

Tung-Ming Leung<sup>1,2</sup>, George L. Tipoe<sup>2</sup>,  
Emily C. Liong<sup>2</sup>, Thomas Y.H. Lau<sup>3</sup>,  
Man-Lung Fung<sup>2</sup>, Amin A. Nanji<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Университет Далхауз, Халифакс, Канада

<sup>2</sup> Университет Гонконга, Гонконг

<sup>3</sup> Гонконгский политехнический университет, Гонконг

## Эндотелиальная синтаза оксида азота как важный фактор при экспериментальном фиброзе печени\*

### Ключевые слова

Тетрахлорид углерод, хроническое повреждение печени, L-аргинин, синтаза оксида азота.

Независимо от этиологии повреждение печени вызывает выброс большого количества разных цитокинов и факторов роста, что приводит к фиброзу печени, наблюдающемуся при многих хронических заболеваниях печени. Накопление внеклеточного матрикса (ВКМ) в печени может приводить к циррозу или гепатоклеточной карциноме (Milani и соавт., 1995; Bissell, 1998; Giannelli и соавт., 2003; Bataller & Brenner, 2005). Важным является ослабление процесса накопления ВКМ в печени путем определения факторов, которые вызывают хроническое повреждение печени и фиброз.

Одним из основных осложнений при тяжелых заболеваниях печени является портальная гипертензия (Gines и соавт., 2004). Механизмы, приводящие к повышению внутрипеченочной резистентности, не совсем понятны, но считается, что определенную роль в этих механизмах играют изменения в экспрессии/активности синтазы оксида азота (NOS) и образование оксида азота (NO). NO образуется преимущественно при помощи ферментов индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) в печени (Marletta и соавт., 1998). NO выполняет различные функции в организме, которые включают клеточные сигналы (вторичный мессенджер), антимикробную способность, также NO является очень мощным вазодилататором при регуляции тонуса сосудов

(Mittal и соавт., 1994; Gupta и соавт., 1998; Laroux и соавт., 2001; Blaise и соавт., 2005). Синтезируемый при помощи eNOS NO в печени является важным фактором регуляции нормального печеночного кровотока (Palmer и соавт., 1987). L-аргинин является субстратом для всех изоформ NOS при продукции NO (Bruckdorfer, 2005). Показана его эффективность в отношении облегчения портальной гипертензии у пациентов с циррозом печени (Kakumitsu и соавт., 1998).

Другое исследование показало, что происходит перераспределение экспрессии eNOS и iNOS при хронических заболеваниях печени (Wei и соавт., 2002). Более того, экспрессия iNOS и eNOS снижена в синусоидальных эндотелиальных клетках, изолированных из печени при длительном влиянии повреждающих факторов (Petermann и соавт., 1999). Эти данные свидетельствуют о том, что разные изоформы NOS играют разную роль в печени. Поэтому нарушение экспрессии разных изоформ NOS является, возможно, ключевым фактором прогрессирования хронического повреждения печени.

Мы предположили, что продуцируемый eNOS NO является основным фактором в ускорении накопления ВКМ вследствие нарушения экспрессии различных про-фиброгенных факторов, вызванное хроническим повреждением печени. Целью этого исследования было изучение различных фиброгенных факторов и определение роли двух основных изоформ NOS (eNOS и iNOS) в ответ на введение аргинина и ингибитора iNOS. Мы использовали животную модель фиб-

\* International Journal of Experimental Pathology.— 2008.— Vol. 89.— P. 241—250.

роза печени для определения влияния аргинина и ингибитора iNOS на разные изоформы NOS и прогрессирующее фиброзы печени.

## Материалы и методы

### *Животная модель и препараты*

Восьминедельные мыши ICR содержались в стандартных условиях со свободным доступом к воде на рационе в соответствии с требованиями университета Гонконга и рекомендаций Национального института здоровья. Мыши были распределены на 8 групп ( $n = 10-15$ ): 1-я — только питание (физиологический раствор/оливковое масло); 2-я — тетрахлорид углерода ( $CCl_4$ , 50 мкл/кг); 3-я — D-аргинин (200 мг/кг); 4-я — D-аргинин +  $CCl_4$ ; 5-я — 5-метиллизотиомочевинный гемисульфат (SMT, 10 мг/кг); 6-я — L-аргинин (200 мг/кг); 7-я — SMT +  $CCl_4$ ; 8-я — L-аргинин +  $CCl_4$ . D-аргинин, L-аргинин и SMT были получены от Sigma, Сент-Луис, США.  $CCl_4$  растворяли в оливковом масле и вводили два раза в неделю интраперитонеально. SMT, L-аргинин и D-аргинин разводили в физиологическом растворе, вводили подкожно каждый день и давали за 30 мин до введения  $CCl_4$ . Мышей усыпляли после 8-недельного лечения. Во всех экспериментальных группах мыши за 12 ч до смерти голодали.

### *Подготовка тканей*

#### *и окрашивание Сириусом красным*

Блоки свежей ткани печени фиксировали в 4 % фосфат-буферном формалине и дегидратировали. Из залитых парафином тканей изготавливали срезы 5 мкм толщиной. Количественный анализ накопления коллагена в тканях проводили при помощи окрашивания Сириусом красным и морфометрического анализа. Секции ткани окрашивали 0,1 % пикро-Сириусом красным (Polysciences Inc., Вашингтон, США) в насыщенном водном растворе пикриновой кислоты в течение 1 ч, после чего проводилась обработка 0,01 % гидрохлорной кислоты. Подсчет коллагена, окрашенного Сириусом красным, проводили при помощи Leica анализатора (Leica Microsystems Ltd, Милтон Кейнс, Великобритания). Все срезы были осмотрены одним и тем же человеком.

### *Измерение сывороточной*

#### *аланинаминотрансферазы и общего 8-изопроста*

Сывороточные уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ) и 8-изопроста исследовали, как описано ранее (Тирое и соавт., 2006). Уровень сывороточной АЛТ указывал на степень некроза, общее количество 8-изопроста было маркером оксидативного стресса, который измеряли при

помощи 8-изопростан EIA набора (Cayman Chemical, Анна Арбор, США).

### *Метод полимеразно-цепной реакции с обратной транскриптазой*

Общие РНК были экстрагированы из ткани печени при помощи ядерно-спиновых наборов для очищения нуклеиновых кислот (CLONTECH Laboratories, Inc., Пало Алто, США). Первые элементы кДНК были приготовлены по инструкциям в SuperScript системы для first-strand синтеза для полимеразно-цепной реакции (ПЦР) набора с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) (Life Technologies, Карлсбад, США). Прямые и обратные праймеры, использованные в ПЦР, приведены в таблице. Термические циклы ПЦР были такими: денатурация ПЦР смеси при 95 °С в течение 15 мин и затем амплификация (95 °С в течение 1 мин, 60 °С в течение 1 мин, 72 °С в течение 1 мин) на 30 циклов (трансформирующий фактор роста  $\beta_1$  (ТФР- $\beta_1$ ) и проколлаген-I), на 35 циклов (eNOS) и на 37 циклов (iNOS). Последняя обработка проводилась при температуре 72 °С в течение 10 мин. ПЦР продукты были растворены в 2 % агаре.

### *Западный блот-анализ*

Протеины цитозоля и ядра были экстрагированы, как описано выше (Тирое и соавт., 2006). Цитозольные протеины были смешаны с буфером (0,1 моль Tris-HCl с pH 6,8, 20 % глицерол, 4 % SDS, 0,2 % бромфенол синий и 5,25 %  $\beta$ -меркаптоэтанол), после чего подлежали электрофорезу в полиакриламидном геле. Протеины переносили в Immun-Blot™ PVDF Membrane (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, США) в блок для электрофореза TE-серии. Мембрану инкубировали в блокирующем буфере в течение 3 ч перед инкубацией с первичными антителами в течение ночи при температуре 4 °С: iNOS (1 : 500 раствор; Transduction Lab, Сан Хосе, США); eNOS (1 : 1000 раствор; Transduction Lab); нитротирозин (1 : 1000 раствор, Zymed Laboratories Inc., США);  $\beta$ -актин (Sigma). Мембрану инкубировали во вторичных антителах (1 : 2000 раствор) в течение 2 ч при комнатной температуре. Экспрессию протеинов, связанных с антителами, определяли при помощи ECL набора для определения блоттинга (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Букингемшир, Великобритания).

### *Определение шифта электрофоретической мобильности (EMSA)*

Ядерный фактор капша  $\beta$  (NF- $\kappa$ B) и активаторный протеин-1 (AP-1) являются основными факторами транскрипции для iNOS и eNOS со-

Таблица. Праймеры, используемые для ОТ-ПЦР

Целевой ген	Последовательность	
iNOS	Прямая Обратная	5'-ГТГТГАЦААГЦАЦАТТТТГ-3' 5'-ГГЦТТГАЦТТТТЦАЦТЦТГЦ-3'
eNOS	Прямая Обратная	5'-ГАЦЦЦТЦАЦЦГЦТАЦААЦАТ-3' 5'-ЦАЦАГААГТТГТТГТАТГЦТ-3'
ТФР- $\beta_1$	Прямая Обратная	5'-ЦТТЦАГЦТЦАЦАГАГААГААЦТГЦ-3' 5'-ЦАЦГАТЦАТТТТГГАЦААЦТГЦТЦ-3'
Проколлаген-I	Прямая Обратная	5'-ТГЦЦГТГАЦЦТЦААГАТГТГЦЦ-3' 5'-ЦАТЦАЦААГЦТГЦТГТАГТТГ-3'
ГАФДГ	Прямая Обратная	5'-ЦЦТТЦАТТГАЦЦТЦААЦТАЦАТГТТ-3' 5'-ТЦАТТТТЦАТАЦАГГАААТГАЦТ-3'

ответственно. Фосфорилированные и очищенные олигонуклеотиды, комплементарные NF- $\kappa$ B или AP-1 (Promega, Мадисон, США), были смешаны с 24 мкг экстракта ядерных протеинов и 10  $\times$  буфером Gel Shift Binding (200 ммоль Tris-HCl с pH 7,8, 1 моль NaCl, 50 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 10 ммоль EDTA и 50 ммоль дитиотреитола). Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин перед помещением в 4 % неденатурирующий полиакриламидовый гель. Гель был высушен и помещен на рентгеновскую пленку, а сигнал подсчитывали при помощи лазерной сканирующей денситометрии. Как и в предыдущих исследованиях, специфичность связывания NF- $\kappa$ B была подтверждена при помощи анализа с конкурентными реагентами и способности специфических антител связывать протеин-ДНК комплекс. В анализе с конкурентными реагентами добавление в 100 раз большего количества немаркированного конкурентного комплементарного олигонуклеотида предотвращало связывание. Эксперименты с суперсдвигом доказали присутствие субъединицы p50 в связывающих комплексах.

#### Статистический анализ

Результаты представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Сравнение между разными группами проводили при помощи U-теста Манна-Уитни (двухстороннего) с использованием GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., Сан-Диего, США). Значение  $p < 0,05$  считали статистически значимым результатом.

#### Результаты

##### *Роль L-аргинина и SMT в модулировании вызванного CCl<sub>4</sub> повреждения печени и оксидативного стресса*

Повышение активности сывороточной АЛТ наблюдали после хронической интоксикации

CCl<sub>4</sub> ( $p < 0,01$ ; рис. 1). Как L-аргинин, так и SMT значительно уменьшали CCl<sub>4</sub>-индуцированное повышение уровня АЛТ ( $p < 0,01$ ). При CCl<sub>4</sub>-индуцированном повреждении печени сывороточные уровни 8-изопростана и образование нитротирозина в печени достоверно увеличивались по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ) (см. рис. 1). Применение L-аргинина и SMT достоверно уменьшало сывороточные уровни общего 8-изопростана и нитротирозина ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группами аргинин + CCl<sub>4</sub>.

##### *Применение L-аргинина давало лучшую степень супрессии, чем SMT в отношении накопления коллагена*

Результаты окрашивания Сириусом красным приведены на рис. 2. В нормальной печени выявлены лишь небольшие фибротические изменения, такие как фиброз вокруг центральной вены и перипортальный фиброз, в то время как у мышей, получающих CCl<sub>4</sub>, наблюдали большое количество мест отложения коллагена. Большинство из них находилось вокруг центральной вены. Лечение либо аргинином, либо SMT эффективно уменьшало количество отложений коллагена. Степень окраски Сириусом красным достоверно снижалась в группах SMT + CCl<sub>4</sub> и L-аргинин + CCl<sub>4</sub> (см. рис. 2Д-Ж).

Более чем 10-кратное повышение количества коллагена обнаружено в окологеточной области ( $p < 0,001$ ), 2- или 3-кратное — в центральной вене ( $p < 0,001$ ) и повышение общего количества коллагена ( $p < 0,001$ ) соответственно в группах CCl<sub>4</sub> и D-аргинина + CCl<sub>4</sub> по сравнению с контролем (см. рис. 2). Достоверное уменьшение отложения коллагена было отмечено в группах, получавших ранее SMT и L-аргинин. Интересно, что в группе L-аргинин + CCl<sub>4</sub> уменьшение количества коллагена было более выраженным, чем в группе SMT + CCl<sub>4</sub> ( $p < 0,01$ ).

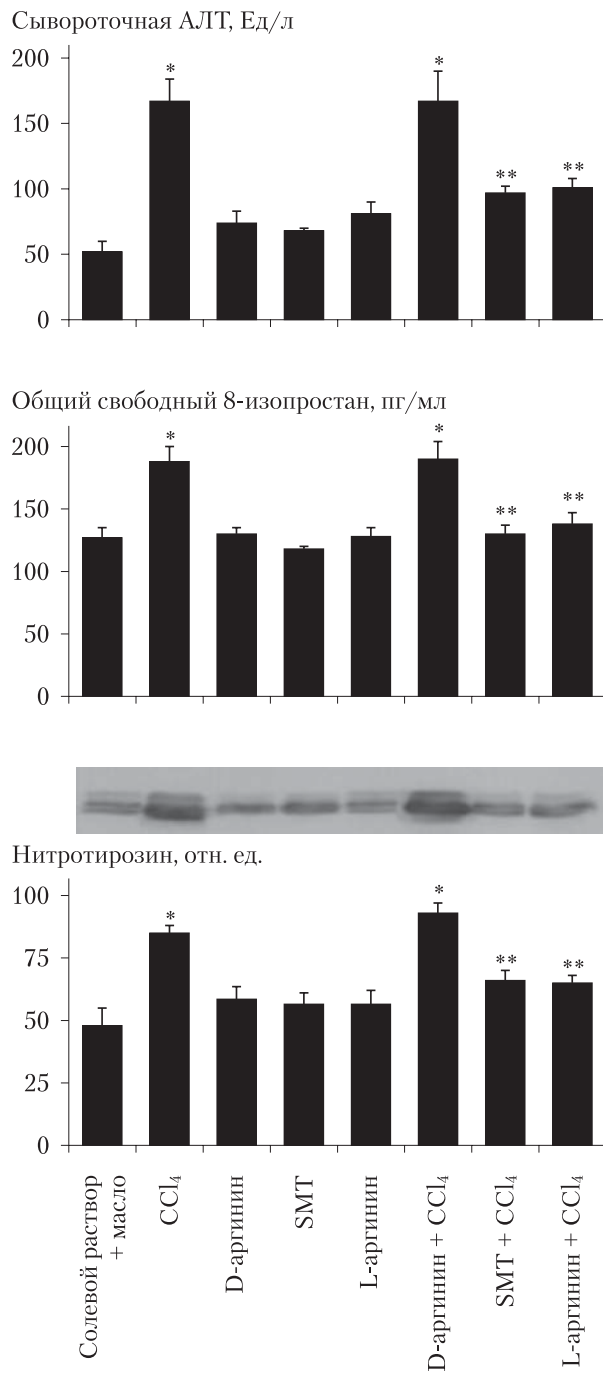


Рис. 1. Группы, получавшие лечение CCl<sub>4</sub> и D-аргинином + CCl<sub>4</sub> продемонстрировали максимальный уровень сывороточной АЛТ, что указывает на повреждение печени после хронического применения CCl<sub>4</sub> (\* $p < 0,01$ , по сравнению с контролем). Предварительное лечение SMT или L-аргинином, после которого следовал прием CCl<sub>4</sub>, способствовало уменьшению уровня АЛТ (\*\* $p < 0,01$ , по сравнению с группой CCl<sub>4</sub>). Содержание маркеров оксидативного стресса — сывороточного общего 8-изопростана и нитротирозина — было наибольшим в группах CCl<sub>4</sub> и D-аргинина + CCl<sub>4</sub> (\* $p < 0,05$  и  $p < 0,001$  соответственно, по сравнению с контролем). Предварительное лечение SMT или L-аргинином достоверно снижало уровни общего 8-изопростана и нитротирозина, по сравнению с группой CCl<sub>4</sub> (\*\* $p < 0,05$ )

### Влияние L-аргинина и SMT на уровни мРНК ТФР- $\beta_1$ и проколлагена-I

Полуколичественная ОТ-ПЦР для мРНК ТФР- $\beta_1$  и проколлагена-I выполнялась для дальнейшей оценки печеночного фиброза. У мышей, получающих CCl<sub>4</sub> (группы CCl<sub>4</sub> и D-аргинин + CCl<sub>4</sub>), уровни мРНК ТФР- $\beta_1$  и проколлагена-I были достоверно выше по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ) (рис. 3). CCl<sub>4</sub>-индуцированная экспрессия ТФР- $\beta_1$  и проколлагена-I была достоверно ниже в группах L-аргинина и SMT ( $p < 0,001$ ). Показатели мРНК для ТФР- $\beta_1$  и проколлагена-I сопоставимы с результатами, полученными при окраске Сириусом красным (см. рис. 2). Важно, что терапия L-аргинином вызывала большее угнетение экспрессии мРНК и для ТФР- $\beta_1$ , и для проколлагена-I, чем применение SMT ( $p < 0,001$ ).

### ДНК-связывающая активность NF- $\kappa$ B и экспрессия iNOS при CCl<sub>4</sub>-индуцированном фиброзе

ДНК-связывающая активность NF- $\kappa$ B и экспрессия NF- $\kappa$ B-индуцибельной изоформы NOS показаны на рис. 4. 4-разовое повышение NF- $\kappa$ B связывающей активности выявлено в группах CCl<sub>4</sub> и D-аргинин + CCl<sub>4</sub> ( $p < 0,001$ ). Сопоставимыми со снижением ее активности были изменения NF- $\kappa$ B-регулирующего гена, iNOS. L-аргинин демонстрировал супрессию мРНК и уровней протеинов так же, как SMT ( $p < 0,05$  и  $p < 0,001$  соответственно). iNOS продемонстрировала примерно двухразовое увеличение как мРНК, так и протеинов после терапии CCl<sub>4</sub> или D-аргинином + CCl<sub>4</sub> ( $p < 0,001$  и  $p < 0,05$  соответственно), по сравнению с контролем (см. рис. 4). Предварительное лечение L-аргинином или SMT давало достоверное и значительное снижение мРНК iNOS и экспрессии протеинов ( $p < 0,05$  и  $p < 0,001$  соответственно). L-аргинин давал более выраженное снижение, чем SMT уровней мРНК iNOS и протеинов ( $p < 0,05$ ).

### Снижение ДНК-связывающей активности AP-1 и экспрессии eNOS у мышей, получавших CCl<sub>4</sub>

ДНК-связывающая активность AP-1 и уровень экспрессии eNOS приведены на рис. 5. В отличие от повышения активности NF- $\kappa$ B, активность AP-1 достоверно уменьшалась в группах CCl<sub>4</sub> и D-аргинин + CCl<sub>4</sub> ( $p < 0,01$ ). Эффект CCl<sub>4</sub>-индуцированного подавления AP-1 был меньше в группах L-аргинина и SMT ( $p < 0,001$ ). Уровни мРНК eNOS и протеинов были также значительно снижены после лечения CCl<sub>4</sub> по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ). Более того,

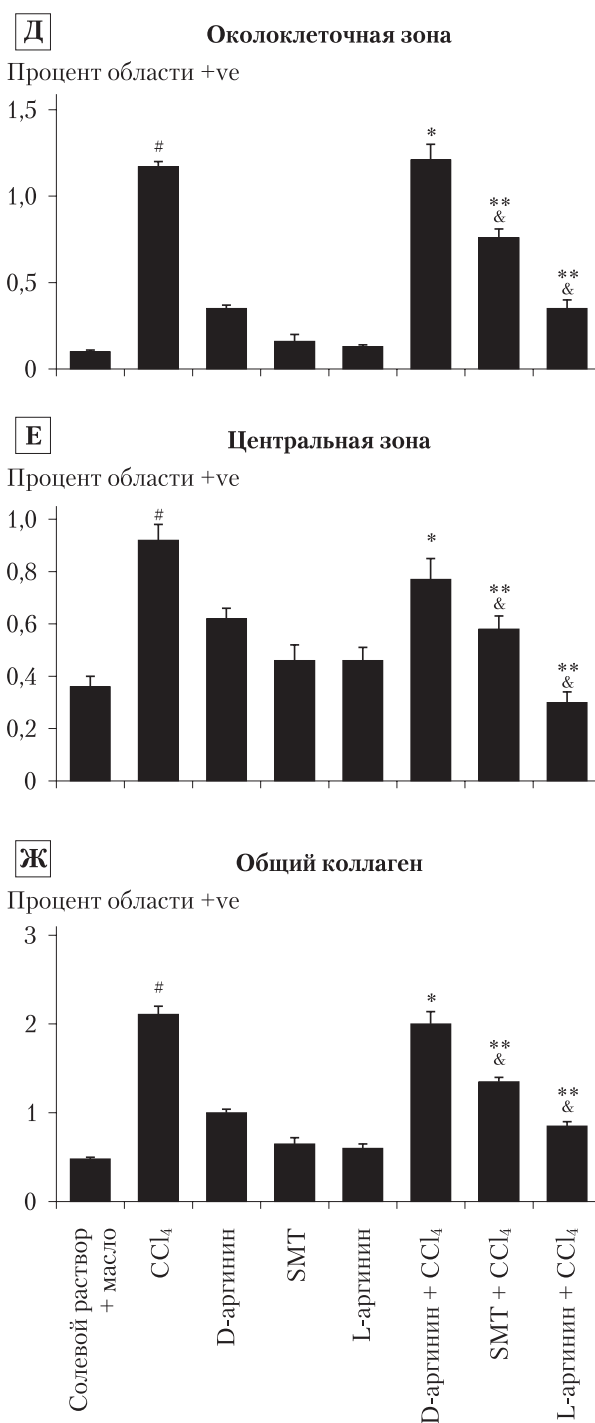
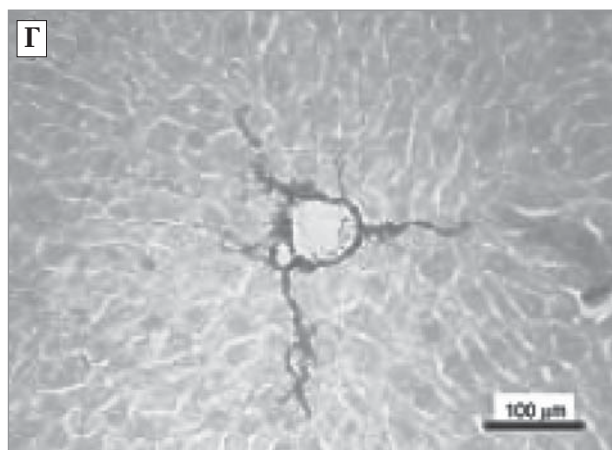
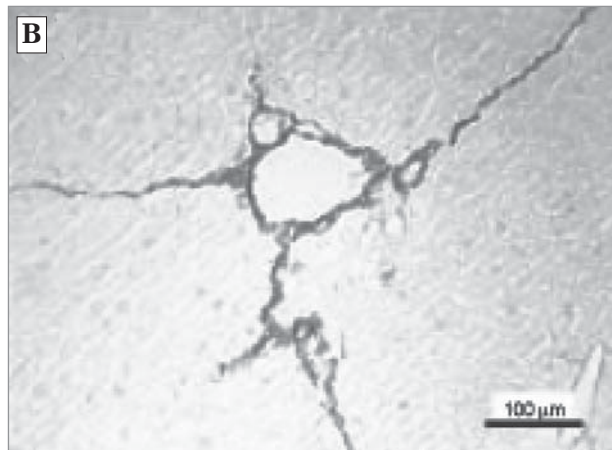
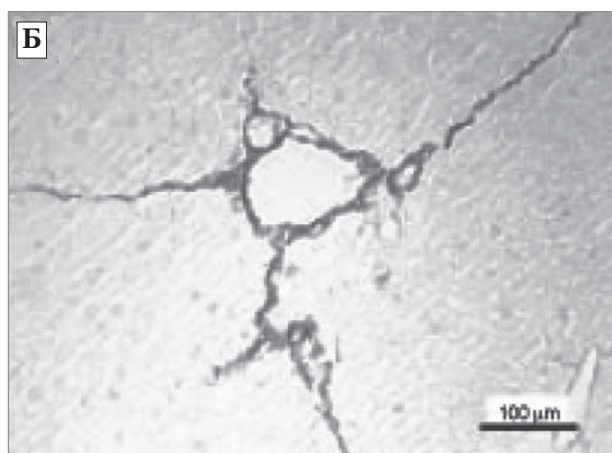
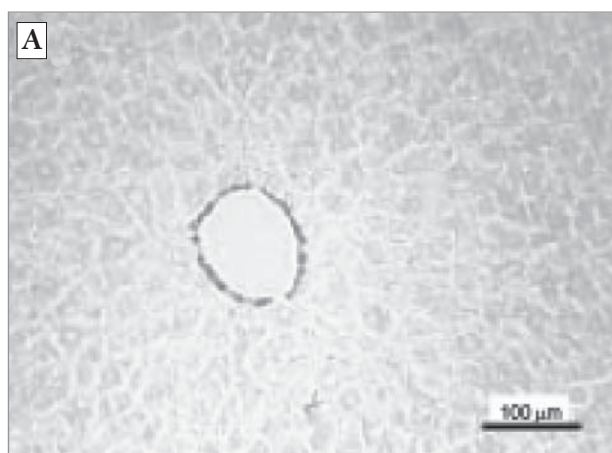


Рис. 2. Количественный анализ коллагена в группах лечения. Окраска Сириусом красным срезов печени в контрольной группе (А), у получающих CCl<sub>4</sub> мышей (Б), получающих лечение SMT и CCl<sub>4</sub> (В) и L-аргинином и CCl<sub>4</sub> (Е). Коллаген окрашен красным. Группы CCl<sub>4</sub> и D-аргинина + CCl<sub>4</sub> демонстрировали достоверное повышение количества отложенного коллагена по сравнению с контрольными группами (\* $p < 0,001$  и \* $p < 0,05$  соответственно). В группах, где проводилось предварительное лечение SMT или L-аргинином, отмечено достоверно меньшее отложение коллагена (\* $p < 0,001$ , по сравнению с группой CCl<sub>4</sub>). Предварительное лечение L-аргинином давало более сильный ингибиторный эффект, чем SMT (\*\* $p < 0,001$ )  $\times 200$

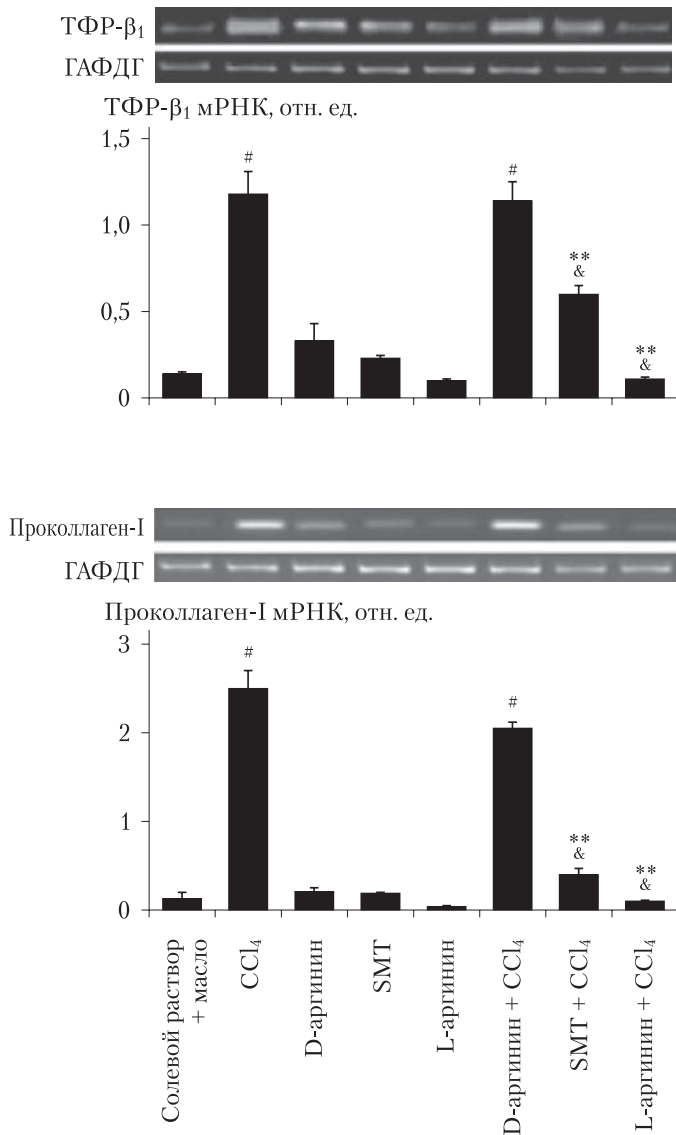


Рис. 3. Полуколичественная ПЦР, показывающая уровни мРНК ТФР-β<sub>1</sub> и проколлагена-I. При лечении (CCl<sub>4</sub>) и D-аргинином + CCl<sub>4</sub> выявлено достоверное повышение уровня экспрессии ТФР-β<sub>1</sub> (\*p < 0,001, по сравнению с контролем). SMT + CCl<sub>4</sub> и L-аргинин + CCl<sub>4</sub> способствовали достоверному снижению экспрессии ТФР-β<sub>1</sub>, вызванной CCl<sub>4</sub> (\*p < 0,001, по сравнению с группой CCl<sub>4</sub>), L-аргинин в большей степени ингибировал экспрессию ТФР-β<sub>1</sub>, чем SMT (\*\*p < 0,001). Экспрессия проколлагена-I повышалась в группах, получающих CCl<sub>4</sub> и D-аргинин + CCl<sub>4</sub> (\*p < 0,001, по сравнению с контролем). Предварительное лечение L-аргинином или SMT способствовало достоверному снижению экспрессии проколлагена-I, вызванной CCl<sub>4</sub> (\*p < 0,001, по сравнению с группой CCl<sub>4</sub>). Лечение L-аргинином оказывало более сильный ингибиторный эффект, чем SMT (\*\*p < 0,001)

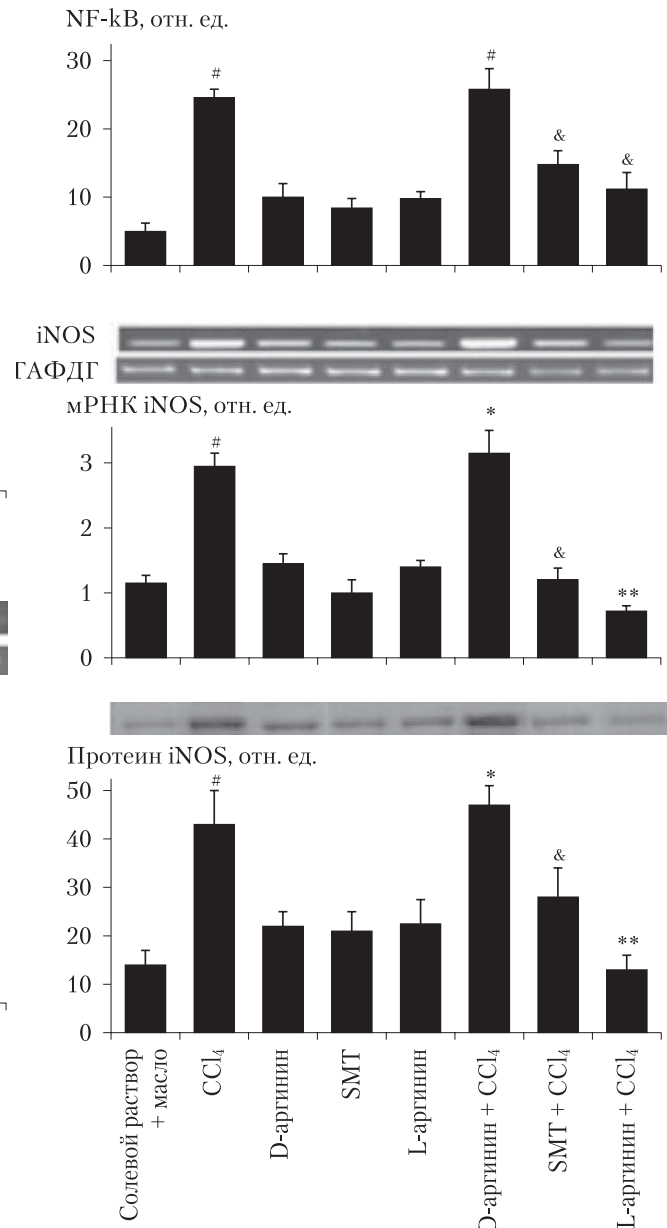


Рис. 4. ДНК-связывающая активность NF-κB в экспериментальных группах. В группах, получавших лечение CCl<sub>4</sub> и D-аргинином + CCl<sub>4</sub>, наблюдали повышенную ДНК-связывающую активность NF-κB (\*p < 0,01, по сравнению с контролем). Предварительное лечение SMT или L-аргинином способствовало уменьшению влияния CCl<sub>4</sub> на активность NF-κB (\*p < 0,001). Для оценки регулируемого NF-κB гена, iNOS определялась экспрессия мРНК iNOS и протеинов. При повреждении печени CCl<sub>4</sub>, а также в группе, получающей D-аргинин + CCl<sub>4</sub>, наблюдали высокий уровень мРНК iNOS и протеинов (\*p < 0,001 и \*p < 0,05 соответственно, по сравнению с контролем). Предварительное лечение SMT или L-аргинином оказывало выраженный ингибиторный эффект на экспрессию мРНК iNOS и уровень протеинов (\*p < 0,001 и \*\*p < 0,05 соответственно по сравнению с группой CCl<sub>4</sub>

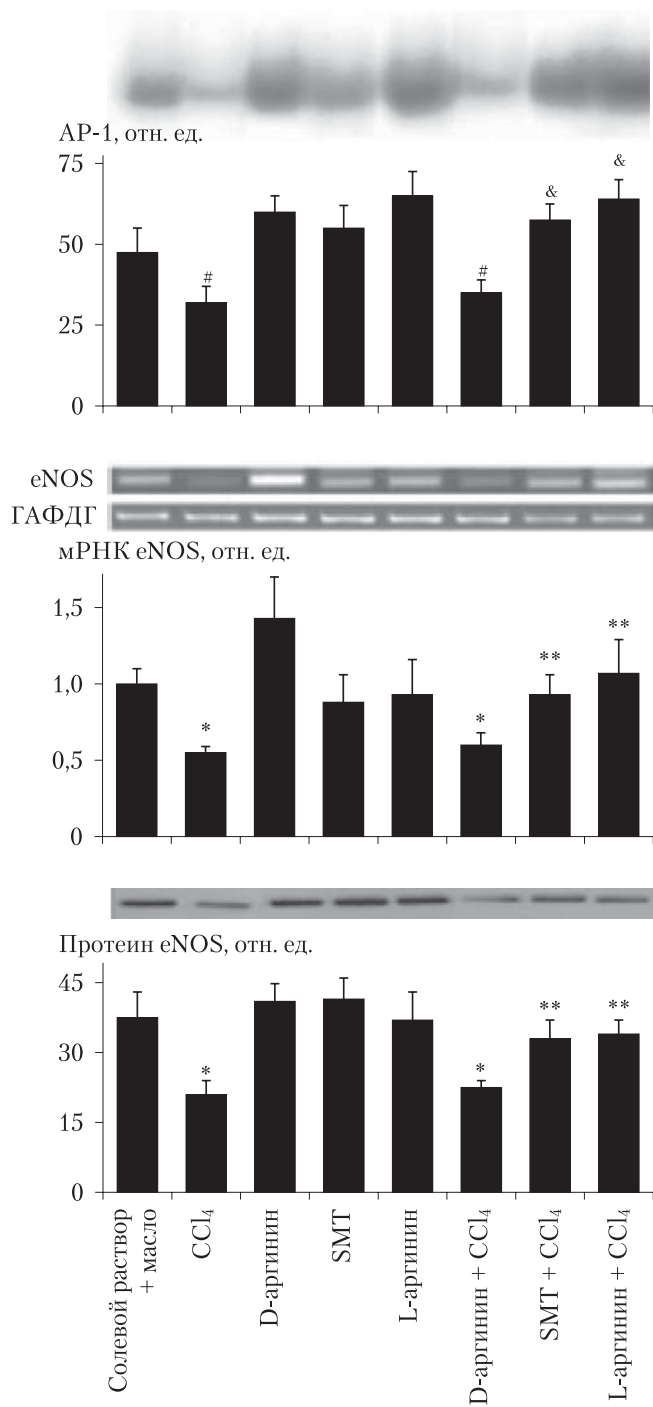


Рис. 5. ДНК-связывающая AP-1 в группах. В группах, получавших лечение CCl<sub>4</sub> и D-аргинином + CCl<sub>4</sub> наблюдали снижение активности AP-1 (\* $p < 0,01$  по сравнению с контролем). Предварительное лечение SMT или L-аргинином способствовало восстановлению активности AP-1 до уровня контрольных групп (\* $p < 0,001$  при сравнении с группой CCl<sub>4</sub>). Уровни экспрессии мРНК eNOS и протеинов достоверно снижались в группах CCl<sub>4</sub> и D-аргинина + CCl<sub>4</sub>, по сравнению с контролем (\* $p < 0,01$ ). В группах, где проводилось предварительное лечение SMT или L-аргинином, уровни экспрессии eNOS не отличались от контрольных значений (\*\* $p < 0,05$  по сравнению с группой CCl<sub>4</sub>). Восстановление уровня eNOS мРНК и протеинов вызывало параллельные изменения AP-1 связывающей активности в группах CCl<sub>4</sub>, L-аргинина и SMT

предварительное лечение L-аргинином или SMT достоверно повышало содержание мРНК eNOS ( $p < 0,05$ ) и уровни протеинов ( $p < 0,05$ ). Уровни eNOS нормализовались до контрольных уровней.

### Обсуждение

*В печени с фиброзом, вызванным CCl<sub>4</sub>, eNOS и iNOS являются медиаторами различных патогенетических звеньев*

Как прототипический эндотелиальный расслабляющий фактор NO является важной детерминантой тонуса кровеносных сосудов и кровоснабжения печени. После выяснения того, что все три изоформы NOS экспрессируются в печени, возникли вопросы, касающиеся роли NO в печени. Вопрос о том, влияет ли NO благотворно или негативно при хронических заболеваниях печени, остается все еще открытым. Считается, что повышенная продукция NO при циррозе печени является результатом высокой эндотоксемии и последующего повышения продукции цитокинов (Vallance & Moncada, 1991). Увеличение продукции NO считается основной причиной гипердинамической циркуляции крови при циррозе печени (Vallance & Moncada, 1991). Повреждающий эффект NO подтверждается тем фактом, что высокий уровень нитритов и нитратов в плазме коррелирует с тяжелым повреждением печени (Moussa и соавт., 2000; Coskun и соавт., 2001). Однако другие исследования показали, что повышение доступности NO различным донорам имеет защитные свойства (Bhathal & Grossman, 1985; Garcia-Pagan и соавт., 1999; Fiorucci и соавт., 2001).

В данном исследовании установлено, что выраженность экспрессии eNOS и iNOS была различной при хроническом повреждении печени. В модели вызванного CCl<sub>4</sub> фиброза печени экспрессия eNOS значительно уменьшалась и была частично связана с уменьшением ДНК-связывающей активности AP-1. С другой стороны, экспрессия iNOS и ДНК-связывающая активность ее транскрипторного фактора — NF-κB были повышены. Таким образом, побочные эффекты, вызванные NO, при хроническом повреждении печени скорее всего связаны с повышенным уровнем iNOS или сниженным — eNOS, или и тем и другим. В группе, получающей лечение ингибитором iNOS — SMT выявлен низкий уровень продукции NO вследствие выраженного снижения активности iNOS (см. рис. 4). Терапия субстратом NOS — L-аргинином приводила к повышению уровней AP-1 и eNOS по сравнению с мышами, получавшими CCl<sub>4</sub>. Применение L-аргинина уменьшало, а не усугубляло процесс

фиброза, что свидетельствует о своеобразном раздвоении между регуляцией изоформ NOS при прогрессировании фиброза. Как SMT, так и L-аргинин уменьшали уровень маркера оксидативного стресса — сывороточного 8-изопростана и образование нитротирозина до базального уровня. Лечение L-аргинином было не только более эффективным, чем SMT в отношении снижения уровня провоспалительных медиаторов, но также уменьшало тяжесть фиброза печени, вызванного  $\text{CCl}_4$ .

*Побочные эффекты  
повышенной экспрессии iNOS  
при хроническом повреждении печени*

Наши результаты показывают, что уровень экспрессии iNOS повышался после хронического приема  $\text{CCl}_4$  (см. рис. 4). Высокий уровень продукции NO, связанный с индукцией iNOS, является одним из основных маркеров воспалительного ответа (Moncada 1999). Высокая концентрация NO, вызванная iNOS в ответ на различные стимулы, например, повреждение клеток, может вызывать оксидативный стресс путем инициации перекисного окисления липидов и образование пероксинитритов ( $\text{ONOO}^-$ ). Лечение ингибитором iNOS — SMT эффективно снижало степень экспрессии iNOS, так же как и отложение коллагена в печени, что свидетельствует о том, что протекторный эффект SMT при хроническом повреждении печени может быть связан с уменьшением воспалительного ответа.

*Нарушение экспрессии eNOS  
при повреждении печени является  
важным фактором прогрессирования  
фиброгенеза в печени*

Несмотря на тот факт, что L-аргинин и SMT имеют сходный эффект в отношении остановки фиброза печени, вызванного  $\text{CCl}_4$ , L-аргинин является более мощным ингибитором отложения коллагена. Milani и соавт. (1992) также показали повышение уровня экспрессии ТФР- $\beta_1$  и проколлагена-I при хроническом повреждении печени. Проколлаген-I является предшественником различных типов коллагена, синтезируемого для процессов реконструкции (Canty & Kadler, 2005). ТФР- $\beta_1$  известен как стимулятор процесса регенерации печени после повреждения (Jung и соавт., 2000; Marek и соавт., 2002). Он также отвечает за стимуляцию синтеза ВКМ и угнетает деградацию избытка ВКМ в ткани печени. Экспрессия eNOS и ДНК-связывающая активность транскрипторного фактора AP-1 были снижены у мышей, получавших  $\text{CCl}_4$  (см. рис. 5).

AP-1 является основным транскрипторным фактором, который регулирует транскрипцию eNOS (Hoffmann и соавт., 2001), и его сниженная активность может, в частности, объяснить снижение уровня мРНК eNOS и протеинов. Предыдущие исследования показали нарушение продукции NO в синусоидальных областях в цирротической печени (Loureiro-Silva и соавт., 2003). Это приводит к эндотелиальной дисфункции в цирротической печени (Gupta и соавт., 1998; Shah и соавт., 1999; Cahill и соавт., 2001). Хотя уровень экспрессии eNOS не был нарушен в цирротической печени или при хронических заболеваниях печени по сравнению с контролем (Shah и соавт., 1999; Leifeld и соавт., 2002; Wei и соавт., 2002), наблюдалось перераспределение экспрессии eNOS в печени при циррозе (Wei и соавт., 2002). Wei и соавт. (2002) продемонстрировали высокий уровень экспрессии eNOS в синусовых эндотелиальных клетках в печени крыс, в отличие от значительного снижения экспрессии eNOS в синусовых эндотелиальных клетках циррозной печени с перевязанным желчевыводящим протоком. Уменьшение экспрессии eNOS в синусовой эндотелии должно приводить к индуцированной eNOS выработке NO, что приведет к повышению резистентности в печеночном микроциркуляторном русле. Хотя определение NO могло бы быть очень полезно в настоящем исследовании, мы не изолировали индивидуальные типы клеток (эндотелиальные клетки, Купферовы клетки, печеночные звездчатые клетки и гепатоциты) для точного определения источника образования NO. Синтез NO в печени в целом представляет собой результат сложного взаимодействия между разными типами клеток печени, что может быть довольно сложно интерпретировать.

Недавние исследования также выявили важную роль ренин-ангиотензиновой системы (РАС) при прогрессировании фиброза печени. РАС является гормональной системой, которая регулирует кровяное давление в организме. Также было показано, что ангиотензин-II, основной вазоконстриктор в РАС, активно участвует в фиброгенезе (Yoshiji и соавт., 2006; Li и соавт., 2007). Плазменный уровень ангиотензина-II значительно повышен у пациентов с циррозом печени и считается ключевым фактором портальной гипертензии (Ballet и соавт., 1988; Garcia-Pagan и соавт., 1995). Более того, ангиотензин-II также индуцирует пролиферацию печеночных звездчатых клеток, повышает уровень мРНК ТФР- $\beta_1$  и коллагена-I и стимулирует образование ВКМ (Bataller и соавт., 1998, 2000; Marshall и соавт., 2000). Поддержание нормального уровня про-



дукции NO, обеспечиваемой eNOS, при помощи L-аргинина будет способствовать поддержанию баланса между вазодилатацией и вазоконстрикцией и, таким образом, ослаблять прогрессирование фиброза.

Нарушенная эндотелиальная функция является ранним маркером многих заболеваний, включая хронические заболевания печени, часто еще до того, как можно выявить структурные изменения в синусовых клетках. Обнаружение того факта, что прием предшественника NO — L-аргинина предотвращает фиброз у мышей, получавших CCl<sub>4</sub>, дает почву для обсуждения терапевтической ценности манипуляций с аргинином путем метаболизма NO.

Хотя NO синтаза теоретически использует свой физиологический субстрат, экзогенное введение L-аргинина приводит к восстановлению нарушенной эндотелиальной функции, что является феноменом, называемым аргининовым парадоксом. Возможные причины такого парадокса включают восстановление нарушенного транспорта L-аргинина, кроме того, аргинин, возможно, действует как антиоксидант. Хотя в данном исследовании не было проведено измерение содержания NO, мы хотели бы отметить работу нескольких исследователей, которые показали повышение уровня NO у животных и мужчин, получавших аргинин. Было также показано, что L-аргинин предотвращает дисфункцию, вызванную кислородными радикалами путем либо удаления этих радикалов (Lass и соавт., 2002), либо увеличения времени образования супероксида через электронное взаимодействие с кислородом, связанным с гемом (Berka и соавт., 2004). Исследования также показывают, что диета с L-аргонином повышает концентрацию тетрагидробиоптерина (BH<sub>4</sub>) в эндотелиальных клетках и улучшает сосудистую функцию (Kohli и соавт., 2004). BH<sub>4</sub> является важным кофактором в продукции NO (Schmidt и соавт., 1992; Meiningер и соавт., 2000). Исследования *in vivo* Kohli и соавт. (2004) продемонстрировали, что добавление к диете аргинина повышает концентрацию BH<sub>4</sub> в эндотелиальных клетках.

## Выводы

Полученные результаты позволяют предположить, что eNOS и iNOS играют разные роли в развитии хронического повреждения печени. Мы предполагаем, что NO может обладать как протекторными, так и повреждающими свойствами при поражении печени, в зависимости от концентрации и длительности выработки NO. Более того, NO, вырабатываемый eNOS и iNOS, играет разную роль в регуляции повреждения печени, при том что нарушение экспрессии eNOS является важным фактором в регуляции прогрессирования фиброза печени. Результаты этого исследования совпадают с наблюдениями о том, что хроническое повреждение печени, индуцированное iNOS, происходит за счет высокого уровня продукции NO, что вызывает оксидативный стресс и приводит к повреждению клеток. В свою очередь, снижение продукции NO в синусоидах вследствие сниженной экспрессии или активности eNOS вызывает вазоконстрикцию и, возможно, уменьшение кровоснабжения в печени. Данное исследование также демонстрирует, что L-аргинин более эффективен, чем SMT, в отношении уменьшения фиброза печени, вызванного CCl<sub>4</sub>. Положительные эффекты L-аргинина на фиброз печени могут быть обусловлены его способностью поддерживать постоянный уровень eNOS-индуцированного синтеза NO в синусовой эндотелии, таким образом поддерживая нормальный печеночный кровоток, а также его антиоксидантным эффектом. Дальнейшие исследования регуляции активности eNOS могут дать больше информации о влиянии L-аргинина на цирроз печени.

Таким образом, прогрессирование фиброза в печени является результатом изменения экспрессии как iNOS, так и eNOS. Повышенная экспрессия iNOS вызывает оксидативный стресс и провоспалительное состояние, в то время как снижение экспрессии eNOS влияет на печеночную микроциркуляцию. Эффективность применения L-аргинина в плане угнетения процесса фиброза печени указывает на то, что нарушение экспрессии eNOS в синусах может быть одним из факторов фибротического поражения печени, хотя роль iNOS не может быть полностью исключена.

Перевод к. мед. н. М.Г. Романюк  
Институт урологии АМН Украины

## Список литературы

1. Ballet F, Chretien Y, Rey C, Poupon R. Differential response of normal and cirrhotic liver to vasoactive agents. A study in the isolated perfused rat liver // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*— 1988.— 244.— P. 283—289.
2. Bataller R, Brenner D.A. Liver fibrosis // *J. Clin. Invest.*— 2005.— 115.— P. 209—218.
3. Bataller R, Nicolas J.M., Gines P. et al. Contraction of human hepatic stellate cells activated in culture: a role for voltage-operated calcium channels // *J. Hepatol.*— 1998.— 29.— P. 398—408.
4. Bataller R, Gines P, Nicolas J.M. et al. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells // *Gastroenterology.*— 2000.— 118.— P. 1149—1156.
5. Berka V, Wu G, Yeh H.C., Palmer G, Tsai A.L. Three different oxygen-induced radical species in endothelial nitric oxide synthase oxygenase domain under regulation by l-arginine and tetrahydrobiopterin // *J. Biol. Chem.*— 2004.— 279.— P. 32243—32251.
6. Bhathal P.S. & Grossman H.J. Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators // *J. Hepatol.*— 1985.— 1.— P. 325—337.
7. Bissell D.M. Hepatic fibrosis as wound repair: a progress report // *J. Gastroenterol.*— 1998.— 33.— P. 295—302.
8. Blaise G.A., Gauvin D., Gangal M., Authier S. Nitric oxide, cell signaling and cell death // *Toxicology.*— 2005.— 208.— P. 177—192.
9. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide // *Mol. Aspects Med.*— 2005.— 26.— P. 3—31.
10. Cahill P.A., Redmond E.M., Sitzmann J.V. Endothelial dysfunction in cirrhosis and portal hypertension // *Pharmacol. Ther.*— 2001.— 89.— P. 273—293.
11. Canty E.G., Kadler K.E. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis // *J. Cell Sci.*— 2005.— 118.— P. 1341—1353.
12. Coskun U., Ozenirler S., Sancak B., Bukan N. Serum and ascitic fluid nitrate levels in patients with cirrhosis // *Clin. Chim. Acta.*— 2001.— 306.— P. 127—132.
13. Fiorucci S., Antonelli E., Morelli O. et al. NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*— 2001.— 98.— P. 8897—8902.
14. Garcia-Pagan J.C., Bosch J., Rodes J. The role of vasoactive mediators in portal hypertension // *Semin. Gastrointest.*— 1995.— 6.— P. 140—147.
15. Garcia-Pagan J.C., Escorsell A., Moitinho E., Bosch J. Influence of pharmacological agents on portal hemodynamics: basis for its use in the treatment of portal hypertension // *Semin. Liver Dis.*— 1999.— 19.— P. 427—438.
16. Giannelli G., Quaranta V., Antonaci S. Tissue remodeling in liver diseases // *Histol. Histopathol.*— 2003.— 18.— P. 1267—1274.
17. Gines P., Cardenas A., Arroyo V., Rodes J. Management of cirrhosis and ascites // *N. Engl. J. Med.*— 2004.— 350.— P. 1646—1654.
18. Gupta T.K., Toruner M., Chung M.K., Groszmann R.J. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats // *Hepatology.*— 1998.— 28.— P. 926—931.
19. Hoffmann A., Gloe T., Pohl U. Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism // *J. Cell. Physiol.*— 2001.— 188.— P. 33—44.
20. Jung S.A., Chung Y.H., Park N.H. et al. Experimental model of hepatic fibrosis following repeated periportal necrosis induced by allyl alcohol // *Scand. J. Gastroenterol.*— 2000.— 35.— P. 969—975.
21. Kakumitsu S., Shijo H., Yokoyama M. et al. Effects of l-arginine on the systemic, mesenteric, and hepatic circulation in patients with cirrhosis // *Hepatology.*— 1998.— 27.— P. 377—382.
22. Kohli R., Meininger C.J., Haynes T.E., Yan W., Self J.T., Wu G. Dietary l-arginine supplementation enhances endothelial nitric oxide synthesis in streptozotocin-induced diabetic rats // *J. Nutr.*— 2004.— 134.— P. 600—608.
23. Laroux F.S., Pavlick K.P., Hines I.N. et al. Role of nitric oxide in inflammation // *Acta Physiol. Scand.*— 2001.— 173.— P. 113—118.
24. Lass A., Suessenbacher A., Wolkart G., Mayer B., Brunner F. Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by l-arginine // *Mol. Pharmacol.*— 2002.— 61.— P. 1081—1088.
25. Leifeld L., Fielenbach M., Dumoulin F.L. et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in fulminant hepatic failure // *J. Hepatol.*— 2002.— 37.— P. 613—619.
26. Li X., Meng Y., Wu P., Zhang Z., Yang X. Angiotensin II and Aldosterone stimulating NF- $\kappa$ B and AP-1 activation in hepatic fibrosis of rat // *Regul. Pept.*— 2007.— 138.— P. 15—25.
27. Loureiro-Silva M.R., Cadelina G.W., Groszmann R.J. Deficit in nitric oxide production in cirrhotic rat livers is located in the sinusoidal and postsinusoidal areas // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*— 2003.— 284.— P. G567—G574.
28. Marek A., Brodzicki J., Liberek A., Korzon M. TGF $\beta$ 1 (transforming growth factor-beta) in chronic inflammatory conditions — a new diagnostic and prognostic marker? // *Med. Sci. Monit.*— 2002.— 8.— P. RA145-RA151.
29. Marletta M.A., Hurshman A.R., Rusche K.M. Catalysis by nitric oxide synthase // *Curr. Opin. Chem. Biol.*— 1998.— 2.— P. 656—663.
30. Marshall R.P., McNulty R.J., Laurent G.J. Angiotensin II is mitogenic for human lung fibroblasts via activation of the type 1 receptor // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*— 2000.— 161.— P. 1999—2004.
31. Meininger C.J., Marinos R.S., Hatakeyama K. et al. Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency // *Biochem. J.*— 2000.— 349.— P. 353—356.
32. Milani S., Schuppan D., Herbst H., Surrenti C. Expression of transforming growth factor- $\beta$  in normal and fibrotic human liver. Molecular and Cell Biology of Liver Fibrogenesis: Proceedings of the International Falk Symposium / Ed. by A.M.R.G. Gressner.— Germany: Kluwer Academic Publishers, 1992.— P. 254—261.
33. Milani S., Herbst H., Schuppan D., Grappone C., Heinrichs O.E. Cellular sources of extracellular matrix proteins in normal and fibrotic liver. Studies of gene expression by in situ hybridization // *J. Hepatol.*— 1995.— 22 (suppl. 2).— P. 71—76.
34. Mittal M.K., Gupta T.K., Lee F.Y., Sieber C.C., Groszmann R.J. Nitric oxide modulates hepatic vascular tone in normal rat liver // *Am. J. Physiol.*— 1994.— 267.— P. G416-G422.
35. Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine // *J. R. Soc. Med.*— 1999.— 92.— P. 164—169.
36. Moussa Y.I., Plevis J.N., Hayes P.C. Plasma nitrites ? nitrates in HCV infection and hepatocellular carcinoma // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*— 2000.— 12.— P. 159—163.
37. Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor // *Nature.*— 1987.— 327.— P. 524—526.
38. Petermann H., Vogl S., Schulze E., Dargel R. Chronic liver injury alters basal and stimulated nitric oxide production and  $^3$ H-thymidine incorporation in cultured sinusoidal endothelial cells from rats // *J. Hepatol.*— 1999.— 31.— P. 284—292.
39. Schmidt K., Werner E.R., Mayer B., Wachter H., Kukovetz W.R. Tetrahydrobiopterin-dependent formation of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) in aortic endothelial cells // *Biochem. J.*— 1992.— 281.— P. 297—300.
40. Shah V., Toruner M., Haddad F. et al. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat // *Gastroenterology.*— 1999.— 117.— P. 1222—1228.
41. Tipoe G.L., Leung T.M., Liong E. et al. Inhibitors of inducible nitric oxide (NO) synthase are more effective than an NO donor in reducing carbon-tetrachloride induced acute liver injury // *Histol. Histopathol.*— 2006.— 21.— P. 1157—1165.
42. Vallance P., Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? // *Lancet.*— 1991.— 337.— P. 776—778.
43. Wei C.L., Khoo H.E., Lee K.H., Hon W.M. Differential expression and localization of nitric oxide synthases in cirrhotic livers of bile duct-ligated rats // *Nitric Oxide.*— 2002.— 7.— P. 91—102.
44. Yoshiji H., Kuriyama S., Noguchi R. et al. Angiotensin II and vascular endothelial growth factor interaction plays an important role in rat liver fibrosis development // *Hepatol. Res.*— 2006.— 36, 124—129.

Tung-Ming Leung, George L. Tjoo, Emily C. Liong,  
Thomas Y.H. Lau, Man-Lung Fung, Amin A. Nanji

## Ендотеліальна синтаза оксиду азоту як важливий чинник при експериментальному фіброзі печінки

Зниження експресії ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS) при хронічних захворюваннях печінки може зменшити печінковий кровотік і пришвидшити фіброз. Зв'язок між експресією eNOS і фіброгенезом у печінці залишається нез'ясованим. Ми вивчали, чи зменшує L-аргінін хронічний фіброз печінки шляхом експресії eNOS. Хронічне пошкодження печінки було спричинене введенням тетраклориду вуглецю (CCl<sub>4</sub>) мишам упродовж 8 тиж. Гемісульфат 5-метилізотіосечовини (SMT) як інгібітор індукбельної NOS (iNOS), або L-аргінін, субстрат NOS, вводили підшкірно. CCl<sub>4</sub> спричиняв гепатотоксичність, оксидативний стрес і відкладення колагену в печінці. Експресія рівня iNOS і активність ядерного фактора каппа-В (NF-κB) у печінці після застосування CCl<sub>4</sub> підвищувалися, а експресія eNOS і активність активаторного протеїну-1 (AP-1) знижувалися. Як SMT, так і L-аргінін ефективно зменшували спричинений CCl<sub>4</sub> оксидативний стрес та утворення колагену, однак L-аргінін значно краще пригнічував формування колагену, експресію iNOS та активність NF-κB. L-аргінін також відновлював рівень eNOS і активність AP-1. Він ефективніше за SMT пригнічував печінковий фіброз. L-аргінін може активізувати синтез NO, який поліпшує печінковий кровотік, таким чином, уповільнюючи фіброгенез. Результати наших досліджень свідчать, що зниження експресії eNOS у мишей, які отримували CCl<sub>4</sub>, мало зворотний характер завдяки L-аргініну. Більше того, L-аргінін також робив зворотним зниження активності AP-1 — промотора eNOS.

Tung-Ming Leung, George L. Tjoo, Emily C. Liong,  
Thomas Y.H. Lau, Man-Lung Fung, Amin A. Nanji

## Endothelial nitric oxide synthase is a critical factor in experimental liver fibrosis

Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in chronic liver disease can reduce hepatic perfusion and accelerate fibrosis. The relationship between eNOS expression and liver fibrogenesis remains unclear. We investigated whether L-arginine attenuated chronic liver fibrosis through eNOS expression. Chronic liver injury was induced by administration of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) to mice for 8 weeks. 5-Methylisothiourrea hemisulphate (SMT), an iNOS inhibitor, or L-arginine, a NOS substrate were injected subcutaneously. CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity, oxidative stress and accumulation of collagen were detected in the liver. The expression levels of inducible NOS (iNOS) and nuclear factor kappa-B (NF-κB) activity in the liver after CCl<sub>4</sub> treatment were increased but eNOS expression and activator protein-1 (AP-1) activity were decreased. Both SMT and L-arginine effectively reduced CCl<sub>4</sub> induced oxidative stress and collagen formation, but L-arginine showed a significantly greater suppression of collagen formation, iNOS expression and NF-κB activity. L-Arginine also restored the level of eNOS and AP-1 activity. L-Arginine was more effective than SMT in suppressing liver fibrosis. L-Arginine might improve NO production which facilitates hepatic blood flow and thus retards liver fibrogenesis. Our results showed that the reduced eNOS expression in CCl<sub>4</sub>-treated mice was reversed by L-arginine. Furthermore, L-arginine also reversed the reduced AP-1 activity, an eNOS promoter.

---

### Контактна інформація

Amin A. Nanji  
Room 616, 6/F, MacKenzie Building  
5788 University Avenue  
Halifax, Nova Scotia, Canada B3H 1V8  
Tel. 1 902 473 6867  
E-mail: amin.nanji@dal.ca

Стаття предоставлена Представительством Евромедекс Франс