

УДК 616.36:615:577.121

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ L-АРГИНИНА И ИНГИБИТОРОВ NO-СИНТАЗЫ НА ОБРАЗОВАНИЕ ОКСИДА АЗОТА И НИТРОЗОТИОЛОВ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ

Г.Н. Близнецова, С.С. Артемьева, М.И. Рецкий

Воронежский государственный университет, 394006, Воронеж, Университетская
площадь, 1; эл.почта: retsky@mail.ru

Исследовано влияние модуляции синтеза оксида азота на уровень его стабильных метаболитов и нитрозотиолов при токсическом повреждении печени CCl_4 . Установлено, что стимуляция продукции NO^{\bullet} L-аргинином повышает резистентность клеток печеночной паренхимы к повреждающему действию тетрахлорметана, а ингибирование NO-синтазы приводит к усилению гепатотропного действия CCl_4 . Выдвинуто предположение о существовании определенного базового уровня нитрозотиолов, выступающего в качестве резервного фонда оксида азота в организме.

Ключевые слова: токсическое повреждение печени, оксид азота, нитрозотиолы.

ВВЕДЕНИЕ. Феномен оксидативного стресса представляет собой один из базисных механизмов патогенеза многих заболеваний [1]. В условиях оксидативного стресса деструкции и повреждению подвергаются липиды мембран, ферменты, рецепторы, гликопротеины, нуклеиновые кислоты, так как активные формы кислорода (АФК) обладают универсальной биоагрессивностью [2,3]. Имеющиеся к настоящему времени данные позволяют считать, что генерация АФК, образующихся при стимуляции клеток Купфера и секвестрации полиморфноядерных нейтрофилов [1], является важным механизмом повреждения клеток печени.

В последние годы становится все более очевидным участие в патогенезе многих заболеваний оксида азота (NO^{\bullet}) [4], образующегося в организме в результате превращения L-аргинина в L-цитрулин, катализируемого семейством изоферментов – NO-синтаз. Образование NO^{\bullet} доказано для гепатоцитов, клеток Купфера и эндотелиальных клеток [4].

Физиологический эффект взаимодействия АФК и NO^{\bullet} остается предметом активных дебатов. В ряде работ *in vitro* было продемонстрировано, что NO^{\bullet} может фактически замедлять пероксидное окисление липидов. Этот своеобразный “антиоксидантный” эффект NO^{\bullet} позволил некоторым исследователям предположить, что взаимодействие между супероксиданионом и NO^{\bullet} может быть биологически важным путем детоксикации потенциально опасных АФК [4,5].

Целью настоящей работы было изучение влияния модуляции синтеза NO^{\bullet} на интенсивность образования метаболитов оксида азота и проявление гепатотоксического действия тетрахлорметана.

МЕТОДИКА. В качестве объекта исследования использовали самцов белых крыс с массой тела 200-250 г. Все экспериментальные животные были одного возраста и содержались в одинаковых условиях вивария.

NO ПРИ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ

В качестве эндогенного индуктора синтеза NO[•] использовали L-аргинин (L-Arg), который вводили животным в дозе 400 мг/кг внутривентриально в течение 6 суток. Блокаторы синтеза NO[•] - амингуанидин (AG) и метиловый эфир нитро-L-аргинина (L-NAME) - вводили животным в дозе 50 мг/кг, так же внутривентриально в течение 6 суток. Токсическое повреждение печени вызывали путем двукратного внутривентриального введения тетрахлорметана (CCl₄) один раз в сутки в виде 40% раствора в оливковом масле в дозе 0,2 мл/100 г массы тела. При указанных условиях степень повреждения структуры и функций гепатоцитов соответствует гепатозо-гепатиту [6]. Исследования проведены на 8-ми группах по 10 животных в каждой. Животным 1-ой (контрольной) группы вводили физиологический раствор. Крысам 2-ой группы – L-аргинин, 3-ей – AG, 4-ой – L-NAME, 5-ой – CCl₄. У животных 6,7 и 8 групп на фоне введения L-Arg, L-NAME и AG на 5 и 6 дни вызывали токсическое повреждение печени введением CCl₄. Исследования проводили через сутки после второго введения CCl₄.

О степени повреждения печеночной паренхимы судили по изменению активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) в сыворотке крови, которую определяли с использованием тест-системы “АлАТ-Импакт”. Суммарное содержание в плазме крови (мкМ) стабильных метаболитов оксида азота (NO₃+NO₂) определяли спектрофотометрически с использованием в качестве восстановителя хлорида ванадия (III) с последующим определением NO₂ с помощью реактива Грисса [7]. Уровень нитрозотиолов (RSNO) в плазме крови определяли с использованием HgCl₂ для высвобождения NO из S-нитрозированных тиолов, с последующим определением нитрита с реактивом Грисса при 540 нм [8]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Установлено, что введение здоровым животным как L-Arg, так и ингибиторов NO-синтазы не оказывало влияния на состояние печени (рисунок).

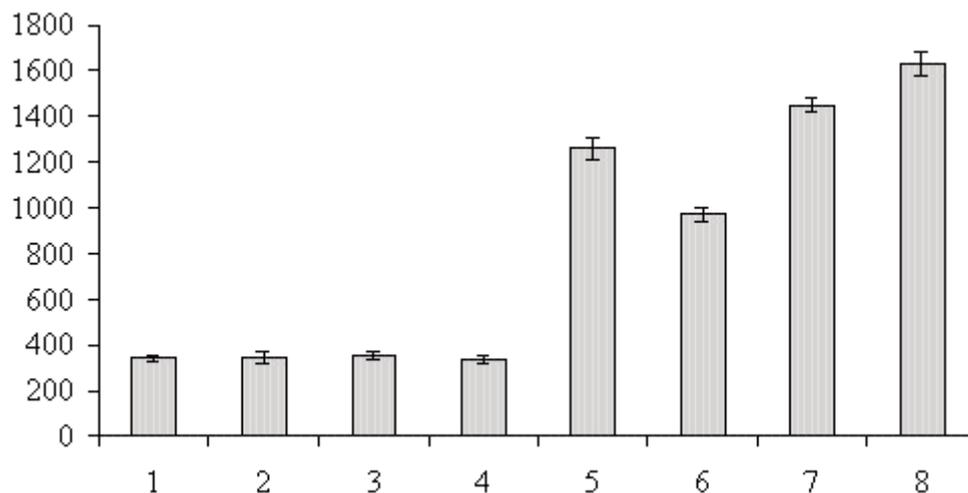


Рисунок.

Влияние L-аргинина и ингибиторов NO-синтазы на активность АлАТ (нмоль/сек·л) в плазме крови крыс при повреждении печени тетрахлорметаном:

Группы животных: 1 – Контроль, 2 – L-Arg, 3 – L-NAME, 4 – AG, 5 – CCl₄,
6 – L-Arg+CCl₄, 7 – L-NAME+CCl₄, 8 – AG+CCl₄

Как известно, повреждение печени CCl₄ реализуется через активацию процессов пероксидации, поскольку тетрахлорметан, поступая в организм, превращается в радикал CCl₃[•]; инициирующий окисление свободнорадикального типа [9], приводящее к образованию мембранных дефектов и нарушению

структурно-функционального состояния клеточных мембран, увеличению их проницаемости и в конечном итоге к повреждению печеночной паренхимы. Об этом и свидетельствовало повышение активности АлАТ в плазме крови крыс почти в 3,7 раза через сутки после введения CCl_4 (рисунок).

Введение CCl_4 на фоне применения L-Arg несколько снижало проявление цитолитического синдрома. Активность АлАТ у этих животных была ниже на 23% ($p < 0,05$), чем у крыс, которым вводили только CCl_4 . На фоне введения ингибиторов синтеза оксида азота явления цитолиза усугублялись. Наиболее выражено это было у животных, которым CCl_4 вводился на фоне применения амингуанидина - селективного ингибитора индуцибельной NO-синтазы, о чем свидетельствовало повышение активности АлАТ более чем в 4,5 раза по сравнению с крысами контрольной группы и на 12,5 % ($p < 0,05$) – по сравнению с крысами, которым вводили L-NAME.

Введение животным L-Arg приводило к увеличению уровня суммарного содержания нитрата и нитрита на 43,5% ($p < 0,05$), а применение ингибиторов NO-синтазы – к примерно одинаковому снижению более чем в 2 раза суммы NO_x в плазме крови животных (таблица).

Таблица. Содержание суммы стабильных метаболитов оксида азота и нитрозотиолов в плазме крови крыс при повреждении печени CCl_4 в условиях модуляции продукции оксида азота.

№	Группа животных	NO_x мкМ	RSNO, нМ
1	Контроль	14,7±0,60	1436±60,5
2	L-Arg	21,1±0,87*	2183±47,1*
3	L-NAME	7,0±0,18*	1340±33,3
4	AG	6,7±0,47*	1165±45,6*
5	CCl_4	80,4±1,92*	3545±68,6*
6	L-Arg + CCl_4	99,9±4,10* ^σ	2509±107,0* ^σ
7	L-NAME + CCl_4	71,6±0,84* ^σ	2020±71,4* ^σ
8	AG+ CCl_4	66,0±0,99* ^σ	1768±34,8* ^σ

Примечание: * – $p_{1-2,3,4,5,6,7,8} < 0,05-0,001$; ^σ – $p_{2-6, 3-7, 4-8} < 0,05-0,001$; ^σ – $p_{5-6,7,8} < 0,05-0,001$.

Токсическое повреждение печени тетрахлолметаном вызывало значительное увеличение продукции NO , о чем свидетельствовало более чем 3-кратное повышение содержания суммы его стабильных метаболитов ($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$) в плазме крови. Повышение интенсивности образования оксида азота свидетельствует об активации NO-ергической системы, которая играет важную роль в стрессорных и адаптивных ответах организма, являясь универсальным регулятором физиологических функций и метаболизма клеток. По современным представлениям, увеличение продукции NO соответствует стадии мобилизации при адекватной стресс-реакции [10].

На фоне введения L-Arg токсическое поражение печени сопровождалось увеличением продукции NO в 3,8 раза по сравнению с контрольной группой животных, получавших только L-Arg. Применение блокаторов NO-синтаз - L-NAME и AG - приводило к снижению образования NO на 10,9% и 17,9% ($p < 0,05$), соответственно, по сравнению с группой животных с CCl_4 -интоксикацией.

Поддержание концентрации оксида азота на определенном уровне при

токсическом повреждении печени, видимо, играет определенную роль в ограничении чрезмерной активации процесса свободнорадикального окисления и его повреждающих эффектов, так как применение индуктора синтеза NO[•] - L-Arg снижало, а введение блокаторов NO-синтаз (AG и L-NAME) усугубляло проявление цитолитического синдрома в условиях CCl₄-интоксикации, судя по изменению активности АлАт в сыворотке крови.

Механизм этого ограничения обусловлен тем, что NO[•] способен замедлять окисление свободнорадикального типа, действуя как скавенджер активных метаболитов кислорода [4,5,11], а также может изменять активность ферментов антиоксидантной стресс-лимитирующей системы [12,13] и экспрессию генов, кодирующих эти ферменты [14,15].

Помимо этого, увеличение продукции NO[•] при токсическом повреждении печени, необходимо для обеспечения явления “рабочей гиперемии” путем расширения сосудов и направленного перераспределения кислорода и пластических ресурсов из неактивных органов и тканей в печень – т.е. ту функциональную систему, которая в данный момент осуществляет адаптационную (регенераторную в данном случае) реакцию для восстановления нарушенной функции [16].

Параллельно с изменением продукции оксида азота при токсическом повреждении печени установлено изменение содержания в плазме крови S-нитрозотиолов, которые являются мощными биоактивными компонентами, образующимися в реакции оксида азота с тиолами в присутствии кислорода. При этом они проявляют активность, подобную оксиду азота, стабилизируют NO[•] и потенцируют его биологические эффекты [17].

Считается доказанным наличие корреляции между содержанием NO[•] и уровнем S-нитрозотиолов [18]. Этот факт подтвердился при экзогенном введении L-Arg, которое приводило к увеличению уровня S-нитрозотиолов – на 52,0% (p<0,05) в плазме крови животных контрольной группы. Однако, введение L-NAME и аминогуанидина, ингибиторов NO-синтаз, животным 3-ей и 4-й групп соответственно, приводящее к понижению продукции NO[•] более чем в 2 раза в каждой из групп, не вызвало существенного изменения содержания нитрозотиолов по сравнению с животными контрольной группы (таблица). Вполне возможно, что в плазме крови существует некий базовый уровень нитрозотиолов, выступающий в качестве резервного фонда оксида азота, и который даже в условиях ингибирования продукции оксида азота используется незначительно.

Повышение содержания S-нитрозотиолов в плазме животных при CCl₄-интоксикации, скорее всего, отражает процессы депонирования избыточного количества NO[•]. Стабилизация оксида азота в форме S-нитрозотиолов предотвращает его инактивацию гемоглобином, молекулярным кислородом или супероксиданион-радикалом [19,20].

Таким образом, установленный цитопротекторный эффект при введении L-Arg связан, вероятно, с тем, что NO[•] способен инактивировать супероксиданион – один из наиболее важных инициаторов свободнорадикального окисления [4]. Известно, что взаимодействие этих радикалов приводит к появлению пероксинитрита, обладающего так же высокой цитотоксичностью. Его взаимодействие с белками *in vivo* приводит к модификации тирозиновых остатков белковых молекул, приводящее к деструкции многих ферментативных и структурных систем, блокированию клеточной сигнализации. Защитный эффект NO[•] достигается при сбалансированном образовании NO[•] и супероксиданиона и требует определенного редокс-состояния клетки, необходимого для нейтрализации пероксинитрита [21]. Кроме того, NO[•] может изменять активность ферментов антиоксидантной стресс-лимитирующей системы [12,13] и экспрессию генов, кодирующих данные ферменты [14,15]. Активация ферментативного звена антиоксидантной системы направлена на ограничение избыточного образования в организме токсических продуктов пероксидации и восстановление нарушенного

гомеостаза для обеспечения репаративных процессов. Расширение сосудов, вызванное повышением концентрации NO[•], обеспечивает печень необходимыми пластическими и энергетическими ресурсами для регенерации поврежденных клеток.

Эти механизмы могут лежать в основе ограничения проявления оксидативного стресса при токсическом гепатите, вызванном введением тетрахлорметана, а одним из факторов, обеспечивающим проявление протекторного действия NO[•], является существование в плазме крови определенного базового уровня S-нитрозотиолов, выступающих в качестве резервного пула оксида азота. Присутствие NO[•] в плазме в комплексе с тиолами предотвращает его элиминацию из биофазы при повышении концентрации супероксиданиона и тем самым сохраняет его биологическую активность.

Направленное воздействие на систему генерации оксида азота может оказаться весьма эффективным способом предупреждения патологических состояний, сопровождающихся нарушением баланса образования и элиминации активных форм кислорода.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б.* (2001) Оксидативный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты.: МАИК Наука/Интерпериодика. М.
2. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* (1972) Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.: Наука. М.
3. *Осипов А.Н., Владимиров Ю.А.* (1990) Успехи биол. химии, **31**, №2, 180-208.
4. *Laskin J.D., Heck D.E., Gardner C.R. et al.* (2001) Antioxidants & Redox signaling, **3**, 261-271.
5. *Серая И.П., Нарциссов Я.Р.* (2002) Успехи совр. биологии, **122**, №3, 249-258.
6. *Кутина С.Н., Зубахин А.А.* (2000) Бюл. exper. биол. мед., **129**, №6, 620-622.
7. *Близнецова Г.Н., Ермакова Н.В., Захид Д. Мухаммед и др.* (2002) Вестник Воронежского университета, **1**, №1, 56-60.
8. *Kubes P., Payne D., Grisham M.B. et al.* (1999) Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., **277**, H676-H682.
9. *Карузина И.И., Бачманова Т.И., Арчаков А.И.* (1995) Вестн. РАМН, №2, 17-29.
10. *Мальшев И.Ю., Манухина Е.Б.* (1998) Биохимия, **63**, 992-1006.
11. *Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П.* (2000) Биохимия, **65**, 485-503.
12. *Kostic T.S., Andric S.A., Maric D. et al.* (2000) J. Steroid. Biochem. Mol. Biol., **75**, 299-306.
13. *Ulker S., McMaster D., McKeown P.P.* (2003) Cardiovasc. Res., **59**, 488-500.
14. *Nunoshiro T., de Rojas-Walker T., Wishnok J.S. et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 9993-9997.
15. *Rotzinger S., Aragon C.M.G., Rogan F. et al.* (1995) Life Sci., **56**, 1321-1324.
16. *Пуенникова М.Г.* (2000) Патол. физиол. exper. тер., № 3, 20-26.
17. *Hogg N.* (2002) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., **42**, 585-600.
18. *Feelisch M., Rassaf T., Mnaimneh S. et al.* (2002) FASEB J., **16**, 1775-1785.
19. *Stamler J.S., Singel D.J., Loscalzo J.* (1992) Science, **258**, 1898-1902.
20. *Giustarini D., Milzani A., Colombo R. et al.* (2003) Clin. Chim. Acta, **330**, 85-98.
21. *Wink D.A., Miranda K.M., Espey M.G. et al.* (2001) Antioxid. Redox. Signal., **3**, №2, 203-213.

Поступила: 07. 05. 2004

INFLUENCE OF L-ARGININE AND INHIBITORS OF NO-SYNTASE ON
GENERATION OF NITRIC OXIDE AND NITROSO THIOLS AT
TOXIC DAMAGE OF LIVER

G.N. Bliznetsova, S.S. Artemieva, M.I. Retsky

Voronezh State University, University square 1, Voronezh, 394006 Russia.
e-mail: retsky@mail.ru

The effects of L-arginine and inhibitors of NO-synthase on the level of stable NO metabolites and nitroso thiols have been investigated under conditions of toxic damage of liver induced by CCl₄. The L-arginine improved resistance of hepatic cells to damaging action of tetrachloromethane, but inhibition of NO-synthase increased hepatotropic action of CCl₄. The existence of some base level of nitroso thiols, acting as a reserve pool of nitric oxide in organism, has been supposed.

Key words: toxic damage of liver, nitric oxide, nitroso thiols.