

О.М. Олещук

Вплив модуляторів синтезу оксиду азоту на біохімічні показники функціонального стану печінки щурів

У досліджах на білих щурах-самцях показано, що повторне введення прекурсорів оксиду азоту L-аргініну, L-аргініну L-глутамату не змінює активності ферментів цитолізу, призводить до зниження вмісту продуктів ліпопероксидації, що корелює з показниками системи антиоксидантного захисту, підвищення активності ферментів мітохондрій та зменшення ендотоксикозу. Блокування активності NO-синтази L-NAME спричиняє посилення ендотоксикозу, пригнічення процесів детоксикації в печінці, зниження активності ферментів електронно-транспортної системи мітохондрій, активації процесів перекиснення мембранних ліпідів і зменшення резервів захисної антиоксидантної системи на тлі зниженого вмісту NO_2^- в крові та печінці.

Ключові слова: оксид азоту, печінка, L-аргінін, L-аргініну L-глутамат, L-NAME.

ВСТУП

Нині сформувалася наукова думка про оксид азоту як один із найважливіших медіаторів і регуляторів, що беруть участь у розвитку як фізіологічних, так і патологічних процесів в організмі людини [1]. Відомо, що ця біологічно активна молекула синтезується з амінокислоти L-аргініну за участю ферменту NO-синтази (NOS). За допомогою імуноферментної методики було показано, що обидві ізоформи ферменту, як Ca^{2+} -залежна (ендотеліальна – eNOS), так і Ca^{2+} -незалежна (індуцибельна – iNOS), наявні в печінці у фізіологічних умовах [2]. Гепатоцити були одними з перших типів клітин, для культури яких було виявлено здатність до синтезу NO в нормі [3, 4]. Тепер відомо, що майже всі типи клітин печінки, зокрема гепатоцити, купферівські, зіркоподібні й ендотеліальні клітини мають здатність його синтезувати [5]. У печінці NO бере участь у процесах мікроциркуляції, вазодилатації, апоптозу, проявляє антимікробну дію тощо [2, 4, 5]. Перетворюється NO з фізіологічного регулятора на токсичного агента в результаті його взаємодії з радикалом супероксид-аніона та утворен-

ні пероксинітриду, який, розпадаючись у процесі дифузії від місця утворення на OH і NO_2^- , буквально руйнує на своєму шляху різні біомолекули та біомембрани [2]. Тобто, з огляду на вищезазначене, можна зробити висновок, що NO проявляє як цитопротекторну, так і цитотоксичну дію. Незважаючи на велику кількість проведених досліджень, залишається не до кінця з'ясованою його значення в функціонуванні печінки. Одним із методів вивчення ролі системи L-аргінін – NO є застосування модуляторів його синтезу.

Метою нашого дослідження було вивчення біохімічних показників функціонального стану печінки на фоні введення прекурсорів та інгібітора синтезу оксиду азоту.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на базі лабораторії доклінічних досліджень лікарських засобів «ДВНЗ Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського». В експерименті використано 24 білих щурів-самців лінії Вістар масою 180–260 г. Тварини перебували у віварії з контрольованим темпе-

© О.М. Олещук

ратурним режимом, на стандартному раціоні з вільним доступом до їжі та води. Роботу зі щурами виконували згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [6]. Як попередники синтезу ми використали L-аргінін (“Sigma”, США), який вводили по 25 мг/кг у вигляді 2,5%-го водного розчину [7], фармакопейний 4%-й розчин L-аргініну L-глутамату (L-A-L-Г; глутаргін, фармацевтична компанія “Здоров’я”, м. Харків) – по 45 мг/кг в еквімолярній дозі у перерахунку на L-аргінін [8]. N-нітро-L-аргінін метиловий ефір (L-NAME; “Oldrich. Chem. Co.”, Англія) вводили по 10 мг/кг у вигляді 1%-го водного розчину [7]. Для вивчення впливу модуляторів синтезу NO на функціональний стан печінки у здорових тварин досліджували речовини вводили інтраперитонеально раз на добу щоденно протягом 7 діб. Дослідження проводили на 8-му добу експерименту. Тварини контрольної групи отримували ідентичний об’єм ізотонічного розчину. В гомогенатах печінки визначали вміст ТБК-активних продуктів [9], гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) [10], вміст відновленого глутатіону (G-SH) [11], активність супероксиддисмутази (СОД) [12, 13], каталази [14], сукцинатдегідрогенази (СДГ) [15], цитохромоксидази (ЦХО) [16], N-деме-

тилазну і р-гідроксилазну активність мікросом [15,17]. У сироватці крові – активність аланінамінотрансферази (АлАТ) та аспаргатамінотрансферази (АсАТ) (за допомогою стандартних наборів реактивів „Фелісіт”), каталази [13], вміст ТБК-активних продуктів [8], церулоплазміну [17], стабільних метаболітів NO – NO₂⁻ та NO₃⁻ [18], сечовини (за допомогою стандартного набору реактивів „Фелісіт”), вміст молекул середньої маси (МСМ) [18]. Для розрахунків використовували комп’ютерну програму Microsoft Excel XP (США). Всі отримані результати були оброблені методом варіаційної статистики з використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA за допомогою програми Originpro 7.5.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Після повторного 7-добового введення речовин із групи попередників синтезу NO – L-аргініну і L-A-L-Г ми не зафіксували зміни активності маркерних ферментів цитолізу гепатоцитів АлАТ та АсАТ (табл. 1).

Разом з тим при введенні досліджуваних речовин відмічено тенденцію до зростання вмісту сечовини в сироватці крові, що можна пояснити збільшенням кількості субстрату для аргіназного перетворення L-аргініну

Таблиця 1. Біохімічні показники сироватки крові за умов введення модуляторів синтезу NO (M±m, n=6)

Показник	Серія дослідів			
	Контроль	L-аргінін	L-A-L-Г	L-NAME
Аланінамінотрансфераза, ммоль/(л·год)	0,51±0,04	0,53±0,03	0,56±0,04	0,70±0,04*
Аспаргатамінотрансфераза, ммоль/(л·год)	1,80±0,19	1,77±0,17	1,98±0,16	2,35±0,19
Сечовина, ммоль/л	3,70±0,28	4,29±0,21	4,39±0,32	5,73±0,19*
Церулоплазмін, мг/л	238,44±3,44	261,04±9,40	265,42±12,54	274,17±8,81*
Молекули середньої маси, ум. од./л				
при λ=254 нм	0,27±0,01	0,25±0,01*	0,24±0,01*	0,33±0,01*
при λ=280 нм	0,42±0,01	0,38±0,02*р	0,37±0,02*	0,50±0,01*

Примітка. У цій і наступних таблицях * достовірність відмінностей при P<0,05.

[20, 21], однак слід зазначити, що ці зміни не були достовірними і не виходили за межі фізіологічної норми для тварин [22].

Встановлено, що після введення L-аргініну та L-A-L-Г знижувався вміст у печінці ТБК-активних продуктів на 12,2 (P<0,05) і 12,6 % (P<0,05) та ГПЛ на 8,9 (P<0,05) і 14,5 % (P<0,05), зростала активність каталази на 24,8 (P<0,01) і 16,3 % (P<0,01) відповідно. Активність одного з антиоксидантних ферментів СОД підвищувалася на 19,6 % (P<0,05) при застосуванні L-аргініну та вірогідно не змінювалася при введенні L-A-L-Г. У сироватці крові знижувався вміст ТБК-активних продуктів на 12,7 та 11,8 % (P<0,05) за умов введення обох коригувальних агентів відповідно, каталазна активність крові дослідних тварин достовірно не змінювалася, проявляючи тенденцію до зростання. Вміст G-SH у печінці при введенні L-аргініну вірогідно не змінювався, а під впливом L-A-L-Г збільшувався на 8,8 % (P<0,05; табл. 2).

Встановлено, що при повторному введенні попередника NO – L-аргініну зростала активність ЦХО на 16,6 %, а активність СДГ мала лише тенденцію до підвищення. L-A-L-Г викликав вірогідне підвищення цього показника: СДГ на 16,3 % (P<0,01), ЦХО на 13,9 % (P<0,05; табл. 3). Повторне введення досліджуваних агентів вірогідно не змінювало активності цитохрому P450 2E1 та цхP450 3A, на що вказує відсутність змін N-демети-

лазної та р-гідроксилазної активності мікросом печінки (див. табл. 3).

Вивчали вплив прекурсорів оксиду азоту на вміст кінцевих метаболітів амінокислоти L-аргініну NO_2^- та NO_3^- при її оксидазному перетворенні [23]. Слід відмітити підвищення вмісту NO_2^- у печінці на 19,7 % (P<0,01) та тенденцію до підвищення NO_3^- . Вміст нітрит- та нітрат-аніонів у печінці під впливом L-A-L-Г зростав на 17,8 % (P<0,01) та 31,0 % (P<0,05) відповідно, а у сироватці крові ці показники вірогідно не змінювалися (табл. 4).

Про зменшення проявів ендотоксикозу за умов введення досліджуваних речовин свідчить зниження вмісту МСМ₁ на 10,6 % (P<0,05) та 13,7 % (P<0,01), МСМ₂ на 9,0 % (P<0,05) та 11,6 % (P<0,05) відповідно при застосуванні L-аргініну та L-A-L-Г у порівнянні з контрольною групою тварин (див. табл. 1).

Таким чином, повторне введення прекурсорів оксиду азоту L-аргініну та L-A-L-Г спричиняло незначне збільшення вмісту кінцевих продуктів метаболізму оксиду азоту у печінці та стабільній відносно контролю концентрації цього показника в сироватці крові, не змінювало активності ферментів цитолізу, призводило до зниження вмісту продуктів ліпопероксидації, що корелювало з показниками системи антиоксидантного захисту, зростання активності ферментів мітохондрій та не впливало на активність цитохрому P450 2E1 та P450 3A.

Таблиця 2. Зміни показників ліпопероксидації та антиоксидантної системи за введення модуляторів синтезу NO (M±m, n=6)

Показник	Контроль	L-аргінін	L-A-L-Г	L-NAME
Гідроперекиси ліпідів, ум. од./кг	1,95±0,04	1,78±0,01*	1,63±0,08 *	2,43±0,10*
ТБК-активні продукти, мкмоль/кг				
печінка	3,14±0,09	2,76±0,11*	2,74±0,07*	3,97±0,07 *
кров	2,18±0,09	1,90±0,04*	1,92±0,04*	2,92±0,07*
Каталаза				
печінка, кат/кг	4,25±0,10	5,31±0,16*	4,95±0,11 *	4,66±0,14
кров, кат/л	14,71±0,46	15,28±0,58	16,03±0,62	17,93±0,60*
Супероксиддисмутаза, ум. од./кг	4,73±0,17	5,65±0,31*	5,04±0,11	3,96±0,10*
Відновлений глутатіон, ммоль/кг	4,01±0,09	4,13±0,04*	4,36±0,05*	3,38±0,06*

Таблиця 3. Показники системи мітохондріального транспорту електронів та детоксикаційної функції печінки за умов введення модуляторів синтезу NO (M±m, n=6)

Серія дослідів	Мітохондріальна фракція		Мікросомальна фракція	
	Сукцинат дегідрогеназа, ммоль/кг·хв	Цитохромоксидаза, ммоль/кг·хв	N-деметилазна активність, ммоль/кг·хв	p-гідроксилазна активність, ммоль/кг·хв
Контроль	8,54±0,15	5,91±0,18	8,25±0,23	0,77±0,02
L-аргінін	8,99±0,28	6,89±0,13*	8,69±0,16	0,76±0,02
L-A-L-Г	9,93±0,23 *	6,74±0,18*	8,47±0,18	0,79±0,01
L-NAME	6,96±0,21*	5,29±0,17 *	5,57±0,27 *	0,45±0,03 *

Вивчення функціонального стану печінки на тлі зміненої активності системи оксиду азоту показало важливе значення цієї молекули. Застосування блокатора синтезу NO в здорових щурів викликало негативний вплив на стан гепатоцитів та їх функції.

Так, при використанні L-NAME активність АлАТ, яку зазвичай розглядають як показник ступеня токсичного ураження печінки та пошкодження плазматичної мембрани, підвищувалася в плазмі крові на 37,7 % (P<0,05) порівняно з контрольною групою тварин. Активність іншого ферменту цитолізу – АсАТ проявляла лише тенденцію до підвищення. Значно збільшувався в сироватці крові вміст сечовини (на 55,1 %, P<0,001), що можна розцінювати і як результат активації пуринового обміну, і як активацію аргіназного шляху метаболізму L-аргініну на тлі повного блокування його оксидазного перетворення (див. табл. 1).

Застосування L-NAME призводить до підвищення активності процесів ліпопероксидації та змін у ферментній і неферментній ланках антиоксидантної системи. Встановлено, що

за умов введення препарату вміст церулоплазміну підвищувався на 15,0 % (P<0,01). Вміст первинних і вторинних продуктів ліпопероксидації у печінці збільшувався: ГПЛ – на 24,8 % (P<0,01), ТБК-активних продуктів – на 26,5 % (P<0,001); у сироватці крові вміст ТБК-активних продуктів збільшився у 4,3 раза. Активність СОД у печінці знижувалася на 16,1 % (P<0,01), каталази у сироватці крові – на 21,9 % (P<0,01). Вміст G-SH був меншим на 15,8 % (P<0,001) порівняно з контрольною групою тварин (див. табл. 2).

На порушення процесу перенесення електронів у мітохондріях печінки за умов введення неселективного блокатора NOS вказувало зниження активності ферментів СДГ та ЦХО на 18,4 % (P<0,001) і 10,5 % (P<0,05; див. табл. 3). Погіршувалася детоксикаційна функція печінки, про що свідчить зменшення N-деметилазної та p-гідроксилазної активності мікросом на 32,4 та 41,6 % відповідно (P<0,001; див. табл. 3) та посилення явищ ендотоксикозу, на що вказує підвищення вмісту МСМ₁ та МСМ₂ на 21,6 і 19,5 % (P<0,001) відповідно (див. табл. 1). Вміст NO₂⁻ як у

Таблиця 4. Вміст нітрит- та нітрат-аніона у сироватці крові та печінці тварин за введення попередників синтезу NO (M±m)

Серія дослідів	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻
	кров, мкмоль/л		печінка, мкмоль/кг	
Контроль	3,68±0,13	7,89±0,50	1,75±0,04	8,42±0,88
L-аргінін	3,41±0,11	9,42±0,48	2,10±0,08*	10,63±0,32
L-A-L-Г	3,57±0,08	10,00±0,84	2,07±0,07*	11,03±0,40*
L-NAME	2,78±0,10*	6,26±0,58	1,37±0,04*	7,42±0,09

гомогенатах печінки, так і в сироватці крові знижувався на 24,5 % ($P < 0,01$) та 21,8 % ($P < 0,001$). Вміст NO_3^- в обох досліджуваних середовищах вірогідно не змінювався, хоча спостерігалася очевидна тенденція до його зниження (див. табл. 4).

Посилення ендотоксикозу, зниження активності цитохрому P450 3A та 2E1, що вказує на пригнічення процесів детоксикації в печінці, зниження активності ЦХО та СДГ, яке можна розцінювати як часткову блокаду кінцевої ланки переносу електронів по дихальному ланцюгу, виснаження захисної антиокиснювальної системи глутатіону та активація процесів переокиснення мембранних ліпідів на тлі зниженого вмісту NO_2^- ймовірно свідчать про значні порушення метаболічних процесів у печінці внаслідок обмеження ефектів оксиду азоту через введення неселективного блокатора NOS.

ВИСНОВКИ

1. Повторне введення прекурсорів NO спричинює зростання вмісту кінцевих продуктів метаболізму цього оксиду у печінці, не змінює активності ферментів цитолізу, призводить до зниження вмісту продуктів ліпопероксидації, що корелює з показниками системи антиоксидантного захисту, зростання активності ферментів мітохондрій та вірогідно не змінює активність процесів детоксикації та зменшує прояви ендотоксикозу.

2. Блокування активності eNOS та iNOS за допомогою L-NAME призводить до посилення ендотоксикозу, пригнічення процесів детоксикації в печінці, зниження активності ферментів електронно-транспортної системи мітохондрій, активації процесів переокиснення мембранних ліпідів і зниження резервів захисної антиокиснювальної системи на тлі зниженого вмісту NO_2^- в крові та печінці. Результати наших досліджень свідчать про протективну роль оксиду азоту у функціонуванні печінки.

А.М. Олещук

ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯТОРОВ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС

В опытах на белых крысах-самцах показано, что повторное введение прекурсоров оксида азота L-аргинина, L-аргинина L-глутамат не изменяет активности ферментов цитоллиза, приводит к снижению содержания продуктов липопероксидации, что коррелирует с показателями системы антиоксидантной защиты, повышению активности ферментов митохондрий и уменьшению эндотоксикоза. Блокирование активности NO-синтазы L-NAME является причиной усиления явлений эндотоксикоза, угнетения процессов детоксикации в печени, снижения активности ферментов электронно-транспортной системы митохондрий, активации процессов переокисления мембранных липидов и уменьшения резервов защитной антиокислительной системы на фоне пониженного содержания NO_2^- в крови и печени.

Ключевые слова: оксид азота, печень, L-аргинин, L-аргинина L-глутамат, L-NAME.

O.M. Oleshchuk

THE IMPACT OF MODULATORS OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS ON BIOCHEMICAL INDICES OF LIVER IN RATS

In experiments on white male rats it was shown that repeated administrations of nitric oxide precursors L-arginine and L-arginine L-glutamate do not alter the activity of cytolysis enzymes, reduce lipid peroxidation that correlates with indices of antioxidant protection, increase enzymatic activity in mitochondria and reduce endotoxemia. NO-synthase blockade by L-NAME increases endotoxemia, inhibits detoxification process in the liver, reduces the activity of electron transport enzymes in mitochondria, activation of lipids peroxidation reducing protective reserves of antioxidant system that is accompanied by low levels of NO_2^- in blood and liver.

Key words: nitric oxide, liver, L-arginine, L-arginine L-glutamate, L-NAME.

Horbachevsky Ternopil State Medical University, Ukraine

REFERENCES

1. Kolisnyk M, Kolisnyk V, Nidzulka Ye, Vlizlo V. Oxygen active forms and their role in cell metabolism. *Animal Biology*. 2009; **9**(1–2):59–70.
2. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007; **Jan**; **87**(1):315–424.
3. Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Hofmann K, Simmons RL. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine

- in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J Exp Med.* 1989 Nov 1; **170**(5):1769–74.
4. Goh BJ, Tan BT, Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide synthase and heme oxygenase expressions in human liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2006; **12**(4):588–94.
 5. Bondzyk O, Yanchuk P. Aminoacid L-arginine metabolism and its influence on liver. *Visnyk Cherkaskoho Universitetu, series – biological science.* 2011;204:8–11.
 6. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Council of Europe, ETS No. 123, 1986 – conventions.coe.int/treaty/en/treaties/html/123.htm
 7. Oleshchuk O, Shevchuk O, Nikolaeva V. Influence of Nitric oxide synthesis modulators on the detoxication processes in liver. *Visnyk naukovykh doslidzen'.* 2012; **68**(3):94–7.
 8. Merculova U. Pharmacological investigation of l-arginine l-glutamate (glutargine) as hypoammoniumemic and hepatoprotective agent / PhD Thesis. Odessa, 2002.
 9. Andreeva L, Kozemyakin L, Kyshkun A. Modification of lipid peroxidation determination in test with TBA. *Lab. Delo.* 1988;11:41–3.
 10. Havrylov V, Mishkorudnaya M. Spectrophotometric determination of lipid hydroperoxides content in blood plasma. *Lab. Delo.* 1983;3:33–5.
 11. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 82:70–7.
 12. Yeshchenko N, Volsky H. Determination of succinic acid and succinate dehydrogenase activity Methods of biochemical investigations. Leningrad; 1982.
 13. Chevare C, Chaba I, Sekeye I. Role of superoxide dismutase in cell oxidative processes and method of its determinations in biological substances. *Lab. Delo.* 1985;11:678–84.
 14. Koroluk M, Ivanova L, Mayorova I, Tokarev V. Method of catalase activity determination. *Lab. Delo.* 1988;1:16–9.
 15. Orekhovich V. Modern methods in biochemistry. Moscow: Medicina, 1977.
 16. Karusina I, Archakov A. Modern methods in biochemistry. Moscow: Medicina, 1977.
 17. Kolb V, Kamyshnikov V. Manual on clinical chemistry. Minsk: Belarus, 1982.
 18. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PI, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126: 131–38.
 19. Lifshic R, Valdman B, Volchehorsky I, Luzevyy A. The role of middle molecules in the development of blood kardiodepressii in thermal burns // *Bul. experim. biol. i med.* 1986; **101**(3):280–82.
 20. Reutov V. Cycle nitric oxide in the body of mammals and cyclic principle. *Biochimia.* 2002; **67**(3):353–76.
 21. Morris S. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br. J. Pharmacol.* 2009; **157**:922–30.
 22. Ananich I, Dercho M, Koncevaya S. Biochemical characteristics of the blood of rats. *Veterinarnaya klinika.* 2008; **77**(10):18–20.
 23. Magner S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care.* – 2006. – **10**(1): 208. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1550838/>.

*ДВНЗ «Терноп. мед. ун-т ім. І.Я. Горбачевського
МОЗ України»
E-mail oleksandrao@ukr.net*

*Матеріал надійшов
до редакції 09.12.2013*