

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

К МЕХАНИЗМУ ПРОТЕКТОРНОГО ВЛИЯНИЯ L-АРГИНИНА НА ПЕЧЕНЬ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ

М. Н. Ходосовский¹

Изучали механизм протекторного действия L-аргинина на печень при ишемии-реперфузии у кроликов путем совместной инфузии ингибитора NO-синтазы (метилловый эфир N_ω-нитро-L-аргинина, 10 мг/кг) и L-аргинина (300 мг/кг). В крови и гомогенате печени измеряли содержание продуктов перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты, основания Шиффа), факторов антиоксидантной системы (α -токоферол, активность каталазы), в плазме крови оценивали активность аланин-, аспаратаминотрансфераз. Установлено, что инфузия L-аргинина перед началом реперфузионного периода на фоне ингибирования NO-синтазной активности приводит к значительному усилению процессов перекисного окисления липидов, истощению факторов антиоксидантной системы, а также повышению активности трансаминаз крови, т.е. не оказывает защитного влияния на печень при ишемии-реперфузии. По-видимому, механизм ранее установленного протекторного влияния L-аргинина на печень при ишемии-реперфузии связан с образованием окиси азота из этой аминокислоты.

Ключевые слова: окись азота, L-аргинин, перекисное окисление липидов, реперфузия, печень, кролики

ВВЕДЕНИЕ

В патогенезе постишемических (реперфузионных) повреждений печени большое значение имеют нарушения прооксидантно-антиоксидантного баланса и развитие окислительного стресса [2, 11]. Вазодилататор окись азота (NO) является свободнорадикальной молекулой. В организме существует равновесие между защитным и повреждающим свойствами NO при ишемии-реперфузии печени [8]. Ранее установлено, что инфузия L-аргинина (300 мг/кг) перед началом реперфузионного периода улучшает прооксидантно-антиоксидантное и функциональное состояние печени у кроликов [4]. При этом механизм протекторного влияния аминокислоты на печень изучен недостаточно. Защитное действие L-аргинина может быть обусловлено взаимодействием NO с генерируемыми при реперфузии активными формами кислорода, главным эффектом которого является устранение этих радикалов. NO в данном случае может выступать как эндогенный “гаситель” свободных радикалов, в его присутствии цитотоксичность супероксид-анион радикала и перекиси водорода заметно уменьшается [14]. С другой стороны, непосредственно L-аргинин, обладая антиоксидантными свойствами, может предупреждать истощение антиоксидантного потенциала организма, что оказывает стабилизирующий эффект на мембраны, ограничивая проникновение свободных радикалов кислорода в глубь гидрофобного слоя [3].

Цель исследования — изучить механизм протекторного влияния L-аргинина на печень при ишемии-реперфузии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на взрослых кроликах-самцах весом 3,5 – 4,5 кг, предварительно выдержанных в стандартных условиях вивария. Анестезию поддерживали внутривенной инфузией кетамина (1,5 мг/кг/мин). Ишемию печени вызывали наложением сосудистого зажима на *a. hepatica propria* в течение 30 мин, реперфузионный период длился 120 мин. Вводили катетеры: один — в *v. hepatica* для взятия печёночной венозной крови, другой — в правое предсердие для получения смешанной венозной крови. Забор образцов крови для оценки продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и факторов антиоксидантной системы осуществляли до, в конце ишемии и через 30 и 120 мин после её прекращения. Ткань печени для оценки показателей прооксидантно-антиоксидантного состояния брали в конце реперфузии. Степень повреждения печени оценивали по активности в крови аланин- и аспаратаминотрансфераз (АЛТ и АСТ соответственно) по S. Reitman [13].

Для изучения механизма протекторного влияния L-аргинина на печень при ишемии-реперфузии у кроликов ($n = 8$) проводили внутривенную инфузию метилового эфира N_ω-нитро-L-аргинина (L-NAME, 10 мг/кг, “Sigma”) и L-аргинина (300 мг/кг, “Sigma”) за 10 и 5 мин до начала реперфузионного периода соответственно. Данная доза L-аргинина использовалась нами ранее и оказывала протекторное влияние на печень при ишемии-реперфузии [4]. Определение суммарного количества нитритов и нитратов (NOx) в плазме крови проводили с помощью реактива Грисса. Для восстановления нитратов в нитриты использовали металлический кадмий.

Изучали следующие показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния: диеновые конъюгаты (ДК), основания Шиффа (ОШ), α -токоферол и активность каталазы. Содержание ДК в биологическом материале определяли мето-

¹ Кафедра патологической физиологии (зав. — доц. Н. Е. Максимович) Гродненского медицинского университета, Беларусь, Гродно, 230015, ул. Горького, 80, e-mail:hodosowsky@grsmu.by

Таблица 1. Влияние совместной инфузии L-аргинина и L-NAME на показатели печёночной венозной крови при ишемии-реперфузии печени у кроликов ($M \pm m, n = 8$).

Показатель	До ишемии	30 мин ишемии	Реперфузионный период	
			30 мин	120 мин
ДК _{пл} , ΔD_{233} /мл	0,51 ± 0,04	0,7 ± 0,08*	0,66 ± 0,07	0,84 ± 0,08*
ДК _{эр} , ΔD_{233} /мл	5,25 ± 0,46	7,74 ± 0,77*	6,99 ± 0,87	8,76 ± 1,21*
ОШ _{пл} , ЕД/мл	9,14 ± 0,35	12,98 ± 1,69*	13,05 ± 0,87*	12,36 ± 0,82*
ОШ _{эр} , ЕД/мл	40,75 ± 1,93	50,69 ± 1,72*	55,22 ± 3,14*	51,98 ± 2,5*
α -Токоферол _{пл} , мкмоль/л	20,38 ± 0,28	19,6 ± 0,28	19,3 ± 0,2*	18,48 ± 0,22*
α -Токоферол _{эр} , мкмоль/л	118,47 ± 0,82	115,4 ± 1,06*	112,91 ± 1,16*	112,0 ± 0,83*
Кат _{эр} ммоль, H ₂ O ₂ /с · гНб	2,01 ± 0,18	2,72 ± 0,21	3,3 ± 0,21*	3,62 ± 0,19*
АЛТ, мкмоль/мин · л	4,56 ± 0,27	5,09 ± 0,22	6,04 ± 0,31*	8,69 ± 0,59*
АСТ, мкмоль/мин · л	3,5 ± 0,26	3,92 ± 0,21	5,43 ± 0,27*	6,14 ± 0,39*
NOx _{пл} , мкмоль/л	4,42 ± 0,57	5,07 ± 0,83	5,31 ± 0,55	5,42 ± 0,6

Примечание. Здесь и в табл. 2: пл — плазма, эр — эритроциты, * — изменения достоверны по отношению к исходному значению ($p < 0,05$).

Таблица 2. Влияние совместной инфузии L-аргинина и L-NAME на показатели смешанной венозной крови при ишемии-реперфузии печени у кроликов ($M \pm m, n = 8$).

Показатель	До ишемии	30 мин ишемии	Реперфузионный период	
			30 мин	120 мин
ДК _{пл} , ΔD_{233} /мл	0,64 ± 0,06	1,2 ± 0,14*	0,93 ± 0,1*	1,18 ± 0,17*
ДК _{эр} , ΔD_{233} /мл	5,54 ± 0,65	7,76 ± 0,81*	6,57 ± 0,8	8,45 ± 0,88*
ОШ _{пл} , ЕД/мл	8,71 ± 0,33	10,32 ± 0,37*	11,06 ± 0,65*	10,05 ± 0,47*
ОШ _{эр} , ЕД/мл	40,24 ± 1,0	50,3 ± 2,87*	52,66 ± 3,97*	48,23 ± 2,9*
α -Токоферол _{пл} , мкмоль/л	20,06 ± 0,38	19,28 ± 0,36	18,47 ± 0,35*	17,13 ± 0,43*
α -Токоферол _{эр} , мкмоль/л	118,35 ± 0,77	115,23 ± 0,97*	112,49 ± 1,12*	111,3 ± 1,07*
Кат _{эр} ммоль, H ₂ O ₂ /с · гНб	2,13 ± 0,21	2,74 ± 0,28	3,21 ± 0,18*	3,81 ± 0,31*
АЛТ, мкмоль/мин · л	4,58 ± 0,25	4,83 ± 0,16	6,74 ± 0,35*	8,57 ± 0,7*
АСТ, мкмоль/мин · л	3,77 ± 0,47	4,65 ± 0,32	6,15 ± 0,27*	7,16 ± 0,61*
NOx _{пл} , мкмоль/л	4,26 ± 0,69	5,1 ± 1,03	5,85 ± 0,73	5,02 ± 0,52

дом ультрафиолетовой спектрофотометрии при длине волны 233 нм, типичной для конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов [1]. Уровень ОШ определяли по интенсивности флюоресценции хлороформного экстракта при длине волн возбуждения и эмиссии 344 и 440 нм, соответственно [9], на спектрофлюориметре F-4010 фирмы “Hitachi”.

Содержание α -токоферола изучали методом флюориметрического определения по интенсивности флюоресценции гексанового экстракта [5] на спектрофлюориметре F-4010 фирмы “Hitachi”. В качестве стандарта использовали α -токоферол фирмы “Sigma”. Каталазную активность в биологическом материале оценивали спектрофотометрическим методом, основанном на способности перекиси водорода (H₂O₂) образовывать с солями молибдена стойко окрашенный комплекс, на спектрофотометре СФ-46 ЛОМО [6]. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При введении ингибитора NO-синтазной функции и L-аргинина в условиях ишемии-реперфузии печени у кроликов в крови наблюдается увеличение содержания продуктов

ПОЛ (ДК, ОШ) (табл. 1). Так, в плазме и эритроцитах печеночной венозной крови в конце постишемического периода уровень ДК превышал исходный на 65 ($p < 0,05$) и 66,9 % ($p < 0,05$) соответственно. Содержание ОШ в плазме и эритроцитах печеночной венозной крови конце реперфузии возросло на 35,3 ($p < 0,05$) и 27,6 % ($p < 0,05$) соответственно. Схожее изменение данных показателей ПОЛ наблюдалось и в смешанной венозной крови (табл. 2). Так, содержание ДК и ОШ в плазме смешанной венозной крови в конце реперфузии превышало исходное на 85,8 ($p < 0,05$) и 15,4 % ($p < 0,05$) соответственно.

Одновременно в эритроцитах крови наблюдалось повышение активности каталазы к концу реперфузионного периода (табл. 1 и 2). Так в печеночной венозной крови на 120-й минуте реперфузии активность фермента в эритроцитах увеличилась на 79,9 % ($p < 0,05$), а в эритроцитах смешанной венозной крови — на 78,9 % ($p < 0,05$). Уровень α -токоферола в исследуемых образцах крови в реперфузионном периоде снижался. Содержание NOx на протяжении экспериментов при этом не изменялось. Активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) в плазме печеночной и смешанной венозной крови в конце постишемического периода возрастала на 90,5 ($p < 0,05$) и 87 % ($p < 0,05$) соответственно. Активность аспаратаминотрансферазы (АСТ) в этих образ-

Таблица 3. Влияние совместной инфузии L-аргинина и L-NAME на показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния печени при ишемии-реперфузии у кроликов ($M \pm m$)

Показатель	До ишемии	30 мин ишемии	120 мин реперфузии
ДК, $\Delta D_{233}/\Gamma$	$4,97 \pm 0,54$	$7,8 \pm 0,7^*$	$9,3 \pm 0,71^*$
ОШ, ЕД/г	$120,33 \pm 12,47$	$180,26 \pm 17,95^*$	$363,38 \pm 52,6^*$
α -Токоферол, нмоль/г	$197,73 \pm 6,76$	$188,34 \pm 3,51$	$144,73 \pm 5,55^*$
Каталаза, ммоль $H_2O_2/\Gamma \cdot c$	$8,48 \pm 0,89$	$9,21 \pm 1,33$	$14,14 \pm 1,13^*$

Примечание. * — изменения достоверны по отношению к доишемическому значению ($p < 0,05$).

цах крови в конце реперфузии также возростала (табл. 1 и 2).

В конце реперфузии содержание ДК в печени увеличилось на 87,2 % ($p < 0,05$ по отношению к контролю, табл. 3). Уровень ОШ повысился на 202 % ($p < 0,05$ по отношению к контролю). Содержание α -токоферола в печени в конце реперфузии понизилось на 26,8% ($p < 0,05$) по отношению к доишемическому уровню. Одновременно возросла активность каталазы на 69,1% ($p < 0,05$). Данные изменения в конце реперфузии свидетельствуют о значительном нарушении прооксидантно-антиоксидантного баланса в печени кроликов, получавших одновременно L-аргинин и L-NAME.

Проведенные исследования показали, что в условиях ингибирования NO-синтазной функции организма у кроликов в конце реперфузионного периода наблюдаются тяжелые нарушения прооксидантно-антиоксидантного баланса (увеличение содержания ДК и ОШ, активности каталазы, снижение концентрации α -токоферола), что способствовало ухудшению функционального состояния печени (повышение активности АЛТ и АСТ). Данные нарушения прооксидантно-антиоксидантного состояния схожи с теми, которые обычно наблюдаются у этих экспериментальных животных при ишемии-реперфузии печени [2]. Защитный эффект L-аргинина, по-видимому, не мог реализоваться вследствие ингибирования синтеза NO в постишемическом периоде. Протекторное влияние NO на печень может быть связано с подавлением им активности купферовских клеток при реперфузии [10]. Возможно, под действием эндогенно образующегося NO улучшаются условия микроциркуляции в органе в постишемическом периоде. Вазодилатация под действием NO может устранять неблагоприятные последствия феномена отсутствия повторного кровотока (no-reflow) в ор-

гане [7]. Окись азота может регулировать потребление кислорода клетками и принимать участие в оптимизации метаболизма митохондрий гепатоцитов в реперфузионном периоде [12]. Полученные данные указывают на важную роль NO в механизме протекторного влияния L-аргинина на печень при ишемии-реперфузии.

ВЫВОДЫ

1. L-аргинин на фоне ингибирования эндогенной продукции NO с помощью метилового эфира N_o-нитро-L-аргинина не оказывает защитного действия на печень при ишемии-реперфузии у кроликов.

2. Эндогенная выработка NO в постишемическом периоде является эффективным механизмом защиты от реперфузионных повреждений печени.

Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (договор № Б04М-180).

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Н. Ф. Хмара, *Лаб. дело*, № 2, 60 – 64 (1988).
2. В. В. Зинчук, М. Н. Ходосовский, И. К. Дремза, *Пат. физиол. и эксп. терапия*, 4, 8 – 11 (2002).
3. С. П. Львова, Т. Ф. Горбунова, Е. М. Абаева, *Вопр. мед. химии*, 39(3), 21 – 24 (1993).
4. М. Н. Ходосовский, В. В. Зинчук, *Экспер. и клин. фармакол.*, 66(3), 39 – 43 (2003).
5. Р. Ч. Черняускене, 3,3. Варшкявичене, П. С. Грибаускас, *Лаб. дело*, № 6, 362 – 365 (1984).
6. O. I. Aruoma and S. L. Cuppett, *Antioxidant Methodology: in vivo and in vitro Concepts*, AOCs Press (1997).
7. J. C. Cutrn, M. G. Perrelli, B. Cavalieri, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, 33(9), 1200 – 1208 (2002).
8. M. G. Espey, K. M. Miranda, M. Feelisch, et al., *Annu. N. Y. Acad. Sci.*, 899, 209 – 221 (2000).
9. B. L. Fletcher, C. J. Dillard, and A. L. Tappel, *Analyt. Biochem.*, 52(1), 1 – 19 (1973).
10. I. N. Hines, H. Harada, S. Flores, et al., *Biomed. Pharmacother.*, 59(4), 183 – 189 (2005).
11. Y. Kato, J. Tanaka, and K. Koyama, *J. Surg. Res.*, 95(2), 99 – 106 (2001).
12. J. S. Kim, S. Ohshima, P. Padiaditakis, and J. J. Lemasters, *Hepatology*, 39(6), 1533 – 1543 (2004).
13. S. Reitman, S. Frankel, and J. Clin. Path., 28(1), 56 – 63 (1957).
14. D. A. Wink, J. A. Cook, R. Pacelli, et al., *Toxicol. Lett.*, 82 – 83, 221 – 226 (1995).

Поступила 27.10.05

THE MECHANISM OF L-ARGININE PROTECTIVE INFLUENCE ON THE LIVER UNDER ISCHEMIA – REPERFUSION CONDITIONS

M. N. Khodosovskii

Grodno State Medical University, Grodno, ul. Gor'kogo 80, 230015 Republic of Belarus,

Previous investigations indicated a protective effect of L-arginine (300 mg/kg) against hepatic reperfusion injury. This was an investigation of the mechanism of this protective effect. The infusion of L-arginine under the conditions of inhibited NO synthesis (L-NAME, 10 mg/kg) significantly increased lipid peroxidation processes and transaminase activity and decreased antioxidant defense in postischemic liver. It is concluded that protective mechanism of L-arginine against hepatic reperfusion injury is associated with NO synthesis.