

## ЗМІНИ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ СТАНУ ПЕЧІНКИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦИРОЗІ ТА ЗА ДІЇ МОДУЛЯТОРІВ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ

*Досліджували функціональний стан печінки при  $CCl_4$ -індукованому експериментальному цирозі та за дії L-аргініну й аміногуанідину. Встановлено активацію процесів цитолізу і холестази (підвищення активності аланін- і аспартатамінотрансферази, лужної фосфатази), порушення рівноваги у функціонуванні прооксидантно-антиоксидантної системи (зменшення активності супероксиддисмутази, каталази, вмісту відновленого глутатіону, церулоплазміну, зростання рівня гідропероксидів ліпідів та ТБК-активних продуктів), електронно-транспортного ланцюга мітохондрій (зниження активності сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази), збільшення вмісту нітрит-аніона в крові та його зменшення у печінці, зростання рівня прозапальних цитокінів (фактора некрозу пухлин- $\alpha$ , інтерлейкіну-1 $\beta$ , інтерлейкіну-6) в сироватці крові при цирозі печінки. Застосування попередника оксиду азоту L-аргініну при експериментальному цирозі приводить до поліпшення функціонального стану печінки, на що вказують зниження активності процесів ліпопероксидації, активація системи антиоксидантного захисту, зростання активності мітохондріальних ферментів у печінці, зниження рівня досліджуваних цитокінів. Блокування при експериментальному цирозі індукованого синтезу NO аміногуанідином приводить до часткового усунення проявів оксидативного стресу та порушень функціонального стану печінки.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** печінка, тетрахлорметан, цироз, оксид азоту, L-аргінін, аміногуанідин.

**ВСТУП.** Цироз печінки (ЦП) – хронічний поліетіологічний дифузний патологічний процес, який характеризується загибеллю метаболічно активних гепатоцитів, розростанням сполучної тканини (фіброзом) із порушенням архітекτονіки печінки: утворенням вузлів-регенерантів, судинних анастомозів – поза- і внутрішньопечінкових портокавальних шунтів. Справжнє поширення цирозу печінки та смертність від нього сильно відрізняються в різних країнах і мають тенденцію до збільшення. За останні 10 років у розвинених країнах частота цирозів збільшилась на 10–15 %, а в деяких з них (Німеччина, Швеція) – у 2,5 рази. Дані щодо смертності від цирозів також не однозначні (від 8 до 80 на 100 тис.) [12]. Щодо України, то за останні декілька років захворюваність на цироз печінки зросла на 44,8 % [11].

В патогенезі розвитку цього захворювання важливого значення надають розвитку оксидативного стресу. ЦП супроводжується гіперпродукуванням активних форм кисню (АФК) – супероксидних ( $O_2^{\cdot-}$ ), пероксидних та гідропероксидних радикалів, оксиду азоту (NO). АФК проявляють виражений токсичний і прямий пошкоджувальний вплив відповідно до

© О. М. Олещук, 2012.

стадії розвитку патологічного процесу [27]. Пошкоджувальній дії АФК протистоїть антиоксидантна система (АОС), яка попереджує утворення, забезпечує зв'язування і модифікацію вільних радикалів, руйнування пероксидів та ін. Оцінка стану прооксидантно-антиоксидантної системи має важливе діагностичне та прогностичне значення за умов цирозу [25].

Однією з важливих ланок, що відіграють роль у механізмах ураження печінки при її цирозі, є система L-аргінін–оксид азоту. NO синтезується в організмі людини і тварин з амінокислоти L-аргініну з участю цитохром P-450-подібних гемопротеїнів – NO-синтаз (NOS) за присутності  $O_2$  з використанням НАДФН як джерела електронів. На даний час ідентифіковано три ізоформи NOS: eNOS (ендотеліальна), nNOS (нейрональна), iNOS (індуцибельна). Хоча всі ізоформи NOS каталізують утворення NO, кожна з них має свої особливості як у механізмах дії та локалізації, так і в біологічному значенні для організму. Перші дві, конститутивні, NO, що утворюються під їх впливом, діють як переносники в ряді фізіологічних відповідей, відіграючи регуляторну роль. iNOS, яка активується під впливом прозапальних цитокінів, ендотоксинів, оксидантів,

бактеріальних ліпополісахаридів, зумовлює виділення великої кількості NO [3].

За ЦП  $O_2^- \cdot$ , який генерується при роз'єднанні мітохондріального дихального ланцюга, а також з участю таких ферментів, як ксантиноксидаза, НАН(P)Н-оксидаза, цх Р-450, окиснює NO в ендотелії судин і таким чином порушує ендотеліальну функцію та процеси регенерації ендотеліальних клітин. При недостатності субстратів L-аргініну та кофактора тетрагідробіоптерину NOS може роз'єднуватися і теж синтезувати  $O_2^- \cdot$ . Пероксид водню, який утворюється при дисмутації  $O_2^- \cdot$  з участю антиоксидантного ферменту супероксиддисмутази (СОД), є субстратом для лейкоцитарної мієлопероксидази, яка, у свою чергу, каталізує окиснення NO. На тлі зниженої при цирозі активності СОД  $O_2^- \cdot$  взаємодіє з NO з утворенням високотоксичного пероксинітриду. Останній атакує біомолекули судинного ендотелію, мембрани гепатоцитів шляхом порушення фосфорилювання тирозину, активації протеолізу білків та порушення функції цілого ряду білків [29]. Доведено також, що гіперпродукування  $ONOO^-$  супроводжується зменшенням транспорту L-аргініну в ендотеліальні клітини, синтезу та біодоступності NO.  $O_2^- \cdot$  сам по собі може інтенсивно гальмувати активність ендотеліальної NOS [20].

Важливе значення в патогенезі ЦП мають порушення системної гемодинаміки (наростання внутрішньопечінкового опору, посилення портального кровотоку), в регуляції яких оксид азоту відіграє велику роль [22]. Дані літератури щодо ролі системи оксиду азоту в механізмах розвитку циротичного ураження печінки є недостатніми і доволі суперечливими. Тому метою даного дослідження було вивчити деякі показники прооксидантно-антиоксидантної системи, електронно-транспортної системи дихального ланцюга та цитокинового профілю при експериментальному  $CCl_4$ -індукованому цирозі печінки в щурів на фоні активації та пригнічення синтезу оксиду азоту.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Дослідження проводили на 24 нелінійних білих щурах-самцях лінії Вістар масою 170–210 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Експерименти виконували відповідно до Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених на I Національному конгресі з біоетики (Київ, 2000) та узгоджених з положенням Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Піддослідних тварин було поділено на

4 групи: 1-ша (контроль) – тварини, яким вводили відповідний об'єм ізотонічного розчину; 2-га – тварини з експериментально змодельованим цирозом печінки; 3-тя і 4-та – тварини із цирозом печінки, яким, відповідно, вводили L-аргінін ("Sigma", США) та аміногуанідин ("Хімлаборреактив", Україна).

Цироз печінки моделювали за методикою, описаною S. Kurabe et al. (1991) [26]. 50 % розчин тетрахлорметану вводили перорально двічі на тиждень протягом 3-х місяців з розрахунку 2 мл на 1 кг маси тварини. Як модулятори NO використовували попередник синтезу NO L-аргінін та селективний блокатор iNOS аміногуанідин внутрішньочеревно повторно впродовж 7 днів у дозі 25 і 10 мг/кг маси тіла відповідно після завершення моделювання ЦП. Коригувальні речовини вводили інтраперитонеально 1 раз на добу щоденно протягом 7 днів. Тварини контрольної групи отримували ідентичний об'єм ізотонічного розчину. По 6 щурів із кожної групи за умов кетамінового наркозу (внутрішньочеревне введення з розрахунку 75 мг/кг маси тіла тварини) виводили з експерименту через 7 діб від початку введення коригувальних чинників.

Для дослідження використовували гомогенати печінки та сироватку крові. Печінку охолоджували у середовищі виділення, яке містило 0,25 М сахарози, 1 мМ EDTA та 10 мМ трис-НСІ-буфера (рН 7,4). Готували 10 % гомогенати органів, охолоджену наважку (1 г) гомогенізували у скляному гомогенізаторі зі слабопритертим тефлоновим поршнем. Активність СОД (1.15.1.1) визначали за ступенем зниження відновлення нітротетразолію синього за присутності NADH і феназинметасульфату [15]. Активність каталази (КАТ, 1.11.1.6) встановлювали згідно з методом [8], фіксуючи зміну оптичного поглинання внаслідок реакції пероксиду водню з молібдатом амонію. Вміст відновленого глутатіону (GSH) визначали за здатністю його вільних SH-груп взаємодіяти з 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойною кислотою з утворенням тіо-нітрофенільного аніона, кількість якого прямо пропорційна вмісту GSH [19]. Вміст церулоплазміну визначали за здатністю окиснення п-фенілендіаміну за його присутності утворювати забарвлені продукти [6]. Рівень продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів визначали за вмістом гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) [2]. Метод ґрунтується на здатності екстрагованих гептан-ізопропіловою сумішшю ГПЛ інтенсивно поглинати світло при довжині хвилі 232 нм та визначенні ТБК-активних продуктів (ТБП) [1] в реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою. Стан енергозабезпечувальних процесів

мітохондрій оцінювали за активністю сукцинат-дегідрогенази (СДГ, 1.3.99.1) та цитохромоксидази (ЦХО, 1.9.3.1.). Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування 10 % гомогенату печінки. Мітохондріальну фракцію одержували, центрифугуючи без'ядерний супернатант протягом 10 хв при 6500 об./хв. Одержаний осад мітохондрій ресуспендували в середовищі виділення. Всі операції проводили на холоді. Активність СДГ визначали за відновленням фериціаніду калію до фероціаніду сукцинатом під дією СДГ [4]. Принцип методу визначення ЦХО ґрунтується на здатності останньої окиснювати диметил-пара-фенілендіамін і  $\alpha$ -нафтол з утворенням індофенолового синього [14]. Про вміст NO у гомогенатах органів робили висновок за кількістю його стабільних метаболітів: нітрит-аніона ( $\text{NO}_2^-$ ), який визначали методом L. C. Green et al. за даними кольорової реакції з реактивом Гріса [16] на спектрофотометрі СФ-46, та нітрат-аніона ( $\text{NO}_3^-$ ). Відновлення нітратів до нітритів здійснювали металічним цинком в оцтовокислому розчині з наступним колориметричним визначенням [5].

У сироватці крові імуноферментним методом ELISA (використовуючи стандартний набір реактивів фірми "Uncon Life Science Inc.") визначали концентрацію фактора некрозу пухлин- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), інтерлейкіну-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), інтерлейкіну-6 (IL-6); активність аспартатамінотрансферази (АсАТ, 2.6.1.1), аланінамінотрансферази (АлАТ, 2.6.1.2), лужної фосфатази (ЛФ, 3.1.3.1), вміст сечовини, застосовуючи стандартні набори реактивів ТОВ НВП "Філісіт-Діагностика" (Україна).

Статистичну обробку одержаних даних виконували за допомогою програм "Origin 7.5" (OriginLab Corp., США) та "Microsoft Excel XP".

Порівняння отриманих величин проводили з використанням t-критерію Стьюдента та методом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Зміни вважали достовірними при  $p \leq 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** У результаті проведених досліджень встановлено, що при експериментальному цирозі, викликаному тривалим введенням тетрахлорметану, спостерігається зростання в сироватці крові активності ферментів, які є маркерами ураження печінки. Так, активність АлАТ, АсАТ, ЛФ перевищувала показники контрольної групи тварин у 3,4, 2,9 та 1,3 раза відповідно, що свідчило про розвиток гепатопатії з проявами цитолізу і холестазу (табл. 1).

Вміст сечовини у сироватці крові знижувався на 33,3 %, що вказувало на порушення аргіназного синтезу сечовини в печінці при даному типі ураження (табл. 1).

Встановлено, що за даних патологічних умов активуються процеси переокиснення ліпідів (ПОЛ), про що свідчило зростання в ураженому органі та крові вмісту ТБП (на 56,1 і 94,1 % відповідно) та ГПЛ у печінці (на 94,1 %) порівняно з контрольною групою тварин. Результати наших досліджень узгоджуються з даними інших науковців [13], які встановили збільшення вмісту продуктів ліпопероксидації при цирозі печінки (табл. 2).

Згідно із сучасними уявленнями, інтенсифікація ПОЛ поєднується зі змінами антирадикального захисту, що проявляється дисрегуляцією в системі прооксиданти-антиоксиданти. У результаті проведених досліджень встановлено зниження активності та вмісту компонентів АОС у печінці. Так, активність СОД зменшувалась у гомогенатах печінки на 37,3 %, функ-

Таблиця 1 – Біохімічні показники сироватки крові при введенні модуляторів синтезу оксиду азоту при цирозі печінки ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Показник	Група тварин			
	контроль	цироз	цироз+L-аргінін	цироз+аміногуанідин
АлАТ, ммоль/(л·год)	0,47 $\pm$ 0,11	1,59 $\pm$ 0,06 $p < 0,001$	1,10 $\pm$ 0,09 $p < 0,01$ $p_1 < 0,001$	1,17 $\pm$ 0,06 $p < 0,001$ $p_1 < 0,01$
АсАТ, ммоль/(л·год)	1,63 $\pm$ 0,16	4,80 $\pm$ 0,17 $p < 0,001$	2,87 $\pm$ 0,17 $p < 0,01$ $p_1 < 0,001$	4,33 $\pm$ 0,11 $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$
ЛФ, ммоль/(л·год)	2,37 $\pm$ 0,08	3,16 $\pm$ 0,05 $p < 0,001$	2,88 $\pm$ 0,05 $p < 0,001$ $p_1 < 0,01$	3,25 $\pm$ 0,15 $p < 0,001$ $p_1 < 0,5$
Сечовина, ммоль/л	5,03 $\pm$ 0,12	3,35 $\pm$ 0,13 $p < 0,001$	4,95 $\pm$ 0,07 $p > 0,05$ $p_1 < 0,001$	3,80 $\pm$ 0,11 $p < 0,001$ $p_1 < 0,05$

Примітка. У цій і наступних таблицях достовірність відносно:  $p$  – контролю;  $p_1$  – групи тварин із цирозом печінки.

Таблиця 2 – Показники ліпопероксидації при введенні модуляторів синтезу оксиду азоту при цирозі печінки ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Показник	Група тварин			
	контроль	цироз	цироз+L-аргінін	цироз+аміногуанідин
ГПЛ (печінка), ум. од./кг	1,70±0,13	3,30±0,09 $p < 0,01$	2,77±0,10 $p < 0,001$ $p_1 < 0,01$	3,03±0,20 $p < 0,01$ $p_1 > 0,05$
ТБП (печінка), мкмоль/кг	3,04±0,08	4,75±0,21 $p < 0,001$	3,82±0,09 $p < 0,001$ $p_1 < 0,01$	4,14±0,09 $p < 0,001$ $p_1 < 0,05$
ТБП (кров), мкмоль/кг	2,22±0,09	3,37±0,09 $p < 0,001$	2,69±0,17 $p > 0,05$ $p_1 < 0,05$	2,79±0,11 $p < 0,01$ $p_1 < 0,01$

ціональна здатність КАТ знижувалась на 48,7 % порівняно з контрольною групою тварин. Катазна активність крові достовірно зростала на 50,9 %, що свідчило про вихід внутрішньоклітинного ферменту в позаклітинний простір за умов перебігу цитолітичних процесів при цирозі. Сироватковий рівень церулоплазміну при цирозі знижувався на 18,6 %, що вказувало на пригнічення синтезу даного мідьвмісного антиоксидантного білка у печінці. Вміст GSH в ураженому органі у цій серії зменшувався на 40,4 % порівняно з контрольним показником (табл. 3). Відомо, що GSH бере безпосередню участь у знешкодженні вільних радикалів, а також у відновленні сульфгідрилвмісних груп ферментів, таких, як глутатіонпероксидаза (1.11.1.9), гліоксалаза (4.4.1.5) та ін. Зниження його вмісту за умов ЦП може бути пов'язане як з інтенсифікацією ПОЛ в ураженому органі, так і з підсиленням катаболізму глутатіону [7].

Відомо, що за активації процесів ПОЛ і розвитку гіпоксії гепатоцитів при ураженні печінки знижується енергозабезпечення гепатоцитів внаслідок роз'єднання дихання та окис-

ного фосфорилування в мітохондріях і спостерігається розвиток їх дисфункції [9]. В результаті проведених досліджень встановлено, що активність мітохондріальних ферментів СДГ та ЦХО у печінці знижувалась на 24,0 і 28,9 % відповідно порівняно з інтактними тваринами, що свідчило про порушення процесів енергозабезпечення гепатоцитів при цирозі (рис. 1).

Це все відбувалося на фоні зменшення вмісту нітрит-аніона в печінці на 24,9 % та його збільшення у сироватці крові в 3,0 рази. Рівень  $NO_3$  у крові підвищувався на 23,5 %, а в печінці не змінювався відносно контролю. Активація синтезу NO в організмі може бути спричинена зростанням продукції прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$ , IL-6 та TNF- $\alpha$ , рівень яких при цирозі перевищував контрольні показники в 4,0, 4,1 і 5,8 рази (рис. 2). Власне цим прозапальним цитокінам, які є продуктами активованих макрофагів та ендотеліальних клітин, притаманна властивість активізувати iNOS за умов ураження [10].

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших науковців. Відомо, що у печінці NO утворюється під дією двох ізоформ – eNOS

Таблиця 3 – Показники стану антиоксидантної системи при введенні модуляторів синтезу оксиду азоту при цирозі печінки ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Показник		Група тварин			
		контроль	цироз	цироз+L-аргінін	цироз+аміногуанідин
печінка	КАТ, кат/кг	3,69±0,10	1,89±0,18 $p < 0,01$	2,96±0,11 $p < 0,01$ $p_1 < 0,01$	2,02±0,10 $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$
	СОД, ум. од./кг	4,59±0,10	2,88±0,33 $p < 0,01$	3,04±0,27 $p < 0,01$ $p_1 > 0,05$	2,98±0,33 $p < 0,01$ $p_1 > 0,05$
	GSH, ммоль/кг	4,17±0,07	2,49±0,07 $p < 0,001$	3,62±0,08 $p < 0,01$ $p_1 < 0,001$	2,70±0,14 $p < 0,001$ $p_1 > 0,05$
кров	КАТ, кат/л	14,65±0,41	22,09±0,45 $p < 0,001$	19,94±0,46 $p < 0,001$ $p_1 < 0,05$	20,33±0,50 $p < 0,001$ $p_1 < 0,05$
	Церулоплазмін, мг/л	239,17±3,85	194,69±4,24 $p < 0,001$	209,27±3,13 $p < 0,001$ $p_1 < 0,05$	191,04±6,74 $p < 0,01$ $p_1 > 0,05$

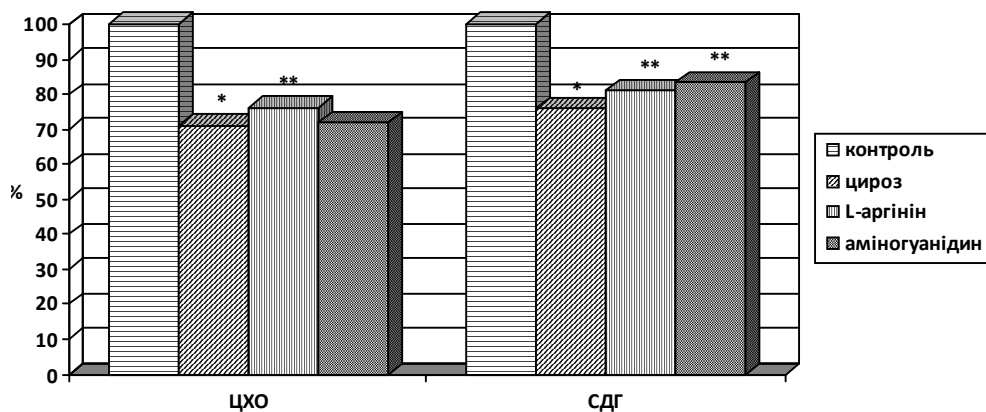


Рис. 1. Активність ЦХО та СДГ у гепатоцитах щурів з експериментальним цирозом і при введенні L-аргініну та аміногуанідину: \* –  $p < 0,05$  відносно контролю; \*\* –  $p < 0,05$  відносно тварин із цирозом печінки.

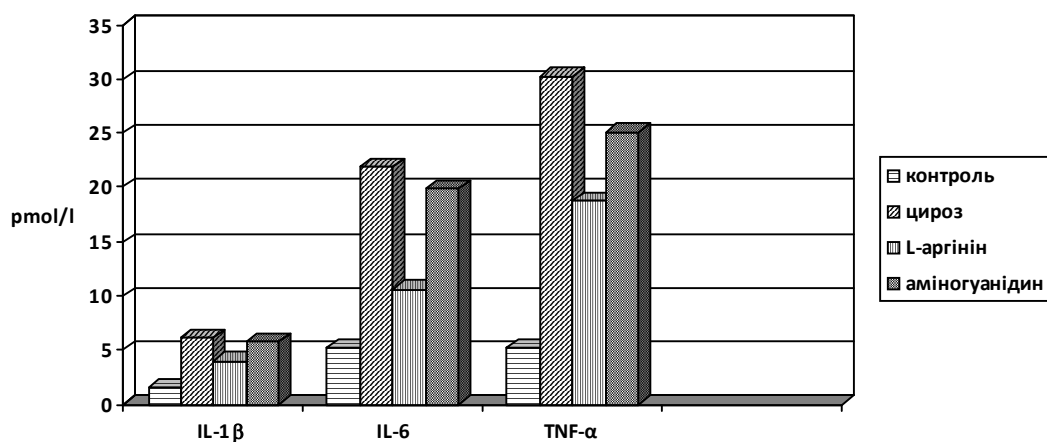


Рис. 2. Вміст прозапальних цитокінів у сироватці крові тварин з експериментальним цирозом і при введенні L-аргініну й аміногуанідину: \* –  $p < 0,05$  відносно контролю; \*\* –  $p < 0,05$  відносно тварин із цирозом печінки.

та iNOS. Картина експресії та активності білків NOS у здоровому органі й при патології різна [24]. При хронічних захворюваннях печінки спостерігається значне зростання активності індукцйбельної ізоформи NOS у зонах цирозу [23]. Отож високий рівень нітратів і нітритів у сироватці крові хворих на цироз печінки та при експериментальних моделях, імовірно, зумовлений підвищеною концентрацією iNOS-залежного NO. З іншого боку, D. C. Rockey і J. J. Chung [30] встановили зниження на 75,0 % активності конститутивної NOS у щурів із тетра-хлорметановим цирозом, що підтверджується результатами, наведеними у даній роботі. Показано, що при цьому відбувалися глибокі зміни в клітинному розподілі eNOS, що призводило до її транслокації в ядра гепатоцитів [21]. Можна припустити, що у внутрішньопечінковій мікроциркуляції виникає парадоксальна ситуація: в крові, що притікає, міститься величезна кількість NO, водночас різко збільшений портальний приплив створює додатковий тиск на стінку синусоїдів, що вимагає подальшої активації eNOS і вироблення оксиду азоту в ендотелії синусоїдів. Однак цього не відбува-

ється. 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 діаметра синусоїдів і збільшенню загальної портальної судинної резистентності. Таким чином, незважаючи на гіперпродукування оксиду азоту, виникає відносна недостатність медіатора на рівні внутрішньопечінкової мікроциркуляції, про що свідчить зниження вмісту нітрит-аніона у печінці, яке ми отримали в наших дослідженнях.

Для детальнішого з'ясування ролі NO у механізмах ураження печінки при її циротичному ураженні щурам вводили субстрат NO-синтаз (L-аргінін) і селективний інгібітор iNOS (аміногуанідин).

Введення впродовж 7 днів при цирозі попередника синтезу оксиду азоту L-аргініну призводило до зниження активності АлАТ на 36,6 %, АсАТ – на 40,3 %, ЛФ – на 8,7 та 7,1 % відповідно і порівняно з показниками групи тварин без корекції (табл. 1), що вказувало на зменшення інтенсивності перебігу цитолі-

тичних та холестатичних процесів у печінці при повторному застосуванні донатора оксиду азоту (табл. 1).

Рівень сечовини при введенні попередника NO зростав на 47,8 % , що свідчило про активацію аргіназного циклу на фоні збільшення вмісту його субстрату. Причому слід зазначити, що цей показник вірогідно не відрізнявся від контрольних значень (табл. 1).

На зменшення інтенсивності процесів ліпопероксидації при введенні L-аргініну вказувало зниження в ураженому органі концентрації ГПЛ на 16,2 %, ТБП у сироватці крові – на 20,2 та 19,0 %, у печінці – на 19,6 і 27,2 % (табл. 2).

Зменшення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів при застосуванні попередників синтезу оксиду азоту призвело до компенсаторних змін активності ферментної та неферментної ланок АОС. При введенні L-аргініну встановлено деяке зниження активності КАТ у сироватці крові (на 9,7 %), тоді як у печінці цей показник підвищувався (на 56,7 %). Спостерігалася тенденція до зростання активності іншого досліджуваного ферменту АОС – СОД. Вміст сироваткового церулоплазміну був вищим, ніж при ураженні, на 7,5 %, що вказувало на деяке відновлення синтезувальної функції печінки при повторному введенні попередників NO. Вміст GSH у печінці при введенні коригувального чинника збільшувався на 45,7 % порівняно з аналогічним показником у тварин зі змодельованим цирозом печінки (табл. 3).

Активність мітохондріальних ферментів СДГ та ЦХО на фоні введення субстрату для синтезу оксиду азоту амінокислоти L-аргініну в гомогенатах печінки зростала на 6,8 і 7,2 % (рис. 1). Позитивний вплив попередника синтезу оксиду азоту на функціональний стан мітохондрій за умов цирозу може бути зумовлений поліпшенням кровообігу та оксигенації ураженого органа.

Вміст  $\text{NO}_2^-$  у сироватці крові зростав на 213,6 %, а в печінці – на 33,8 %. Рівень  $\text{NO}_3^-$  у крові та печінці вірогідно не змінювався порівняно з аналогічним параметром у групі тварин із ЦП (табл. 2). Збільшення вмісту кінцевих стабільних метаболітів оксиду азоту, очевидно, зумовлене зростанням субстрату для його синтезу.

При застосуванні L-аргініну вміст прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$ , IL-6 та TNF- $\alpha$  вірогідно зменшувався на 34,1, 51,5 і 37,7 % порівняно з групою тварин без корекції, однак залишався вищим від контрольних значень у 2,7, 2,0 та 3,6 раза відповідно (рис. 2).

Наступним етапом наших досліджень стало вивчення функціонального стану печінки при експериментальному цирозі за умови блокування iNOS-стимульованого синтезу оксиду азоту.

Серед селективних інгібіторів iNOS виділяється аміногуанідин, який не має амінокислотної будови. Якщо порівнювати його з класичним неселективним блокатором NO-синтази N-нітро-L-аргініном, то він у 3 рази потужніший інгібітор iNOS та має у 200 разів слабшу дію як блокатор eNOS [17].

Аналіз результатів проведених досліджень дозволяє стверджувати, що пригнічення синтезу оксиду азоту шляхом блокування активності індукцибельної NO-синтази аміногуанідином приводить лише до часткового поліпшення показників стану та метаболічних процесів у печінці.

Так, при застосуванні препарату спостерігали вірогідне зниження активності тільки АлАТ – на 26,7 %, а АсАТ залишалась на рівні показників групи тварин без корекції. Не зазнавав достовірних змін, при застосуванні інгібітора iNOS та порівняно з групою тварин без корекції, і показник активності ЛФ.

Вміст сечовини в сироватці крові при введенні аміногуанідину зростав на 13,4 %, що вказувало на відновлення аргіназного циклу в печінці на фоні блокування надмірного синтезу оксиду азоту (табл. 1).

Застосування селективного інгібітора iNOS аміногуанідину при експериментальному цирозі привело до зниження концентрації ТБП як у крові (на 17,0 %), так і в печінці (на 12,8 %). Рівень ГПЛ в ураженому органі достовірно не змінювався, хоча спостерігалася тенденція до його зменшення порівняно з групою тварин зі змодельованим цирозом (табл. 2).

Повторне введення аміногуанідину при сформованому цирозі викликало лише незначне (на 8 %) зниження каталазної активності крові. Інші досліджувані показники АОС (активність СОД і КАТ, вміст GSH у печінці та церулоплазміну в крові) достовірно не відрізнялись від аналогічних у групі тварин із цирозом печінки, в яких корекцію не проводили (табл. 3). Результати наших досліджень узгоджуються з даними інших науковців, які показали, що при блокуванні синтезу оксиду азоту аміногуанідином активність маркерних печінкових ферментів та активність процесів ліпопероксидації знижувались при ураженні печінки, викликаному тривалим введенням чотирьохлористого вуглецю [28].

Блокування iNOS шляхом введення аміногуанідину при цирозі в цілому призводило до

зниження вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту. Так, рівень  $\text{NO}_2$  зменшувався: в сироватці – на 30,3 %; у печінці – на 40,5 %. При введенні аміногуанідину рівень  $\text{NO}_3$  у сироватці крові знижувався на 44,5 %, а в печінці незначно зростав (на 8,8 %).

При введенні аміногуанідину активність мітохондріального ферменту СДГ підвищувалась на 9,6 %, а ЦХО – залишалась на рівні групи тварин зі змодельованим цирозом (рис. 1).

На фоні введення аміногуанідину при цирозі концентрація  $\text{TNF-}\alpha$  була нижчою за аналогічний показник групи тварин без корекції на 17,0 % та лише спостерігалася тенденція до зменшення вмісту інших досліджуваних прозапальних цитокінів –  $\text{IL-1}\beta$  та  $\text{IL-6}$  (рис. 2).

Результати наших досліджень вказують на те, що інгібування  $\text{iNOS}$ -індукованого синтезу оксиду азоту не призводить до значного поліпшення досліджуваних показників стану печінки, що може свідчити про адаптаційну його роль за умов цирозу. Позитивний ефект застосування амінокислоти L-аргініну можна пояснити недостатністю  $\text{eNOS}$ -індукованого  $\text{NO}$  при розвитку цирозу печінки та його здатністю усувати роз'єднання функціонування ферменту на фоні недостатності субстрату [18].

**ВИСНОВКИ.** 1. Циротичне ураження печінки супроводжується зниженням вмісту ендотеліальної  $\text{NOS}$ , активацією ферментів цитолізу, холестази, процесів ліпопероксидації, порушенням стану антиоксидантного захисту, мітохондріального дихання та активацією прозапальних цитокінів, зменшенням вмісту нітрит-аніона у печінці та зростанням рівня метаболітів оксиду азоту в сироватці крові.

2. Застосування попередника оксиду азоту L-аргініну при експериментальному цирозі призводить до поліпшення функціонального стану печінки, на що вказують зниження активності процесів ліпопероксидації, активація системи антиоксидантного захисту, зростання активності мітохондріальних ферментів у печінці, які відбуваються на фоні збільшення вмісту метаболітів оксиду азоту в гепатоцитах та зменшення рівня прозапальних цитокінів у крові.

3. Використання селективного інгібітора  $\text{iNOS}$  аміногуанідину призводить до часткового поліпшення показників функціонального стану та метаболічних процесів у печінці, про що свідчать зниження активності АЛАТ, зменшення вмісту ТБК-активних продуктів у печінці та каталазної активності, активація мітохондріального дихання, орнітинового циклу синтезу сечовини, що виникає на фоні зменшення вмісту нітрит-аніона як у крові, так і в печінці, вмісту  $\text{TNF-}\alpha$  у крові.

#### 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. Граник В. Г. Метаболизм L-аргинина (обзор) / В. Г. Граник // Хим.-фармац. журн. – 2003. – **37**, № 3. – С. 3–20.
4. 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. 207–210.
5. Киселик І. О. Особливості визначення нітратів та нітритів у крові хворих на вірусні гепатити та жовтяниці іншої етіології / І. О. Киселик, М. Д. Луцик, Л. Ю. Шевченко // Лаб. 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. Мазо В. К. Глутатион как компонент антиоксидантной системы желудочно-кишечного тракта. – Режим доступа: <http://www.gastroportal.ru/php/content.php?id=1272&pr=print>
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. Морфометрия митохондриального аппарата гепатоцитов нормальной и цирротически измененной печени крыс / Н. Н. Безбородкина, С. В. Оковитый, М. В. Кудрявцева [и др.] // Цитология. – 2008. – **50**, № 3. – С. 228–236.
10. Оксид азоту та імунна система організму / А. І. Гоженко, І. В. Ніколаєвська, С. Г. Котюжинська [та ін.] // Мед. хімія. – 2001. – № 3. – С. 5–8.
11. Паліброта Н. М. Патогенетичне обґрунтування диференційованого лікування уражень слизової оболонки шлунка на цироз печінки: автореф. дис.

на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук / Н. М. Паліброда. – Івано-Франківськ, 2007. – 20 с.

12. Радченко О. М. Проблеми терапевтичного лікування цирозів печінки / О. М. Радченко // Рац. фармакотерапія. – 2010. – № 4. – С. 17–21.

13. Семенова Е. В. Гепатопротекторная активность некоторых производных 3-гидроксипиридина при токсических повреждениях печени : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук / Е. В. Семенова. – Саранск, 2009. – 19 с.

14. Современные методы в биохимии / под ред. В. Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1977. – С. 47–49.

15. 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.

16. 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. – **126**, № 1. – P. 131–138.

17. Chronic administration of aminoguanidine reduces vascular nitric oxide production and attenuates liver damage in bile duct-ligated rats / C.-L. Wei, W.-M. Hon, K.-H. Lee, H.-E. Khoo // *Liver Inter.* – 2005. – **25**. – P. 647–656.

18. Clemens M. G. Nitric oxide in the liver / M. G. Clemens. – 2001. – Режим доступу : <http://www.gastrohep.com/theliver/39ARIAS039.pdf>

19. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – № 82. – P. 70–77.

20. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome / C. Marchesi, T. Ebrahimian,

O. Angulo [et al.] // *Hypertension.* – 2009. – **54**, № 6. – P. 1384–1392.

21. Expression of inducible nitric oxide synthase in endotoxemic rat hepatocytes is dependent on the cellular glutathione status / T. A. Vos, H. Van Goor, L. Tuyt [et al.] // *Hepatology.* – 1999. – **29** (2). – P. 421–426.

22. Farzaneh-Far R. Nitric oxide in the liver / R. Farzaneh-Far, K. Moore // *Liver.* – 2001. – **21**, № 3. – P. 161–174.

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

24. Hon W. M. Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby? / W. M. Hon, K. H. Lee, H. E. Khoo // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2002. – **962**. – P. 275–295.

25. Jaescheke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts / H. Jaescheke // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2011. – **26**, Suppl. 1. – P. 173–179.

26. Kurabe S. Systemic histopathology of rats with CCl<sub>4</sub>-induced hepatic cirrhosis / S. Kurabe, N. Shimazu, M. Inagaki // *Laboratory Animals.* – 1991. – **25**. – P. 21–25.

27. Maeda Y. Oxidative stress / Y. Maeda, T. Inoguchi // *Nippon Rinsho.* – 2010. – **68**, № 5. – P. 814–818.

28. Muriel P. Nitric oxide protection of rats from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride / P. Muriel // *Biochem Pharmacol.* – 1998. – **56**(6). – P. 773–779.

29. Pacher P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J. S. Beckman, L. Liaudet // *Physiol. Rev.* – 2007. – **87**. – P. 315–424.

30. Rockey D. C. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension / D. C. Rockey, J. J. Chung // *Gastroenterology.* – 1998. – **114**. – P. 344–351.

**А. М. Олещук**

ТЕРНОПОЛЬСЬКИЙ ГОСУДАРСТВЕННИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

## ИЗМЕНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЦИРРОЗЕ И ДЕЙСТВИИ МОДУЛЯТОРОВ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА

### Резюме

*Исследовали функциональное состояние печени при CCl<sub>4</sub>-индуцированном экспериментальном циррозе и действии L-аргинина и аминоксидина. Установлено активацию процессов цитолиза и холестаза (повышение активности аланин- и аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы), нарушение равновесия в функционировании прооксидантно-антиоксидантной системы (уменьшение активности супероксиддисмутазы, каталазы, содержания восстановленного глутатиона, церулоплазмина, рост уровня гидропероксидов липидов и ТБК-активных продуктов), электронно-транспортной цепи митохондрий (снижение активности сукцинатдегидрогеназы, цитохромоксидазы), увеличение содержания нитрит-аниона в крови и его уменьшение в печени, рост уровня провоспалительных цитокинов ( фактора некроза опухолей-α, интерлейкина-1β, интерлейкина-6) в сыворотке крови при циррозе печени. Применение предшественника оксида азота L-аргинина при экспериментальном циррозе приводит к улучшению функционального состояния печени,*



на что указывают снижение активности процессов липопероксидации, активация системы антиоксидантной защиты, рост активности митохондриальных ферментов в печени, снижение уровня исследуемых цитокинов. Блокирование при экспериментальном циррозе индуцированного синтеза NO амингуанидином приводит к частичному устранению проявлений оксидативного стресса и нарушений функционального состояния печени.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** печень, тетрахлорметан, цирроз, оксид азота, L-аргинин, амингуанидин.

**O. M. Oleshchuk**

*I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY*

## **CHANGES OF BIOCHEMICAL PARAMETERS OF THE LIVER AT EXPERIMENTAL CIRRHOSIS AND UNDER NITRIC OXIDE MODULATORS' ACTION**

### **Summary**

*The functional state of the liver in case of CCl<sub>4</sub>-induced experimental cirrhosis and under the influence of L-arginine and aminoguanidine was investigated. Activation of cytolysis and cholestasis processes (increased activity of ALT, AST, alkaline phosphates), an imbalance in prooxidant-antioxidant system function (reduced of superoxide dismutase and catalase activity, glutathione and ceruloplasmine contents, increased levels of lipid hydroperoxides and TBA-active products), the electron-transport chain of mitochondria (decreased activity of succinate dehydrogenase, cytochrome oxidase), increasing concentrations of nitrite anion in the blood and its reduction in the liver, increased content of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 in serum were determined in liver cirrhosis. The use of nitric oxide precursor L-arginine in experimental cirrhosis leads to improvement of the functional state of the liver, as indicated by decreased activity of lipid peroxidation, activation of antioxidant protection, increased activity of mitochondrial enzymes in the liver, reducing the investigated cytokines. Blocking of induced NO synthesis by aminoguanidine in experimental cirrhosis leads to partial elimination of oxidative stress and liver dysfunction.*

**KEY WORDS:** liver, carbon tetrachloride, cirrhosis, nitric oxide, L-arginine, aminoguanidine.

*Отримано 11.10.12*

**Адреса для листування:** О. М. Олещук, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.