

В. А. Дацко, О. М. Олещук, Г. Я. Лой, М. П. Кланца, Т. В. Дацко, М. І. Луканюк,
В. В. Черняшова, А. З. Ничик, Я. І. Іванків, В. П. Пида, А. В. Черноמידз
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО
МОЗ УКРАЇНИ

ЕФЕКТИВНІСТЬ L-ОРНІТИНУ L-АСПАРТАТУ В ПОПЕРЕДЖЕННІ ЕНДОТОКСИКОЗУ І ПОРУШЕНЬ МІТОХОНДРІАЛЬНОГО ДИХАННЯ ПРИ ГОСТРОМУ ТОКСИЧНОМУ ГЕПАТИТІ

Вступ. Дослідження механізмів дії L-орнітину L-аспартату (LOLA) за умов гострого токсичного гепатиту залишається актуальною проблемою сучасного сьогодення. Відомо, що порушення мітохондріального дихання та ендотоксикоз є провідними патогенетичними ланками в механізмі виникнення гострого токсичного гепатиту, оскільки вони сприяють формуванню реактивних форм кисню і надмірному запаленню, що, врешті, може призвести до патологічного ремоделювання печінки.

Мета дослідження – встановити ефективність LOLA в попередженні ендотоксикозу, оцінити вплив препарату на процеси мітохондріального дихання при гострому токсичному ураженні печінки, індукованому тетрахлорметаном (CCl_4), та з'ясувати значення синтезу оксиду азоту в реалізації цих ефектів.

Методи дослідження. Дослідження проведено на 24 білих статевозрілих нелінійних щурах-самцях. Гострий токсичний гепатит моделювали шляхом одноразового інтраперитонеального введення тетрахлорметану (2 г/кг). Коригувальні чинники речовини вводили протягом 2 діб. Дослідження виконували на 3-тю добу. L-орнітин L-аспарат вводили в дозі 200 мг/кг маси, N-нітро-L-аргінін метиловий ефір (L-NAME) – по 10 мг/кг. Вміст гідропероксидів ліпідів (ГПЛ), церулоплазміну (ЦП), молекул середньої маси (MCM_1 та MCM_2), активність цитохромоксидази (ЦХО), сукцинатдегідрогенази (СДГ) визначали згідно зі стандартними методиками.

Результати й обговорення. При гострому токсичному гепатиті вміст ГПЛ підвищувався на 72,64 %, MCM_1 та MCM_2 – на 38,32 і 60,65 % відповідно, ЦП – на 31,94 %. При введенні LOLA продукування ГПЛ пригнічувалося на 20,22 %, вміст MCM_1 та MCM_2 знижувався на 16,88 і 25 %, ЦП – на 14,48 %. При CCl_4 -індукованому гепатиті активність ЦХО пригнічувалася на 25 %, а СДГ – на 23,46 %. У групі пролікованих LOLA щурів спостерігали зростання активності цих ферментів на 8,85 і 5,42 % відповідно. Одночасне застосування L-NAME інгібувало всі ефекти LOLA, оскільки вміст ГПЛ залишався на 31,51 % більшим, MCM_1 та MCM_2 – на 22,92 і 37,33 %, ЦП – на 15,34 %, активність ЦХО зменшувалася на 7,66 %, а СДГ – на 8,82 %.

Висновки. L-орнітин L-аспарат запобігає ендотоксикозу, зумовленому CCl_4 -індукованим гепатитом, та проявляє потенційну ефективність у відновленні мітохондріального дихання. Перелічені ефекти LOLA реалізуються через NO-залежний механізм.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: L-орнітин L-аспарат; ендотоксикоз; мітохондріальне дихання; оксид азоту.

ВСТУП. L-орнітин L-аспарат (LOLA) є сіллю природних амінокислот орнітину й аспартату, які забезпечують важливими субстратами метаболічні шляхи, що беруть участь у знешкодженні аміаку [1]. Здатність LOLA знижувати вміст аміаку і підвищувати концентрацію сечовини у плазмі свідчить про участь препарату в активації циклу Кребса [1, 2]. При порушенні функції пе-

чінки у пацієнтів із цирозом аміак не може метаболізуватися гепатоцитами, тому відбувається його м'язове перетворення у глутамін, який функціонує як нетоксичний транспортер аміаку в системі кровообігу. L-орнітин L-аспарат сприяє зростанню сироваткового рівня глутаміну, але його вміст у спинномозковій рідині не підвищується, що запобігає розвитку набряку мозку [1].

Ще один відомий механізм дії LOLA, підтверджений у пацієнтів із цирозом [3] та на експериментальній моделі хронічної печінкової недо-

© В. А. Дацко, О. М. Олещук, Г. Я. Лой, М. П. Кланца, Т. В. Дацко, М. І. Луканюк, В. В. Черняшова, А. З. Ничик, Я. І. Іванків, В. П. Пида, А. В. Черноמידз, 2022.

статності [4], пов'язаний із підвищенням активності синтази оксиду азоту (NOS) з подальшим посиленням мікроперфузії печінки [5]. Однак залежний від оксиду азоту (NO) механізм дії LOLA при гострому токсичному ураженні печінки недостатньо вивчено.

Гостре ураження печінки характеризується тим, що вміст аміаку в крові вищий порівняно із цирозом, що корелює зі зростанням ризику смертності й тяжких ускладнень [6]. Це пояснюють тим, що при цирозі зберігається здатність незначної кількості гепатоцитів здійснювати детоксикацію аміаку, тоді як при гострому гепатиті такий процес стає абсолютно неможливим [7].

Крім того, при гострому гепатиті, зокрема індукованому гепатотоксичними речовинами, особливо негативного впливу зазнають мітохондрії, дисфункція яких призводить до порушення енергетичного метаболізму і розвитку оксидативного стресу з надмірним формуванням реактивних форм кисню та пероксинітриду. Індукція ізоензимів цитохрому P450 також є провідним чинником у розвитку оксидативного стресу та в ушкодженні клітин, що призводить до накопичення жовчних кислот і додаткового навантаження на гепатоцити. Внаслідок цього у клітинах печінки накопичуються ендотоксини, які ініціюють апоптоз, що активує міграцію нейтрофілів з подальшим розвитком ще інтенсивнішого ушкодження гепатоцитів через неконтрольоване запалення, спричинене надмірним продукуванням прозапальних цитокінів і хемокінів [8]. Отже, порушення мітохондріального дихання та ендотоксикоз є провідними патогенетичними ланками в механізмі виникнення гострого токсичного гепатиту, оскільки вони сприяють формуванню реактивних форм кисню і надмірному запаленню, що, врешті, може призвести до патологічного ремоделювання печінки.

У нашій попередній роботі [9] було встановлено, що при гострому токсичному ураженні печінки LOLA відновлює структуру органа та покращує його метаболічну функцію, запобігає цитолізу, холестази і проявляє виражену антиоксидантну дію.

Мета дослідження – встановити ефективність LOLA в попередженні ендотоксикозу, оцінити вплив препарату на процеси мітохондріального дихання при гострому токсичному ураженні печінки, індукованому тетрахлорметаном (CCl₄), та з'ясувати значення синтезу оксиду азоту в реалізації цих ефектів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проведено на 24 білих статевозрілих нелінійних щурах-самцях, яких утримували на стандартно-раціоні виварію Тернопільського національного

медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України. Умови їх утримання відповідали правилам, які рекомендовані Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Усі дослідження виконано згідно з Директивою Європейського Союзу 2010/10/63 ЕУ щодо експериментів на тваринах.

Експериментальних тварин з вихідною масою 170–180 г рандомізували методом випадкової вибірки. Усіх їх поділили на групи: контроль (n=6); гепатит (n=6); гепатит+LOLA (n=6); гепатит+LOLA+L-NAME (n=6).

Гострий токсичний гепатит моделювали шляхом одноразового внутрішньочеревного введення тетрахлорметану з розрахунку 2 г/кг маси тіла у вигляді 50 % олійного розчину на оливковій олії [10]. Тварини контрольної групи отримували ідентичний об'єм оливкової олії. Коригувальні чинники речовини вводили протягом 2 діб інтраперитонеально 1 раз на добу щоденно. Дослідження виконували на 3-тю добу.

Дози коригувальних речовин: LOLA (“Мерц Фарма ГмбХ і Ко.”) – 200 мг/кг маси тварини; N-нітро-L-аргінін метиловий ефір (L-NAME) (“Oldrich Chem Co”), конкурентний неселективний інгібітор синтезу NO [11], – по 10 мг/кг маси щура у вигляді 1 % водного розчину.

Біохімічні дослідження. Вміст гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) визначали за методом [12], церулоплазміну (ЦП) – за методом [13], активність цитохромоксидази (ЦХО) – за методом [14], сукцинатдегідрогенази (СДГ) – за методом [15], вміст молекул середньої маси (MCM₁ та MCM₂) – згідно з методикою [16].

Для статистичної обробки результатів використовували однофакторний дисперсійний аналіз за допомогою програми STATISTICA 10 (“StatSoft”, США). Дані представлено у вигляді M±m, де M – середня величина, а m – стандартна похибка середньої величини.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати нашого дослідження свідчать про те, що на 3-тю добу після моделювання гострого токсичного гепатиту лікування LOLA сприяло зменшенню проявів ендотоксикозу, покращувало показники мітохондріального дихання та відновлювало рівень ЦП. Ми вперше встановили, що ці ефекти LOLA проявляв через NO-залежний механізм.

Експериментальна модель із застосуванням CCl₄, яку ми використовували для моделювання гепатиту в щурів, відтворює основні біохімічні й гістопатологічні зміни, характерні для гострого ураження печінки в людей [17]. Тетрахлорметан чинить пряму руйнівну дію на гепатоцити і ви-

кликає їх некроз із наступним порушенням проникності клітинної мембрани, що індукує ап-регуляцію прозапальних медіаторів [18] та формування вільних радикалів із розвитком оксидативного стресу [19].

Відомо, що вільні радикали і реактивні форми кисню відіграють вирішальну роль у розвитку та прогресуванні захворювань печінки. Оксидативний стрес разом із пригніченням антиоксидантного захисту викликає надмірне ремоделювання тканин органа [20]. Неконтрольовані реакції пероксидного окиснення ліпідів є важливим патолофізіологічним механізмом виникнення ендогенної інтоксикації [21].

Результати даного дослідження свідчать про те, що вміст ГПЛ як первинних продуктів ліпопероксидації значно зростає при моделюванні гепатиту – на 72,64 %. За умов введення LOLA їх продукування достовірно пригнічувалося на 20,22 %, однак одночасне застосування L-NAME інгібувало цей ефект, оскільки вміст ГПЛ залишався на 31,51 % вищим (табл. 1).

Надмірне формування ГПЛ у щурів з гепатитом свідчить про посилену пероксидацію ліпідів та порушення антиоксидантних захисних механізмів [20]. Тому знижене їх продукування при лікуванні LOLA вказує на виражену антиоксидантну активність препарату, що підтверджує наші попередні результати [9].

При ураженні печінки різного генезу в організмі накопичуються не знешкоджені печінкою токсичні продукти катаболізму білків, ендотоксини [22]. Щоб дослідити вплив LOLA на прояви ендотоксикозу, ми визначали рівень середньомолекулярних пептидів.

Було встановлено, що вміст молекул середньої маси (MCM_1 та MCM_2) достовірно зростає під впливом CCl_4 – на 38,32 і 60,65 % відповідно. Лікування LOLA сприяло зниженню вмісту MCM_1 та MCM_2 на 16,88 і 25 %, проте при одночасному введенні L-NAME він залишався підвищеним на 22,92 та 37,33 % (див. табл. 1).

Наведені вище результати вказують на виражену здатність LOLA запобігати ендотоксикозу, зумовленому CCl_4 -індукованим гепатитом. Такі властивості препарату реалізуються через NO-залежний механізм, оскільки інгібування

NOS, індуковане L-NAME, реверсувало всі ці ефекти.

При активації процесів пероксидації ліпідів забезпечення енергією більшості гепатоцитів знижується через розмежування дихання та оксидативного фосфорилування в мітохондріях [23], які є основними мішенями для гепатотоксичних ефектів багатьох речовин. Дисфункція цих органел викликає порушення енергетичного метаболізму та ініціює внутрішньоклітинний оксидативний стрес [20].

Цитохромоксидазу вважають кінцевим ензимом у мітохондріальному електронтранспортному ланцюгу, вона слугує для перенесення електронів, а її знижена активність відображає порушення енергетичного метаболізму [24].

Було встановлено, що при моделюванні токсичного гепатиту активність ЦХО пригнічувалася на 25 %, проте у групі пролікованих LOLA щурів спостерігали її зростання на 8,85 %. Застосування L-NAME реверсувало ефект LOLA, знижуючи активність ензиму на 7,66 % (табл. 2).

Зниження активності ЦХО, зумовлене CCl_4 -індукованим гепатитом, свідчить про порушення функції електронтранспортного ланцюга, що призводить до зменшення утилізації кисню тканинами. Це, у свою чергу, може підвищувати потребу гепатоцитів у енергії та посилювати ушкодження печінки [24]. Тому той факт, що LOLA підвищує активність ЦХО при ураженні печінки, дає можливість припустити його потенційну ефективність у відновленні мітохондріального дихання.

Сукцинатдегідрогеназа також відіграє важливу роль у функціонуванні електронтранспортного ланцюга та, будучи одним із основних його компонентів, бере участь у синтезі АТФ. Тому будь-яке порушення активності ензиму може негативно впливати на потік електронів у дихальному ланцюгу [24], що призводить до утворення шкідливих активних форм кисню, особливо за патологічних обставин. Сукцинатдегідрогеназа також є каталізатором окиснення сукцинату у фумарат у циклі трикарбонових кислот і бере участь у формуванні запальної відповіді [25].

Активність СДГ у нашому дослідженні була знижена на 23,46 % після введення щурам CCl_4 .

Таблиця 1 – Показники ендотоксикозу в щурів з гепатитом, індукованим тетрахлорметаном, при застосуванні L-орнітину L-аспартату і N-нітро-L-аргінін метилового ефіру

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит+LOLA	Гепатит+LOLA+L-NAME
ГПЛ, Од/г	1,77±0,14	3,05±0,13***	2,43±0,13 ^s	3,20±0,13 ^{##}
MCM_1 , Од/г	0,28±0,01	0,39±0,01***	0,32±0,01 ^{ss}	0,39±0,02 [#]
MCM_2 , Од/г	0,42±0,01	0,67±0,02***	0,51±0,01 ^{sss}	0,69±0,02 ^{###}

Примітка. *** $p < 0,001$ – проти групи контролю; ^s $p < 0,05$, ^{ss} $p < 0,01$, ^{sss} $p < 0,001$ – проти групи гепатиту; [#] $p < 0,05$, ^{##} $p < 0,01$, ^{###} $p < 0,001$ – проти лікування LOLA.

Застосування LOLA сприяло достовірному підвищенню активності ензиму на 5,42 %, однак одночасне введення L-NAME викликало інгібування цього ефекту (див. табл. 2).

Пригнічення активності СДГ при індукуванні токсичного гепатиту ініціює оксидативний стрес, який, окрім прямого ушкодження тканин, відіграє важливу роль у регуляції процесів запалення та апоптозу через активацію транскрипційних факторів і надмірне виділення прозапальних цитокінів [25]. Тому здатність відновлювати нормальну активність СДГ підтверджує антиоксидантні властивості LOLA та частково свідчить про протизапальну дію препарату.

Пригнічення ефективності LOLA відносно ЦХО та СДГ при одночасному застосуванні L-NAME свідчить про те, що нормальна активність NOS є критично необхідною в реалізації протективних ефектів препарату при розладах мітохондріального дихання. Такі результати доводять NO-залежний механізм дії LOLA.

Церулоплазмін є глікопротеїном, що продукується гепатоцитами, який відповідає за транспортування міді у крові та проявляє виражену антиоксидантну дію, пригнічуючи пероксидацію

ліпідів через елімінацію супероксид-аніонів. Відомо, що рівень ЦП при хронічному гепатиті слугує маркером печінкового фіброзу [26]. Однак при гострому гепатиті він підвищується, що прямо корелює з інтенсивністю запального процесу [27].

Результати нашого дослідження свідчать про значне зростання вмісту ЦП за умов гострого гепатиту – на 31,94 %, що підтверджує раніше опубліковані дані [27, 28]. Лікування LOLA викликало його зниження на 14,48 %, однак одночасне застосування L-NAME запобігало цьому ефекту, і рівень ЦП залишався на 15,34 % вищим (див. табл. 2).

Зростання концентрації ЦП при гострому гепатиті можна пояснити як вивільненням вмісту гепатоцитів унаслідок цитолізу з одного боку, так і активацією протеїнів гострої фази запалення [28], що стимулюється цитокінами та гормонами стресу [27], які відіграють критичну роль у розвитку надмірного запалення і фіброзу [23]. Тому зниження рівня ЦП під впливом LOLA свідчить як про пригнічення цитолізу, так і про потенційну протизапальну дію, а реалізуються ці ефекти через NO-залежний шлях.

Таблиця 2 – Показники антиоксидантної системи в щурів з гепатитом, індукованим тетрахлорметаном, при застосуванні L-орнітину L-аспартату і N-нітро-L-аргінін метилового ефіру

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит+LOLA	Гепатит+LOLA+L-NAME
СДГ, мкмоль/хв/кг	8,85±0,10	6,78±0,11***	7,14±0,08 [§]	6,51±0,23 [#]
ЦХО, ммоль/кг	8,80±0,27	6,60±0,17***	7,18±0,16 [§]	6,63±0,12 [#]
ЦП, мг/л	244,27±4,18	322,29±10,10***	275,63±10,13 [§]	317,92±12,29 [#]

Примітка. ***p<0,001 – проти групи контролю; [§]p<0,05 – проти групи гепатиту; [#]p<0,05 – проти лікування LOLA.

ВИСНОВКИ. 1. L-орнітин L-аспартат запобігає ендотоксикозу, зумовленому CCl₄-індукованим гепатитом, зменшуючи вміст молекул середньої маси та гідропероксидів ліпідів.

2. L-орнітин L-аспартат підвищує активність цитохромоксидази і сукцинатдегідрогенази при гострому токсичному ураженні печінки, дає можливість припустити його потенційну ефективність у відновленні мітохондріального дихання.

3. L-орнітин L-аспартат знижує концентрацію церулоплазміну при гострому гепатиті, що

свідчить як про пригнічення цитолізу, так і про потенційну протизапальну дію препарату.

4. Перелічені вище ефекти L-орнітину L-аспартату реалізуються через NO-залежний механізм, оскільки інгібування синтази оксиду азоту, індуковане N-нітро-L-аргінін метиловим ефіром, реверсує всі ці ефекти.

Перспективи подальших досліджень – встановити вплив L-орнітину L-аспартату на синтез поліамінів при гострому токсичному гепатиті.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Efficacy of L-ornithine-L-aspartate as an adjuvant therapy in cirrhotic patients with hepatic encephalopathy / S. Abid, W. Jafri, K. Mumtaz [et al.] // *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*. – 2011. – No. 21. – P. 666–671.
2. Efficacy of L-ornithine L-aspartate in acute liver failure: A double-blind, randomized, placebo-controlled study / S. Acharya, V. Bhatia, V. Sreenivas [et al.] // *Gastroenterology*. – 2009. – No. 136. – P. 2159–2168.
3. Hepatotoxicity implies chemical-driven liver damage induced by certain medicinal and other chemical agents / M. Bakheet, H. Haredy, A. Abdesalam, H. Khalifa // *American Research Journal of Pharmacy*. – 2015. – No. 1. – P. 1–27.
4. Arterial ammonia and clinical risk factors for encephalopathy and intracranial hypertension in acute liver failure / W. Bernal, C. Hall, C. Karvellas [et al.] // *Hepatology*. – 2007. – No. 46. – P. 1844–1852.
5. Experimental cirrhosis: liver morphology and function / V. Datsko, L. Fedoniuk, Y. Ivankiv [et al.] // *Wiadomosci Lekarskie*. – 2020. – No. 73. – P. 947–952.
6. Experimental models for hepatic encephalopathy / D. Díaz-Gómez, M. Jover, J. Del-Campo [et al.] // *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. – 2011. – No. 103. – P. 536–541.
7. Impaired mitochondrial energy metabolism and kinetic properties of cytochrome oxidase following acute aluminium phosphide exposure in rat liver / R. Dua, A. Sunkaria, V. Kumar, K. Gill. // *Food and Chemical Toxicology*. – 2010. – No. 48. – P. 53–60.
8. Ijaz S. The role of nitric oxide in the modulation of hepatic microcirculation and tissue oxygenation in an experimental model of hepatic steatosis / S. Ijaz, W. Yang, S. Winslet // *Microvascular Researc*. – 2005. – No. 70. – P. 129–136.
9. Mechanisms of hepatotoxicity / H. Jaeschke, G. Gores, A. Cederbaum [et al.] // *Toxicological Sciences*. – 2002. – No. 166 (2). – P. 65.
10. Jan V. Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase / V. Jan, G. Valacchi // *Mediators of Inflammation*. – 2012. – P. 1–22.
11. Jasim R. Evaluation of oxidative-antioxidative balance in serum of patients with non acute hepatitis virus type B / R. Jasim // *International Conference on Chemistry and Chemical Process*. – 2012. – No. 10. – P. 237–244.
12. Serum ceruloplasmin can predict liver fibrosis in hepatitis B virusinfected patients / N. L. Kang, J. M. Zhang, M. X. Lin [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2020. – No. 26. – P. 3952–3962.
13. Lopez-Avila V. Ceruloplasmin levels in human sera from various diseases and their correlation with patient's age and gender / V. Lopez-Avila, W. H. Robinson, K. Lokits // *Health*. – 2009. – No. 1. – P. 104–110.
14. Galanin promotes autophagy and alleviates apoptosis in the hypertrophied heart through FoxO1 pathway / I. Martinelli, A. Timotin, P. Moreno-Corchado [et al.] // *Redox Biology*. – 2021. – No. 40. – P. 101866.
15. Oleshchuk O. M. The impact of modulators of nitric oxide synthesis on biochemical indices of liver in rats / O. M. Oleshchuk // *Fiziolohichnyi Zhurnal Kiev, Ukraine* : 1994. – 2014. – № 60. – С. 57–62
16. Hepatoprotective effects of L-ornithine-L-aspartate in toxic liver injury / O. M. Oleshchuk, V. A. Datsko, H. Y. Loi [et al.] // *Pharmacology Online*. – 2021. – No. 3. – P. 146–155.
17. L-ornithine-L-aspartate lowers plasma and cerebrospinal fluid ammonia and prevents brain edema in rats with acute liver failure / C. Rose, A. Michalak, K. Rao [et al.] // *Hepatology*. – 1999. – No. 30. – P. 636–640.
18. S. Janakat H. A. Optimization of the dose and route of injection, and characterization of the time course of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat / S. Janakat // *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. – 2002. – No. 48. – P. 41–44.
19. Effects of ornithine aspartate on plasma ammonia and plasma amino acids in patients with cirrhosis / U. Staedt, H. Leweling, R. Gladisch [et al.] // *Journal of Hepatology*. – 1993. – No. 19. – P. 424–430.
20. A new enteral diet, MHN-02, which contains abundant antioxidants and whey peptide, protects against carbon tetrachloride-induced hepatitis / T. Takayanagi, H. Sasaki, A. Kawashima [et al.] // *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. – 2011. – No. 35. – P. 516–522.
21. Vela C. Efficacy of oral L-ornithine L-aspartate in cirrhotic patients with hyperammonemic hepatic encephalopathy / C. Vela, J. Ramírez // *Annals of Hepatology*. – 2011. – 10, No. 2. – P. 55–59.
22. Succinate dehydrogenase inhibitor dimethyl malonate alleviates LPS/d-galactosamine-induced acute hepatic damage in mice / Y. Yang, R. Shao, L. Tang [et al.] // *Innate Immunity*. – 2019. – No. 25. – P. 522–529.
23. Гаврилов В. Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В. Б. Гаврилов, М. И. Мишкорудная // *Лаб. дело*. – 1983. – № 3. – С. 33–35.
24. Ещенко Н. Д. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы / Н. Д. Ещенко, Г. Г. Вольский // *Методы биохимических исследований*. – Л. : Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. – С. 207–210.
25. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 1982. – 366 с.
26. Кривченкова Р. С. Метод определения активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий // *Современные методы в биохимии* / Р. С. Кривченкова ; под ред. В. Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1977. – С. 47–49.
27. Лифшиц Р. И. Роль среднемолекулярных пептидов крови в развитии кардиодепрессии при термических ожогах / Р. И. Лифшиц, Б. Н. Вальдман // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* – 1986. – № 101. – С. 280–282.
28. Худан Р. І. Зміни показників пероксидного окиснення ліпідів за умови ліпополісахаридіндукованого пародонтиту без супутньої патології і на тлі хронічної тіолактонової гіпергомостестіемії / Р. І. Худан, М. М. Корда // *Clinical Dentistry*. – 2021. – № 3. – С. 48–58.

REFERENCES

1. Abid, S., Jafri, W., Mumtaz, K., Islam, M., Abbas, Z., Shah, H. A., & Hamid, S. (2011). Efficacy of L-ornithine-L-aspartate as an adjuvant therapy in cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, 21 (11), 666-671. Retrieved from: <https://doi.org/11.2011/JCPSP.666671>
2. Acharya, S.K., Bhatia, V., Sreenivas, V., Khanal, S., & Panda, S.K. (2009). Efficacy of L-ornithine L-aspartate in acute liver failure: A double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Gastroenterology*, 136 (7), 2159-2168. Retrieved from: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.050>
3. Bakheet, M.S., Haredy, H.H., Abdesalam, A., & Khalifa, H. (2015). Hepatotoxicity implies chemical-driven liver damage induced by certain medicinal and other chemical agents. *American Research Journal of Pharmacy*, 1 (2), 1-27. Retrieved from: <https://doi.org/10.21694/2380-5706.15001>
4. Bernal, W., Hall, C., Karvellas, C., Auzinger, G., Sizer, E., & Wendon, J. (2007). Arterial ammonia and clinical risk factors for encephalopathy and intracranial hypertension in acute liver failure. *Hepatology*, 46 (6), 1844-1852. Retrieved from: <https://doi.org/10.1002/hep.21838>
5. Datsko, V., Fedoniuk, L.Y., Ivankiv, Y.I., Kurylo, K.I., Volska, A.S., Malanchuk, S.L., & Oleshchuk, O.M. (2020). Experimental cirrhosis: liver morphology and function. *Wiadomosci Lekarskie*, 73 (5), 947-952. Retrieved from: <https://doi.org/10.36740/wlek202005120>
6. Díaz-Gómez, D., Jover, M., del-Campo, J.A., Galindo, A., & Romero-Gómez, M. (2011). Experimental models for hepatic encephalopathy. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 103 (10), 536-541. Retrieved from: <https://doi.org/10.4321/s1130-01082011001000006>
7. Dua, R., Sunkaria, A., Kumar, V., & Gill, K.D. (2010). Impaired mitochondrial energy metabolism and kinetic properties of cytochrome oxidase following acute aluminium phosphide exposure in rat liver. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (1), 53-60. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.014>
8. Ijaz, S., Yang, W., Winslet, M., & Seifalian, A. (2005). The role of nitric oxide in the modulation of hepatic microcirculation and tissue oxygenation in an experimental model of hepatic steatosis. *Microvascular Research*, 70 (3), 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2005.08.001>
9. Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D., & Lemasters, J.J. (2002). Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 65 (2), 166-176. Retrieved from: <https://doi.org/10.1093/toxsci/65.2.166>
10. Jan, V., & Valacchi, G. (2012). Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase. *Mediators of Inflammation*, 2012, 1-22. Retrieved from: <https://doi.org/10.1155/2012/318087>
11. Jasim, R.H. (2011). Evaluation of oxidative-antioxidative balance in serum of patients with non acute hepatitis virus type B. *International Conference on Chemistry and Chemical Process*, 10, 237-244.
12. Kang, N.L., Zhang, J.M., Lin, M.X., Chen, X.D., Huang, Z.X., Zhu, Y.Y., ... Zeng, D.W. (2020). Serum ceruloplasmin can predict liver fibrosis in hepatitis B virus-infected patients. *World Journal of Gastroenterology*, 26 (27), 3952-3962. Retrieved from: <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i27.3952>
13. Lopez-Avila, V., H. Robinson, W., & Lokits, K. (2009). Ceruloplasmin levels in human sera from various diseases and their correlation with patient's age and gender. *Health*, 1 (2), 104-110. Retrieved from: <https://doi.org/10.4236/health.2009.12017>
14. Martinelli, I., Timotin, A., Moreno-Corchado, P., Marsal, D., Kramar, S., Loy, H., ... Kunduzova, O. (2021). Galanin promotes autophagy and alleviates apoptosis in the hypertrophied heart through FoxO1 pathway. *Redox Biology*, 40, 101866. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101866>
15. Oleshchuk, O.M. (2014). The impact of modulators of nitric oxide synthesis on biochemical indices of liver in rats. *Fiziolohichnyi Zhurnal Kiev, Ukraine : 1994*, 60 (2), 57-62. Retrieved from: <https://doi.org/10.15407/fz60.02.057>
16. Oleshchuk, O.M., Datsko, V.A., Loi, H.Ya., Datsko, T.V. Mudra, A.Ye., Malanchuk, S.L., ... Fedoniuk, L.Ya. (2021). Hepatoprotective effects of L-ornithine-L-aspartate in toxic liver injury. *Pharmacology Online*, 3, 146-155.
17. Rose, C., Michalak, A., Rao, K.V., Quack, G., & Kircheis, G.B.R. (1999). L-ornithine-L-aspartate lowers plasma and cerebrospinal fluid ammonia and prevents brain edema in rats with acute liver failure. *Hepatology*, 30 (3), 636-640.
18. S. Janakat, H.A. (2002). Optimization of the dose and route of injection, and characterization of the time course of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 48 (1), 41-44.
19. Staedt, U., Leweling, H., Gladisch, R., Kortsik, C., & Hagmüller, E.H.E. (1993). Effects of ornithine aspartate on plasma ammonia and plasma amino acids in patients with cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 19 (3), 424-430.
20. Takayanagi, T., Sasaki, H., Kawashima, A., Mizuochi, Y., Hirate, H., Sugiura, T., ... Sobue, K. (2011). A new enteral diet, MHN-02, which contains abundant antioxidants and whey peptide, protects against carbon tetrachloride-induced hepatitis. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 35 (4), 516-522. Retrieved from: <https://doi.org/10.1177/0148607110381599>
21. Vela, C.I.B., & Ramírez, J.L.P. (2011). Efficacy of oral L-ornithine L-aspartate in cirrhotic patients with hyperammonemic hepatic encephalopathy. *Annals of Hepatology*, 10 (2), 55-59. Retrieved from: [https://doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)31608-4](https://doi.org/10.1016/s1665-2681(19)31608-4)
22. Yang, Y., Shao, R., Tang, L., Li, L., Zhu, M., Huang, J., ... Zhang, L. (2019). Succinate dehydrogenase inhibitor dimethyl malonate alleviates LPS/d-galactosamine-induced acute hepatic damage in mice. *Innate Immunity*, 25 (8), 522-529. <https://doi.org/10.1177/1753425919873042>
23. Gavrilov, V.B., & Mishkorudnaja, M.I. (1983). Spectrophotometric determination of the content of lipid hydroperoxides in blood plasma. *Lab. Work*, 3, 33-36 [in Russian].
24. Eshhenko, N.D., & Volskii, G.G. (1982). Determination of the amount of succinic acid and activity of succinate dehydrogenase. *Methods of biochemical research*. Leningrad: Izd-vo Leningradskogo Universiteta [in Russian].
25. Kolb, V.G. & Kamyshnikov, V.S. (1982). *Guidelines on Clinical Chemistry*. Minsk: Belarus [in Russian].

26. Krivchenkova, R.S., & Orehovich, V.N. (1977). Determination of cytochrome oxidase activity in mitochondrial suspension. *Modern Methods in Biochemistry*. Moscow: Meditsina [in Russian].

27. Lyfshits, R.I., & Valdman, B.N. (1986). The role of medium molecular blood peptides in the development of cardiodepression in thermal burns. *Bulletin of Experim. Biol. i Med.*, 101 (3), 280-282 [in Russian].

28. Hudan, R.I., & Korda, M.M. (2021). Changes in lipid peroxidation in lipopolysaccharide-induced periodontitis without concomitant pathology and on the background of chronic thiolactone hyperhomocysteinemia. *Clinical Dentistry*, 3, 48-58. Retrieved from: <https://doi.org/10.11603/2311-9624.2021.3.12463>

V. A. Datsko, O. M. Oleshchuk, H. Ya. Loi, M. P. Klantsa, T. V. Datsko, M. I. Lukaniuk,
V. V. Cherniashova, A. Z. Nychyk, Ya. I. Ivankiv, V. P. Pyda, A. V. Chornomydz
I. HORBACHEVSKY TERNOPIL NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

EFFICACY OF L-ORNITHIN L-ASPARATE IN THE PREVENTION OF ENDOTOXICOSIS AND MITOCHONDRIAL RESPIRATORY DISFUNCTION IN ACUTE TOXIC HEPATITIS

Summary

Introduction. The study of the mechanisms of action of L-ornithine L-aspartate (LOLA) in acute toxic hepatitis still remains as an actual problem. Mitochondrial respiratory disorders and endotoxycosis are known to be the leading pathogenetic causes in the mechanism of acute toxic hepatitis, as they contribute to the formation of reactive oxygen species and excessive inflammation, which can eventually lead to pathological liver remodeling.

The aim of the study – to determine the effectiveness of LOLA in preventing endotoxycosis and the impact of the drug on mitochondrial respiration in acute toxic liver disease induced by carbon tetrachloride (CCl₄), and to investigate the importance of NO synthesis in these effects.

Research Methods. The study was performed on 24 white adult male rats. Acute toxic hepatitis was induced by a single intraperitoneal administration of carbon tetrachloride (2 g/kg). Corrective agents were administered for 2 days. The study was performed on the third day. LOLA was administered at a dose of 200 mg/kg of body weight, N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) – 10 mg/kg. Determination of the content of lipid hydroperoxides (LPO), ceruloplasmin (CP), medium mass molecules (MMM₁ and MMM₂), cytochrome oxidase activity, succinate dehydrogenase was performed according to standard methods.

Results and Discussion. In acute toxic hepatitis, the content of LPO increased by 72.64 %, MMM₁ and MMM₂ – by 38.32 % and 60.65 %, respectively, CP – by 31.94 %. After LOLA administration, the production of LPO was suppressed by 20.22 %, the content of MMM₁ and MMM₂ decreased by 16.88 % and 25 %, CP – by 14.48 %. In CCl₄-induced hepatitis, the activity of cytochrome oxidase was suppressed by 25 % and succinate dehydrogenase by 23.46 %. In the group of treated LOLA rats there was an increase in the activity of these enzymes by 8.85 % and 5.42 %, respectively. Concomitant use of L-NAME inhibited all the effects of LOLA, as the content of LPO remained 31.51 % higher, MMM₁ and MMM₂ – 22.92 % and 37.33 % higher, CP – 15.34 % higher, while the activity of cytochrome oxidase decreased by 7.66 %, and succinate dehydrogenase activity reduced by 8.82 %.

Conclusions. LOLA prevents endotoxycosis caused by CCl₄-induced hepatitis and is potentially effective in restoring mitochondrial respiration. These effects of LOLA are realized through a NO-dependent mechanism.

KEY WORDS: L-ornithine L-aspartate; endotoxycosis; mitochondrial respiration; nitric oxide.

Отримано 12.01.22

Адреса для листування: О. М. Олещук, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: oleshchuk@tdmu.edu.ua.