

ВПЛИВ ДОНАТОРІВ ОКСИДУ АЗОТУ НА ПЕРЕБІГ ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ АЛІЛОВИМ СПИРТОМ У БІЛИХ ЩУРІВ

Т. Я. ЯРОШЕНКО

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

Наведені дані про вплив донаторів NO при ураженні печінки аліловим спиртом на функціональний стан eNOS, систему антиоксидного захисту, ферментів дихального ланцюга мітохондрій та ферментів-маркерів цитолізу в гепатоцитах.

Ключові слова: АЛІЛОВИЙ СПИРТ, ОКСИД АЗОТУ, ДОНАТОРИ, ПЕЧІНКА.

В останні роки встановлена важлива роль оксиду азоту (NO) в перебігу різних патологічних процесів у печінці. [5]. Доведено, що в цьому органі NO проявляє різноманітну дію: в печінці може діяти і як інгібітор, і як агоніст у механізмах передачі інформації в гепатоцитах [9], як про- і антиоксидант [8], як інгібітор і активатор апоптозу [10].

У зв'язку з широким спектром біологічної дії NO, використовуються різні NO-донори, які діють або системно, або специфічно на певні органи, включаючи печінку. У літературі є повідомлення, що більшості донорам NO властивий корегувальний вплив при токсичному ураженні печінки. [14, 16], однак деякі автори відмічають зворотний ефект [13, 11]. Метою даної роботи було дослідити вплив різних донаторів NO на перебіг некротичного ураження печінки викликаного аліловим спиртом (АС).

Матеріали і методи

Досліди проведено на нелінійних білих щурах-самцях масою 180-200 г, яких утримували в умовах віварію. Піддослідні тварини були поділені на 4 групи: I – інтактні, II – уражені АС, III – щури, уражені АС, яким вводили донатор оксиду азоту (+-)-(E)-етил-2-[(E)гідроксиіміно]-5-нітро-3-гексенамід (скорочена назва - FK409); IV – щури, уражені АС, яким вводили донатор оксиду азоту L-аргінін. АС вводили тваринам II і IV груп одноразово у дозі 30 мг·кг⁻¹ маси щура внутрішньоочеревинно [4]. Інтактним тваринам вводили ізотонічний розчин натрію хлориду. FK409 вводили тваринам одноразово, орально в дозі 10 мг·кг⁻¹ маси тіла за 30 хв до інтоксикації [18]. L-аргінін вводили тваринам у дозі 0,2 г·кг⁻¹ протягом 14 днів (12 днів перед введенням АС, у день інтоксикації і на наступний день за кілька годин до декапітації) [19].

Тварин декапітували під тіопенталовим наркозом на 1-у добу з часу введення АС. Вміст NO в тканині печінки визначали електрохімічним методом [6]. Робочий електрод (наносенсор) для визначення кількості NO готували як описано в роботі [12]. Отримані дані опрацьовували на персональному комп'ютері із використанням спеціально розроблених додатків „Research Electrochemistry Software”, Ver. 4.30; (EG&G Princeton Applied Research) і „Origin 6.0”. Рівень NO розраховували за допомогою калібрувальної кривої (до і після вимірювання наносенсор калібрували використовуючи стандартні розчини оксиду азоту). Сумарну активність NO-синтази печінки визначали колориметрично [17].

Крім цього, в сироватці крові визначали активність каталази (КТ) [3], сукцинатдегідрогенази (СДГ) [1], цитохромоксидази (ЦО) [2], а також активність аланін-

(АлАТ) і аспаратат- (АсАТ) амінотрансфераз, використовуючи набори фірми РЕАГЕНТ, м. Дніпропетровськ.

Результати досліджень піддавали статистичній обробці, використовуючи критерій Стьюдента.

Результати й обговорення

Як свідчать одержані результати (табл.), максимальна продукція NO тканиною печінки тварин уражених АС, через добу після початку експерименту була майже вдвічі менша, ніж у інтактних щурів. Введення отруєним тваринам попередника L-аргініну привело до збільшення продуктів NO на 30 % ($P < 0,05$), тоді як спонтанний донатор NO FK409 не викликав змін активності eNOS.

Таблиця

Вплив L-аргініну і FK409 на досліджувані біохімічні показники в печінці і плазмі крові білих щурів уражених АС ($M \pm m$; $n = 6$)

Показники		Групи тварин			
		інтактні	уражені АС	АС + FK409	АС + L-аргінін
Стах, NO, нмоль/л		160,0±12,20	85,50±8,88*	88,20 ±8,62	112,00±7,01*
NO синтаза, нмоль/мг білка·хв		0,75± 0,08	1,35± 0,20*	1,33± 0,09	1,47± 0,12
NOx	плазма, мкмоль/л	14,30± 1,18	28,30± 1,14*	34,50± 2,75	39,30 ± 2,70 ^o
	печінка, мкмоль/г	2,51± 0,14	3,15± 0,14*	3,75± 0,33	4,58± 0,25 ^o
Каталаза	плазма, мкат/л	0,210± 0,08	0,30± 0,07*	0,28± 0,02	0,31± 0,02
	печінка, мкат/мг білка	65,80± 4,30	30,90 ± 2,46*	43,90 ± 2,10 ^o	45,70 ± 2,15 ^o
СДГ, нмоль сукцинату/мг білка· хв		12,05± 0,66	7,12± 0,42*	9,50± 0,40 ^o	10,15 ± 0,58 ^o
ЦО, нмоль диметил-п-фенілендіаміну/мг білка· хв		10,90± 0,85	5,80± 0,32*	7,02± 0,50	7,79± 0,38 ^o
АлАТ, плазма, ммоль/л·год		0,46± 0,02	4,16± 0,28*	3,65± 0,30	3,12± 0,10 ^o
АсАТ, плазма, ммоль/л·год		0,38± 0,03	2,90 ± 0,22*	2,29± 0,28	2,30± 0,21

Примітка. * - зміни достовірні порівняно відповідних показників у інтактних тварин; ^o - зміни достовірні порівняно до показників у тварин з гепатитом, яким не вводили донатори після інтоксикації.

Інтоксикація АС призвела до підвищення загальної активності синтази в печінці, а одноразове введення донаторів – L-аргініну або FK409 – достовірного впливу на активність ферменту.

На відміну від загальної активності синтази, вміст нітратів і нітритів у печінці і плазмі крові щурів з гепатитом, яким вводили донатори, суттєво змінився. Після введення L-аргініну вміст нітратів і нітритів у плазмі крові отруєних тварин підвищився в 1,4 раза, в печінці – 1,5 раза. Використання спонтанного донатора NO також викликало підвищення кількості стабільних нітритів у тканинах щурів з гепатитом, проте при статистичній обробці зміни виявилися недостовірними ($P < 0,05$). Одноразове введення L-аргініну ураженим АС тваринам призвело до півтораразового ($P < 0,05$) підвищення активності КТ у печінці порівняно з тваринами, яким інгібітор не вводився. В плазмі крові при цьому активність ферменту суттєво не змінювалася. Введення тваринам донатора оксиду азоту FK450 також

викликала достовірне покращення активності каталази в печінці уражених тварин, хоча і меншою мірою, ніж введення L-аргініну. Як і L-аргінін, FK409 не впливав на активність КТ в плазмі крові тварин з токсичним гепатитом.

Через 24 год після введення тваринам L-аргініну активність СДГ у їх крові була на 42 % більша ($P < 0,05$), ніж у крові контрольної групи. Активність термінального ферменту дихального ланцюга – ЦО у крові тварин дослідної групи при цьому була на 34 % більша ($P < 0,05$), ніж у крові тварин контрольної групи. Одноразове введення донатора NO FK409 призвело до підвищення активності СДГ в їх крові на 33 % ($P < 0,05$).

На відміну від сказаних ферментів активність АлАТ, в крові тварин з токсичним гепатитом, яким одноразово вводили амінокислоту L-аргінін була на 33 % нижча ($P < 0,05$) порівняно до її активності АлАТ в крові тварин контрольної групи. При цьому спостерігалася також тенденція до зниження активності іншого маркерного фермента цитолізу в клітинах печінки – АсАТ. Після одноразового введення тваринам з токсичним гепатитом FK409 показники активності АлАТ і АсАТ в їх крові виявляють тенденцію до підвищення.

У літературі є повідомлення, що новий спонтанний донор NO FK409 ефективно захищає печінку від пошкодження, індукованого ішемією/реперфузією у щурів [14] і собак [15, 13]. Проведені нами дослідження показали, що введення тваринам, спонтанного донора NO – FK409 та субстрату NO синтази L-аргініну призводить до змін функціонального стану кальцій-залежної та індукційної (iNOS) синтази оксиду азоту в печінці. L-аргінін підвищував кальцій-стимульовану продукцію NO в печінці, тоді як FK409 меншою мірою впливав на цей показник. Обидва препарати підвищували вміст кінцевих продуктів обміну NO в печінці і крові тварин. Очевидно, що при одноразовому введенні тваринам FK409, утворені при перетворенні NO_2 і NO_3 , встигають за 24 год. частково виділитися з організму.

У той же час обидва чинники не викликали суттєвих змін загальної активності NO синтази при її дослідженні *in vitro*. Це дещо парадоксальні дані, оскільки при введенні субстрату NO синтази кількість утвореного продукту повинна б збільшитись. Це можна пояснити тим, що ми визначали активність NO синтази *in vitro* в системі, що містила високу концентрацію амінокислоти. Можна припустити, що інкубація ферменту з L-аргініном нівелювала різницю у функціональному стані NO синтази у печінці інтактних і дослідних щурів. Після введення тваринам донатора оксиду азоту FK409 не виявлено активації чи пригнічення загальної NO синтазної активності. Це зумовлено тим, що даний препарат є донатором NO, що звільнюється спонтанно і безпосередньо на синтазу не впливає, а підвищення концентрації NO в тканині печінки було недостатнє для інгібування ферменту за принципом зворотного зв'язку.

Наявні в літературі дані [4, 5] свідчать про підвищення активності КТ в печінці й крові тварин, та про зниження активності фермента при хронічному введенні їм алкоголю. У нашому дослідженні введення тваринам L-аргініну і спонтанного донатора NO – FK409 при токсичному гепатиті, викликаного введенням АС, призводить до підвищення активності КТ.

Позитивно впливає на транспорт електронів по дихальному ланцюгу і синтез АТФ введення досліджуваним тваринам з токсичним гепатитом донаторів NO, про що свідчить підвищення активності в їх печінці.

Висновки

Введення білим щурам при токсичному ураженні печінки субстратів NO синтази – L-аргініну або спонтанного донатора оксиду азоту FK409 призводить до нормалізації досліджуваних показників (функціонального стану eNOS, системи антиоксидного захисту,

ферментів дихального ланцюга мітохондрій, ферментів-маркерів цитоліз у гепатоцитах). Ці дані дозволяють зробити висновок про надзвичайно важливу роль у патогенезі токсичного гепатиту, індукованого АС, інгібування eNOS. Підвищення її функціонального стану шляхом введення L-аргініну або FK409 позитивно впливає на метаболічні процеси в органі.

T. Ya. Yaroshenko

THE EFFECT OF NITRIC OXIDE DONORS ON THE DEVELOPMENT OF TOXIC DAMAGE OF THE LIVER BY ALLYL ALCOHOL

The information about the influence of NO donors on the liver damage by allyl alcohol and the improvement of all parameters explored by us by administering them has been represented: functional state of eNOS, system of antioxidant defence, enzymes of respiratory chain of enzymes-markers of cytolysis in hepatocytes have been represented.

Ternopil State Medical University named after I.Ya.Gorbachevskyy

1. *Ещенко Н. Д., Вольский Т. Г.* Методы биохимических исследований.— Л.: Из-во Ленинград. ун-та. —1982. — С. 210-212.
2. *Кривченкова Р. С.* Определение активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий // В кн.: Современные методы в биохимии. - М.: Медицина. — 1977. — С. 47-49.
3. Метод определения активности каталазы / Корольюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. // Лабораторное дело — 1988. — № 1. — С.16-19 .
4. Beneficial effect of nitric oxide synthase inhibitor on hepatotoxicity induced by allyl alcohol /K. Alam, M.N. Nagi, O.A. Al-Shabanah, et al. // J Biochem Mol Toxicol. — 2001. — Vol. 15, № 6. — P. 317-321.
5. *Chen T., Zamora R., Zuckerbraun B.* Role of nitric oxide in liver injury // Curr. Mol. Med. — 2003. — № 3. — P. 519-526.
6. Direct measurement of nitric oxide in the cardiovascular system / T. Malinski, S. Mesaros, S. R.Patton, A. Mesarosova // Physiol. Res. 1996. — № 45. — P. 279-284.
7. *Ellman G.L.* Tissue sulfhydryl groups // Arch. of Bioch. and Biophys. — 1959. — Vol. 82. — P. 70–77.
8. *Fitzhugh A. L., Keefer L. K.* Diazeniumdiolates: pro- and antioxidant applications of the “NOates” // Free Radic. Biol. Med. — 2000. — № 28. — P. 1463-1469.
9. Hepatic nitric oxide production following acute endotoxemia in rats is mediated by increased inducible nitric oxide synthase geneexpression // D.L. Laskin, del Valle M. Rodriguez, D.E. Heck, et al. // Hepatology. — 1995. — № 22. — P. 223-234.
10. *Kim P.K., Billiar T.R.* Give me iNOS or give me death // Hepatology. — 2001. — № 34. — P. 436-437.
11. *Kumins N. H., Hunt J., Gamelli R. L.* Molsidomine increases endotoxic survival and decreases cytokine production // Shock. — 1997. — № 7. — P. 200-205.
12. N ω -Hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine / D. Stuehr, N.S Kwon, C. Nathan, O. Griffiths // J Biol Chem 1991. — № 266. — P. 6259-6263.
13. Novel nitric oxide donor (FK409) ameliorates liver damage during extended liver resection with warm ischemia in dogs / M. Aiba, I. Takeyoshi, S. Ohwada, et al. // J. Am. Coll. Surg. — 2001. — № 193. — P. 264-271.
14. *Ohmori H., Dhar D.K., Nakashima Y.* Beneficial effects of FK409, a novel nitric oxide donor, on reperfusion injury of rat liver // Transplantation. — 1998. — № 66. — P. 579-585.
15. Protective role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury of the liver / T. Shimamura, Y. Zhu, S. Zhang, et al. // J. Am. Coll. Surg. — 1999. — № 188. — P. 43-52.
16. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase / H.H. [Schmidt](#), [J.S. Pollock](#), [M. Nakane](#), et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 1991. — Vol. 88, № 2. — P. 365-369.

17. *Sass G., Koerber K.* Inhibition of endotoxemia-induced nitric oxide synthase expression by cyclosporin A enhances hepatocyte injury in rats: amelioration by NO donors // *Int. Immunopharmacol.* – 2002. – № 2. – P. 117-127.
18. Spontaneous nitric oxide release for the potent pharmacological actions of FK409 // *Kita Y., Hirasawa Y., Maeda K., et al.* // *Pharmacol.* – 1994. – Vol. 257? № 1-2. – P. 123-130.
19. The attenuation of hemorrhage-induced liver injury by exogenous nitric oxide, L-arginine, and inhibition of inducible nitric oxide synthase // *Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra L.H., Guo R.F., Ward P.A., et al.* // *Invest Surg.* – 2003. – №16(5). – P. 247-261