm$ 0,10#	4,34 $\pm$ 0,13*#
Цироз + L-A-L-Г	1,61 $\pm$ 0,12*#	38,57 $\pm$ 1,37*#	7,66 $\pm$ 0,37#	4,43 $\pm$ 0,33*#

Таблиця 5. Вміст цитокинів у сироватці крові за введення попередників синтезу оксиду азоту при цирозі печінки

Серія досліджу	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$
	пг/мл		
Контроль	1,52 $\pm$ 0,41	5,25 $\pm$ 0,40	5,25 $\pm$ 0,40
Цироз	6,12 $\pm$ 0,27*	21,83 $\pm$ 2,15*	30,25 $\pm$ 1,15*
Цироз + L-аргінін	4,03 $\pm$ 0,32*#	10,63 $\pm$ 0,55*#	18,83 $\pm$ 0,88*#
Цироз +L-A-L-Г	4,13 $\pm$ 0,36*#	11,18 $\pm$ 1,09*#	17,23 $\pm$ 0,71*#

34,1; 51,5 та 37,7 %, порівняно з групою тварин без корекції, однак залишався вищими від контрольних значень в 2,7; 2,0 та 3,6 раза відповідно. За введення L-A-L-Г зменшувався на 32,7; 51,5 та 43,0 %, порівняно з ураженням, та був вищими за контрольні показники в 2,7; 2,1 та 3,3 раза (табл. 5).

Активність мітохондріальних ферментів СДГ та ЦХО зростала на 6,8 і 9,7 % та 7,2 і 7,2 % відповідно, що вказує на покращення процесів ендogenous дихання у гепатоцитах на фоні зростання вмісту субстрату для синтезу NO (табл. 6).

Позитивний вплив попередників синтезу оксиду азоту на функціональний стан мітохондрій в умовах цирозу, про що свідчать результати наших досліджень,

може бути зумовлений покращенням кровообігу та оксигенації ураженого органа. S. Kakumitsu та співавт. (1999) відмітили покращання стану хворих із цирозом після інфузії L-аргінину та зафіксували при цьому, на фоні підвищення синтезу оксиду азоту, підсилення печінкового кровотоку, зменшення синусоїдального опору в печінці [17].

Концентрація молочної кислоти за введення L-аргінину та глутаргину знижувалася на 9,2 та 13,2 %, а пірвіноградної наростала на 66,3 та 70,8 % відповідно, що призвело до зниження, порівняно з групою тварин з ураженням, співвідношення лактат/піруват на 46,2 та 49,7 % за введення обох досліджуваних середників (табл. 6).

Таблиця 6. Показники системи мітохондріального транспорту електронів та вуглеводневого обміну в печінці за введення попередників синтезу оксиду азоту при цирозі

Серія досліджу	Показники мітохондріальної активності		Показники анаеробного обміну вуглеводнів		
	СДГ, ммоль/(кгххв)	ЦХО, ммоль/(кгххв)	лактат, ммоль/кг	піруват, ммоль/кг	лактат / піруват
Контроль	8,80 $\pm$ 0,13	9,38 $\pm$ 0,19	5,09 $\pm$ 0,09	1,31 $\pm$ 0,04	3,89 $\pm$ 0,10
Цироз	6,67 $\pm$ 0,10*	6,67 $\pm$ 0,14*	6,32 $\pm$ 0,13*	0,63 $\pm$ 0,03*	10,19 $\pm$ 0,75*
Цироз + L-аргінін	7,14 $\pm$ 0,08*#	7,15 $\pm$ 0,1*#1	5,74 $\pm$ 0,10*#	1,05 $\pm$ 0,02*#	5,48 $\pm$ 0,05*#
Цироз +L-A-L-Г	7,33 $\pm$ 0,10*#	7,15 $\pm$ 0,07*#	5,48 $\pm$ 0,12*#	1,08 $\pm$ 0,04*#	5,13 $\pm$ 0,24*#

Позитивний ефект застосування попередників оксиду азоту на стан печінки, підтверджений нами в цій та попередніх роботах експериментально, узгоджується з ефективним клінічним застосуванням препаратів цієї групи у комплексному лікуванні цирозу печінки [17–19].

**ВИСНОВКИ** Попередники синтезу оксиду азоту L-аргінін та L-аргінину L-глутамат при їх повторному введенні на фоні сформованого цирозу печінки сприяють пригніченню процесів цитолізу та холестаза, покращанню процесів мітохондріального дихання та зменшенню проявів метаболічного ацидозу, зниженню експресії iNOS та зростанню eNOS в печінці та крові, зменшенню рівня прозапальних цитокинів.

**Перспективи подальших розробок** Встановлення ролі системи оксиду азоту в механізмах розвитку уражень печінки обґрунтовує необхідність подальшого пошуку та вивчення сполук – попередників синтезу оксиду азоту, як ефективних гепатопротекторних засобів.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ткач С. М. Ефективність і безпека гепатопротекторів з точки зору доказательної медицини / С. М. Ткач // Здоровье Украины. – 2009. – № 6/1. – С. 7–10.
2. Матвеев А. В. Гепатопротекторы. Анализ международных исследований по препаратам групп лекарств для печени / А. В. Матвеев // ИТ "Ариал". – Симферополь, 2013 – 386 с.
3. Vallance P. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? / P. Vallance, S. Moncada // Lancet – 1991. – Vol. 337. – P. 776–778.

4. Корекція ендотеліальної дисфункції у хворих на цироз печінки / В. І. Русин, Є. С. Сірчак, О. І. Петричко [та ін.] // Укр. журн. хірургії. – 2011. – № 2 (11). – С. 9–13.

5. Hepatic and splanchnic nitric oxide activity in patients with cirrhosis / A. I. Sarela, F. M. Mihaimeed, J. J. Batten [et al.] // Gut. – 1999. – Vol. 44. – P. 749–753.

6. Systemic histopathology of rats with CCl4-induced hepatic cirrhosis / K. Doi, S. Kurabe, N. Shimazu, M. Inagaki // Laboratory Animals. – 1991. – Vol. 25. – P. 21–25.

7. 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.

8. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids / L. C. Green, A. W. Davie, J. Glogowski [et al.] // Analyt. Biochem. – 1982. – Vol. 126, № 1. – P. 131–138.

9. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 1982. – 311 с.

10. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / под ред. М. И. Прохоровой. – Л., 1982. – 272 с.

11. 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.

12. Современные методы в биохимии / под ред. акад. АМН СССР В. Н. Ореховича – М. : Медицина, 1977. – 390 с.

13. Вплив глутаргину на гіпербілірубінемію, цитоліз та енцефалопатію у хворих на декомпенсований цироз печінки / Е. Й. Архій, Є. С. Сірчак, Н. І. Брич [та ін.] // Наук. вісник Ужгород. ун-ту, серія – медицина. – 2003. – Вип. 21. – С. 58–60.

14. Корекція ендотеліальної дисфункції у хворих на цироз печінки / В. І. Русин, Є. С. Сірчак, О. І. Петричко [та ін.] // Укр. журн. хірургії. – 2011. – № 2 (11). – С. 9–13.

15. Role of vascular nitric oxide in experimental liver cirrhosis / N. M. Atucha, F. J. A. Nadal, D. Iyu [et al.] // *Current Vasc. Pharmacology*. – 2005. – Vol. 3. – P. 81–85.

16. The puzzle of endothelial nitric oxide synthase dysfunction in portal hypertension: the missing piece? / J. Leiper, M. Nandi, B. Torondel [et al.] // *Hepatology*. – 2007. – Vol. 46, № 3. – P. 943–946.

17. Effects of L-arginine on the systemic, mesenteric, and hepatic circulation in patients with cirrhosis / S. Kakumitsu, H. Shijo, M. Yokoyama [et al.] // *Hepatology*. – 1998. – Feb. 27 (2). – P. 377–382.

18. Бабак О. Я. Застосування нового вітчизняного препарату глутаргіну в гастроентерології / О. Я. Бабак // *Сучасна гастроентерологія*. – 2003. – Т. 12, № 2. – С. 85–89.

19. Олещук О. М. Модуляція системи оксиду азоту при експериментальному цирозі / О. М. Олещук, К. А. Посохова, Н. Є. Лісничук [та ін.] // *Вісник проблем біології і медицини*. – 2012. – Вип.1 (91). – С.152–155.

Отримано 08.08.14