Д. В. Мамчур,
В .І. Десятерик, В. І. Жилюк,
А. Е. Лєвих, А. В. Абрамов

Дніпропетровська медична академія

Запорізький державний медичний університет

© Колектив авторів

ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ L-ЛІЗИНУ ЕСЦИНАТУ ТА ГЛУТАРГІНУ НА СИСТЕМУ ОКСИДУ АЗОТУ ТА МОРФОМЕТРИЧНУ ХАРАКТЕРИСТИКУ ЕНДОТЕЛІОЦИТІВ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ З МЕХАНІЧНОЮ ЖОВТЯНИЦЕЮ

Резюме. Нами було проведено дві серії досліджень на 120 білих нелінійних щурах обох статей масою 180-220 г. Курсове використання L-лізину есцинату у більшій мірі ніж глутаргіну, сприяє відновленню активності синтази оксиду азоту та знижує надмірну секрецію оксиду азоту в тканинах печінки за умов механічної жовтяниці. L-лізину есцинат, у порівнянні з глутаргіном, проявляє більш вагомі та статистично значимі зміни у відношенні показників щільності ядер ендотеліоцитів, вмісту у них РНК, а також сприяє зменшенню проявів набряку цих клітин за умов механічної жовтяниці.

Ключові слова: *L-лізину есцинат, глутаргін, оксид азоту, механічна жовтяниця.*

Вступ

Відомо, що оксид азоту (NO) відіграє роль медіатора міжклітинної взаємодії, завдяки чому приймає участь у регуляції численних функцій організму і в тому числі в печінці [1, 8].

Механічна жовтяниця в залежності від тривалості та вираження симптомнатики наряду з розвитком печінкової недостатності призводить до інтоксикації, яка поєднується з гемодинамічними та гемореологічними розладами [3]. Оксид азоту, що утворюється під дією ендотеліальної ізоформи NOS в основному виявляє захисні функції у печінці, шляхом регуляції току крові та міжклітинного зв'язку [1]. Водночас, згідно експериментальних даних відомо, що у патогенезі захворювань печінки важливе значення має зниження експресії ендотеліальної NO-синтази та зростання активності її індуцибельної форми [5].

Таким чином, згідно представлених даних ендотелій та нітратергічна система регуляції можуть бути стратегічно важливими ланками в патогенезі розладів функції печінки при механічні жовтяниці, а також ключовими мішенями в плані попередження ускладнень і терапевтичними мішенями при лікуванні та профілактиці ускладнень.

Мета досліджень

Встановити особливості обміну оксиду азоту та морфологічні зміни в судинному руслі печінки щурів з механічною жовтяницею за умов курсового введення L-лізину есцинату та глутаргіну.

Матеріали та методи досліджень

Для виконання поставлених задач було проведено дві серії досліджень на 120 білих нелінійних щурах обох статей масою 180-220 г. Тварини утримувалися згідно вимог на стандартному раціоні віварію ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро та отримували їжу та пиття *ad libitum*.

Підпечінковий холестаз здійснювали за допомогою повної незворотньої одномоментної оклюзії d.choledochus за умов кетамін-ксилазинового (50/10 мг/кг) загального знеболювання [12]. Проведення хірургічного втручання здійснювали після попередньої 24-годинної депривації їжі, при збереженому доступі до води. Тваринам пасивного контролю (псевдооперовані) виконували лапаротомію без подальшої перев'язки d.choledochus.

З метою вивчення активності процесів обміну оксиду азоту в печінці по мірі прогресування жовтяниці та встановлення впливу досліджуваних лікарських засобів на перебіг цих процесів, з першої доби після оперативного втручання, щурам першої групи (n=30), 1 раз на добу, внутрішньоочеревинно, вводили L-лізину есцинат у дозах, загальноприйнятих для доклінічних досліджень: 0,5 мг/кг («L-лізину есцинат®», АТ «Галичфарм», Україна). Щурам другої групи (n=30) також 1 раз на добу, відповідним шляхом, вводили глутаргін у дозі 40 мг/кг («Глутаргін», «Здоров'я», Україна). Тваринам активного (оперовані, без фармакологічної корекції, n=30) та пасивного (псевдооперовані, n=30) контролів, внутрішньоочеревинно вводили фізіологічний розчин в об'ємі 5 мл/кг.

На 4-ту та 10-ту добу після моделювання механічної жовтяниці тварин усіх груп виводили з експерименту шляхом декапітації. Після проведення декапітації проводили забір крові для отримання плазми та тканин печінки, які

впродовж 24 годин фіксували в 10 % рідині Буена, та за стандартною схемою поміщалися в парафінові блоки з яких готували 5-мікронні гістологічні зрізи.

Вміст оксиду азоту оцінювали за сумарним рівнем нітритів та нітратів (NO_x) у плазмі крові, які визначали попередньо проводячи конверсію нітратів у нітрити та наступним визначенням нітритів за допомогою реакції Гриса спектрофотометричним методом [9]. Загальну активність NOсинтази (NOS) визначали спектрофотометричним методом у НАДФзалежній реакції перетворення Lаргініну [6].

Для вивчення морфо-функціонального стану ендотеліоцитів печінки гістологічні зрізи депарафінували та фарбували галоціанін-хромовими квасцями за Ейнарсоном для специфічного виявлення РНК. Зображення отримували на мікроскопі Axioskop (Zeiss, Німеччина) та за допомогою 8-бітної CCD-камери COHU-4922 (COHU Inc., США) вводили в комп'ютерну систему аналізу зображень VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина). Морфометричний аналіз клітин здійснювали в автоматичному режимі. Визначали наступні показники для ендотеліальних клітин судин:

- площа ядра;
- діаметр ядра;
- концентрацію РНК в ядрі (одиниці оптичної щільності, $E_{ОШ}$);
- щільність ядер ендотеліоцитів (кількість клітин на 1мм^2 площі зрізу).

Усі експериментальні дослідження та клінічні спостереження здійснювали відповідно до вимог Європейської конвенції із захисту лабораторних тварин (м. Страсбург) [11] та рекомендації робочої групи Федерації Європейського товариства по науці про лабораторних тварин [2].

Цифрові експериментальні дані обраховували методом варіаційної статистики за допомогою програми статистичного аналізу AnalystSoft, StatPlus, версія 2006 року. Достовірність отриманих даних оцінювали за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента, а у випадку неправильного розподілу – непараметричного U-критерію Манна-Уітні. Відмінності вважалися статистично значимими при $p<0,05$. Перед використанням параметричного t-критерію Стьюдента проводили перевірку гіпотези закону нормального розподілу випадкових величин з використанням критерію Шапіро-Уілка.

Результати досліджень та їх обговорення

Проведеними нами дослідженнями встановлено, що перебіг механічної жовтяниці призводив до суттєвого зростання в гомогенатах печінки загальної активності NO-синтази на 4 та 10 добу дослідження на 166,3 % ($p<0,05$) та 183,3 % ($p<0,05$) відповідно. Характерно, що за умов зростання функціонування цього ферменту, спостерігалося і підвищення у 3,44 ($p<0,05$) та 5,34 ($p<0,05$) системної продукції оксиду азоту (табл. 1). Водночас, перебіг вказаної патології призводив до зменшення на 38,7 % ($p < 0,001$) щільності ядер ендотеліоцитів та значимого збільшення на 16,3 % ($p < 0,001$) та 7,7 % ($p < 0,001$) їхньої площі і діаметру, яке поєднувалося із зниженням на 26,7 % ($p < 0,001$) вмісту РНК (табл. 2).

Результатами наших досліджень встановлено, що повторне, протягом 10 діб, використання L-лізину есцинату призводило до зниження загальної активності NOS на 50,5 % ($p<0,05$, 4 доба) та 31,3 % ($p<0,05$, 10 доба) при істотному зменшенні вмісту нітратів на 42,4 % ($p<0,05$) і 65,6 % ($p<0,05$) у відповідні проміжки експерименту (табл. 1).

Подібний характер змін спостерігався і при використанні глутаргіну. Однак виразність змін, при курсовому введенні цього засобу була дещо меншою у порівнянні з L-лізину есцинатом. Так, статистично значиме зниження рівнів NO_x за умов введення глутаргіну відмічалося лише на 10 добу, коли значення цього показника були на 35,5 % ($p<0,05$) нижчими даних групи активного контролю. При цьому, активність NOS за даних умов знижувалася на 32,4 % ($p<0,05$, 4 доба) та 22,6 % ($p<0,05$, 10 доба) (табл. 1).

Слід зазначити, що гісто-морфологічні зміни судинного компоненту (капіллярної мережі) печінки, що проявлялися у тварин підчас експериментальної терапії також певною мірою залежали від впливу конкретного досліджуваного засобу (табл. 2). Так, повторне, протягом 10 діб, застосування лікарського засобу «L-лізину есцинат» характеризувалося відновленням проліферативної активності ендотелію капілярів печінки і, відповідно, активацією процесів реваскуляризації в даному органі. Вказаний препарат сприяв збільшенню на 24,2 % ($p < 0,001$) показника щільності ядер та на 50 % ($p < 0,001$) рівня вмісту РНК. Водночас, спостерігалося і значиме зменшення на 3,8 % ($p < 0,05$) та 4,1 % ($p < 0,01$) площі та діаметру ядер цих клітин. Характерно, що L-лізину есцинат у порівнянні з глутаргіном проявляв більш вагомі зміни у відношенні показників щільності ядер та вмісту у них РНК, а також сприяв зменшенню їх набряку.

Водночас, у групі тварин, яким протягом 10 діб вводили глутаргін зростання щільності ядер ендотеліоцитів відмічалося на рівні 14,6 % ($p < 0,001$), а вмісту РНК на 22,3 % ($p < 0,001$),

Таблиця 1

Вплив препаратів на активність NO-синтази та вміст нітритів у печінці тварин за умов експериментального еквіваленту механічної жовтяниці

Показник		Інтактні щури	Механічна жовтяниця (контроль)	L-лізину есцинат	Глутаргін
NO_2^-, мкмоль/г білка	4-а доба	6,3±0,74*	21,7±3,53	12,5±1,21*	18,6±0,72
	10-а доба	6,8±0,32*	36,3±2,10	12,5±1,44*	23,4±0,33*
NO-синтаза, нмоль/мг/хв	4-а доба	10,4±0,43*	28,7±2,61	14,2±1,27*	19,4±1,51*
	10-а доба	11,4±0,22*	32,3±3,83	22,2±1,20*	25,0±1,42*

Примітки: * $p < 0,05$ - по відношенню до показників, зафіксованих у групі тварин з механічною жовтяницею; n=12 у кожній крупі в відповідний проміжок часу

Таблиця 2

Вплив L-лізину есцинату і глутаргіну на морфофункціональні показники ендотеліоцитів печінки щурів з експериментальною механічною жовтяницею на 10 добу дослідження

Группа тварин	Щільність ядер клітин, клітин/мм²	Площа ядер ендотеліоцитів, мкм²	Діаметр ядер, мкм	РНК, $E_{оп}$
Інтактні (n=10)	15932,8 ± 47,23***	6,99 ± 0,035***	2,97 ± 0,025***	0,30 ± 0,007***
Механічна жовтяниця (контроль) (n=10)	9763,5 ± 51,15	8,13 ± 0,044	3,20 ± 0,017	0,22 ± 0,006
Глутаргін (n = 10)	11194,5 ± 37,88***	8,00 ± 0,038	3,04 ± 0,038**	0,28 ± 0,006***
L-лізину есцинат (n = 10)	12125,6 ± 47,16***#	7,98 ± 0,058*	3,07 ± 0,026**	0,33 ± 0,005***#

Примітки: * $p < 0,05$ по відношенню до групи контролю; ** $p < 0,01$ по відношенню до групи контролю; *** - $p < 0,01$ по відношенню до групи контролю; # - $p < 0,05$ по відношенню до групи тварин, що отримували глутаргін

у порівнянні з групою тварин активного контролю. Також спостерігалося і зменшення на 5 % ($p < 0,01$) діаметру ядер. При чому, площа ядер цих клітин суттєво не змінювалася (табл. 2).

Отже, отримані результати свідчать про те, що механічна жовтяниця призводить до зростання активності синтази оксиду азоту та підвищення продукції NO у тканинах печінки. При чому, перебіг механічно викликаного холестазу в щурів супроводжується і характерними морфо-функціональними змінами капілярного русла цього органу, які можуть лежати в основі порушень локального кровообігу внаслідок ураження ендотелію. При цьому, застосування L-лізину есцинату та глутаргіну сприяє зниженню вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту та активності NOS у тканинах печінки, як на 4, так і на 10 добу дослідження. Причому найбільшою мірою, ці ефекти характерні для L-лізину есцинату. Глутаргін та L-лізину есцинат проявляють виразні ендотеліопротекторні ефекти, що проявляються у вигляді зростання щільності ядер ендотеліальних клітин, зменшення їх набряку, та активації біосинтезу РНК. При чому, у більшій мірі ці зміни спостерігаються за умов використання L-лізину есцинату.

Можна припустити, що холестаз, шляхом активації вивільнення цитокінів призводить до активації індуцибельної форми синтази оксиду азоту та підвищення синтезу NO. У свою чергу гіперпродукція оксиду азоту за умов інтенсифікації процесів вільнорадикального окиснення призводить до утворення високоактивної сполуки — пероксинітриту ($ONOO^-$). Пероксинітрит володіє набагато більшою реакційною активністю, ніж оксид азоту чи супероксид аніон. Він приймає участь у багатьох біологічних реакціях, зокрема в нітруванні остатків тирозину в білках, ініціюванні ПОЛ, інактивації аконітаз, пригніченні транспорту електронів у мітохондріях та в окисленні біологічних тіолів [15]. Пероксинітрит є сильним ДНК-руйнуючим агентом, який ініціює процеси апоптозу [13]. У свою чергу пероксинітрит може метаболізуватися з утворенням гідроксильного радикала, який здатний викликати деструкцію практично всіх компонентів клітини [5]. Цілком ймовірно, що оптимізація обміну оксиду азоту у печінці за умов холестазу опосередкована здатністю препаратів значною мірою сприяти відновленню активності системи антиоксидантного захисту, особливо її глутатіонзалежної ланки [4]. Адже відомо, що глутатіон, завдяки конкурентному зв'язуванню з оксидом азоту, утворює комплекс у вигляді S-нітрозоглутатіону, який формує депо ендогенного NO (в подальшому вивільнення NO каталізується тіоредоксиновою системою). Завдяки цьому підвищується біодоступність цієї важливої регуляторної молекули, а також попереджується зв'язування її з супероксид аніоном та утворення пероксинітриту [14]. Однак, слід зазначити, що виразна ендотеліотропна активність L-лізину есцинату за умов холестазу може бути опосередкована уже доведеними як клінічно, так і експериментально, значними протинабряковими, капіляростабілізуючими і протизапальними властивостями есцину [10]. Враховуючи те, що перебіг механіч-

ної жовтяниці, супроводжується холестазом, істотними гемодинаміними порушеннями та суттєвим набряком тканин печінки, використання L-лізину есцинату в клінічній практиці є доречним.

Висновки

Курсове використання L-лізину есцинату у більшій мірі ніж глутаргіну, сприяє відновленню активності синтази оксиду азоту та знижує надмірну секрецію оксиду азоту в тканинах печінки за умов механічної жовтяниці.

L-лізину есцинат, у порівнянні з глутаргіном, проявляє більш вагомі та статистично значимі зміни у відношенні показників щільності ядер ендотеліоцитів, вмісту у них РНК, а також сприяє зменшенню проявів набряку цих клітин за умов механічної жовтяниці.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бабак О. Я. Механизмы гепатопротекторного и токсического влияния азота оксида / О. Я. Бабак, Н. В. Ярмыш, Г. Ю. Панченко // Сучасна гастроентерологія. — 2006. — № 5(31). – С. 76-84.
2. Копаладзе Р. А. Методы эвтаназии экспериментальных животных – этика, эстетика, безопасность персонала / Р. А. Копаладзе // Успехи физиологических наук. – 2000. – Т. 31, № 3. – С. 79-90.
3. Майоров М. М. Механическая желтуха калькулезной этиологии: патогенез, осложнения и лечебная тактика / М. М. Майоров, И. Г. Дряженков // Клиническая медицина // 2012. — № 5. – С. 12-16.
4. Мамчур Д. В. Состояние тиол-дисульфидного равновесия в ткани печени крыс с механической желтухой в условиях терапии L-лизина эсцинатом и глутаргином / Д. В. Мамчур, Н. В. Бухтиярова // Запорожский медицинский журнал. — 2011. — Т. 13, № 5. — С. 36-39.
5. Олещук А. М. Показатели системы оксида азота и морфофункционального состояния печени при экспериментальном циррозе [Електронний ресурс] / А. М. Олещук, А. З. Миколенко, С. В. Трач-Росоловская // Медицина и образование в Сибири. – 2013. - №2. – Режим доступа к журн.: http://cyberleninka.ru/article/n/pokazateli-sistemy-oksida-azota-i-morfofunktsionalnogo-sostoyaniya-pecheni-pri-eksperimentalnom-tsirroze.
6. Патент №13132 (Україна). МПК JOIN 33/48. – (UA). - №200509119 / Колесник Ю.М., Беленічев І.Ф., Абрамов А.В., Павлов С.В. / Спосіб визначення активності NO-синтази в гомогенатах тканин. – Заявл. 27.09.2005.
7. Пизова Н. В. Опыт применения L-лизина эсцинат в клинической практике / Н. В. Пизова // Медицинский алфавит. Неврология и психиатрия. – 2015. – Т. 1, № 12. – С. 6-10.
8. Салей А. П. Роль оксида азота в регуляции гемодинамических показателей и метаболических функций печени / А. П. Салей, Г. А. Вашанов, М. Ю. Мещерякова // Еестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2009. — № 2. – С. 129-135.
9. Фотометрический метод определения нитратов и нитритов в биологических жидкостях (инструкция по применению) / А. П. Солодков, И. С. Веремей, С. С. Осорчук [и др.] // Витебский государственный медицинский университет. – 2001. – 9 с.
10. Чеснокова Н. П. Молекулярно-клеточные механизмы цитотоксического действия гипоксии. Патогенез гипоксического некробиоза / Н. П. Чеснокова, Е. В. Понукалина, М. Н. Бизенкова // Современные наукоемкие технологии. – 2006. — №7. — С. 31–38.
11. Commission of the European Communities: Council Directive of 18 December 1986 on the Lows, regulating the Application of Principles of Good Laboratory Practice and the Verification of Their Applications for Tests on Chemical Substances (87/18/EEC). The Rules Governing Medicinal Products in the European Community. – 1991. – Vol. 1. – P. 145-146.
12. Comparative study of macro- and microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat / M. A. Aller, M. Duran, L. Ortega, J. L Arias // Microsurgery. 2004. – Vol. 24, N 6. – P. 442–447.
13. Deficiency in Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Accelerates Aging and Spontaneous Carcinogenesis in Mice [Електронний ресурс] / T.S. Piskunova, M. N. Yurova, A.I. Ovsyannikov [et al.] // Curr. Gerontol. Geriatr. Res. – 2008. – Vol. 2008. – Режим доступа к журн.: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ pmc/articles/PMC2672038/pdf/CGGR2008-754190.pdf.
14. Dringen R. Glutathione pathways in the brain / R. Dringen, J. Hirrlinger // Biol. Chem. – 2003. – Vol. 384, №4. – P. 505–516.
15. Enzymatic and nonenzymatic synthesis of glutathione conjugates: Application to the understanding of a parasite's defense system and alternative to the discovery of potent glutathione Stransferase inhibitors / W. J. Lo, Y. C. Chiou, Y. T. Hsu [et al.] // Bioconjug. Chem. — 2007. – Vol. 18, № 1. - P 109–120.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ L-ЛИЗИНА ЭСЦИНАТА И ГЛУТАРГИНА НА СИСТЕМУ ОКСИДА АЗОТА И МОРФОМЕТРИЧЕСКУЮ ХАРАКТЕРИСТИКУ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ ПЕЧЕНИ КРЫС С МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХОЙ

Д. В. Мамчур,
В. И. Десятерик,
В. И. Жилюк, А. Е. Левих,
А. В. Абрамов

Резюме. Нами было проведено две серии исследований на 120 белых нелинейных крысах обоего пола массой 180-220 г. Курсовое использование L-лизина эсцината в большей степени, чем глутаргина, способствует восстановлению активности синтазы оксида азота и снижает чрезмерную секрецию оксида азота в тканях печени в условиях механической желтухи. L-лизина эсцинат, по сравнению с глутаргином, проявляет в более весомые и статистически значимые изменения в отношении показателей плотности ядер эндотелиоцитов, содержания в них РНК, а также способствует уменьшению проявлений отека этих клеток в условиях механической желтухи.

Ключевые слова: *L-лизина эсцинат, глутаргин, оксид азота, механическая желтуха.*

DETERMINATION OF THE EFFECT OF L-LYSINE ESCINATE AND GLUTARGIN ON THE NITRIC OXIDE SYSTEM AND MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF RAT LIVER ENDOTHELIOCYTES WITH MECHANICAL JAUNDICE

D. V. Mamchur,
V. I. Desyaterik, V. I. Zhilyuk,
A. E. Levih, A. V. Abramov

Summary. We conducted two series of studies on 120 white nonlinear rats of both sexes weighing 180-220 g. The course use of L-lysine escinate more than glutargin promotes the restoration of activity of nitric oxide synthase and reduces the excessive secretion of nitric oxide in liver tissues in conditions of mechanical Jaundice. L-lysine escinate, in comparison with glutargin, manifests itself in more significant and statistically significant changes in the density of endothelial cells, the content of RNA in them, and also reduces the manifestation of the edema of these cells in conditions of mechanical jaundice.

Key words: *L-lysine escinate, glutargin, nitric oxide, mechanical jaundice.*