

© Олещук О. М.

УДК 616.36-004.001.4-032:615.31

Олещук О. М.

СТАН СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦИРОЗІ ПЕЧІНКИ

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського
МОЗ України» (м. Тернопіль)

Робота є фрагментом комплексної науково-дослідної теми кафедри фармакології з клінічною фармакологією ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України» «Вплив попередників та інгібіторів синтезу оксиду азоту на перебіг метаболічних процесів при патологічних станах різного генезу», № держ. реєстрації 0107U004456.

Вступ. У загальносвітовій структурі смертності цироз печінки, за даними ВООЗ, займає шосте місце, в Україні – п'яте. На диспансерному обліку зараз в нашій державі є понад 40 тисяч хворих з цирозом печінки (128 на 100 тис. населення) [1]. Прогностично-несприятливий перебіг захворювання, поряд із складним патогенезом його проявів, зумовлює пошук дієвих засобів його фармакокорекції.

Структурна перебудова органу та гіпоксія при цирозі печінки ведуть до порушення внутрішньопечінкової гемодинаміки [4, 6]. Портальна гіпертензія поступово призводить і до системних змін гемодинаміки, до яких належать підвищення частоти серцевих скорочень і серцевого індексу, а також зменшення системного судинного опору.

Відомо, що у патогенезі цирозу печінки, а саме, порушень системної гемодинаміки та розвитку метаболічних порушень при даній патології, провідну роль відіграє оксид азоту (NO). Вченими Valance і Moncada (1991) було висунуто гіпотезу про те, що гіперпродукція NO при цирозі печінки пов'язана зі зростанням ендотоксемії, яка через систему цитокінів стимулює синтез оксиду азоту [14]. Результати інших дослідників засвідчили, що в умовах цирозу виникає зниження біодоступності NO та наростання явищ органної вазоконстрикції, що веде до розвитку портальної гіпертензії при даній патології [3, 9].

Мета дослідження. Враховуючи вищезазначене, з метою вивчення ролі цієї високореакційноздатної молекули в патогенезі циротичного ураження печінки нами було проведено дослідження показників стану системи оксиду азоту при експериментальному цирозі, викликаному тривалим введенням тетрахлоретану.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проведено на 24 білих щурах-самцях масою 170–210 г, яких було рандомізовано на 2 групи: контрольну та з ураженням (цирроз). Тварини перебували у виварії з контрольованим температурним режимом, на стандартному раціоні з вільним доступом до їжі

та води і 12-годинним циклом день-ніч. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Цироз печінки моделювали за методикою, описаною Kurabe S. та співав. [12]. 50% розчин тетрахлорметану вводили перорально двічі на тиждень протягом 3-х місяців з розрахунку 2 мл на кг маси тварини. Оскільки нітрит-аніон та нітрат-аніон є стабільними метаболітами оксиду азоту, за їх кількістю можна робити висновок утворення оксиду азоту у тканинах організму [5]. Вміст нітрит-аніонів у сироватці крові, гомогенатах печінки та нирок визначали високоспецифічним спектрофотометричним методом Гріна за даними кольорової реакції з реактивом Гріса [7]. Відновлення нітратів до нітритів здійснювали металічним цинком в оцтовокислому розчині. Іони NO_2^- виявляли діазореакцією з реактивом Гріса, з наступним колориметричним визначенням [2]. Визначення експресії в сироватці крові та печінці eNOS та iNOS проводили методом імуноферментного аналізу, використовуючи стандартні набори реактивів адаптовані для щурів «Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Rat Nitric Oxide Synthase 3, Endothelial (NOS3)», Usnc, Life Science Inc, E90868Ra та «Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Rat Nitric Oxide Synthase 2, Inducible (NOS2)», Usnc, Life Science Inc, E90837Ra. Визначення концентрації прозапальних цитокінів у сироватці крові TNF- α , проводили методом імуноферментного аналізу, використовуючи стандартні набори реактивів адаптовані для тварин «Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-a)», Usnc, Life Science Inc, E90133Ra, «Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Rat Interleukin 1 Beta (IL-1 β)», Usnc, Life Science Inc, E90563Ra, «Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Rat Interleukin 6 (IL-6)», Usnc, Life Science Inc, E90079Ra.

Для гістологічного дослідження кусочки печінки фіксували в 10% нейтральному розчині формаліну та фіксаторі Ліллі, з наступною заливкою в парафін. Отримані на санному мікротомі зрізи фарбували гематоксиліном та еозинном.

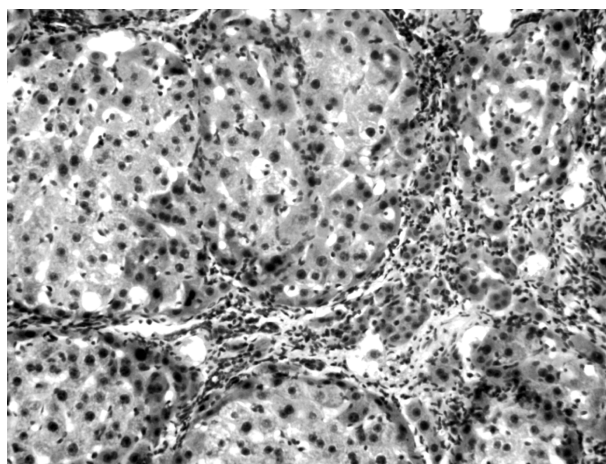


Рис. 1. Гістологічна структура печінкової часточки при сформованому цирозі печінки. Поля перипортального склерозу та формування псевдочасточок. Забарвлення гематоксилином та еозином. Ч160.

Для розрахунків використовували комп'ютерну програму Microsoft Excel XP (USA). Всі отримані результати були оброблені методом варіаційної статистики з використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з допомогою програми Originpro 7.5. Зміни вважали достовірними при $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Світлооптичне вивчення мікропрепаратів печінки піддослідних тварин підтвердило формування цирозу у тварин, яким моделювали, впродовж трьох місяців вводили тетрахлорметан.

При гістологічному дослідженні тканини печінки (рис. 1) виявлено, що структура печінкової часточки була порушеною. Трабекули гепатоцитів були деформованими, синусоїдальні простори в одних ділянках – розширені, в інших – відсутні.

Портальні тракти розширені за рахунок вираженого склерозу та лімфо-гістоцитарної інфільтрації. В яких, у вигляді невеликих вогнищ, спостерігались скопчення гепатоцитів різної форми із вираженими різноформними ядрами, що можна розцінити як ділянки компенсаторної регенерації у вигляді псевдо часточок. Стінки судин склерозовані та гіалінізовані.

Гепатоцити печінкових часточок були різні за формою, окремі із них не містили ядер, в інших – ядра були із різко вираженими явищами апоптозу. Поряд візуалізувалися клітини печінки із явищами компенсаторної гіпертрофії. Центролобулярно спостерігалася помірна білкова та пілєвидна жирова дистрофія. Вищенаведене свідчить про формування у піддослідних тварин цирозу печінки.

Встановлено, що на фоні сформованого циротичного ураження відмічається зменшення вмісту стабільного метаболіту оксиду азоту нітрит аніону в печінці (на 24,9%) та його наростання (в 3 рази) у сироватці крові. Рівень NO_3^- у крові зростав на 23,5%, а у печінці не змінювався відносно контролю (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст нітрит- та нітрат-аніону при цирозі печінки ($M \pm m$)

Серія досліджу	Показник			
	кров		печінка	
	NO_2^- , мкмоль/л	NO_3^- , мкмоль/л	NO_2^- , мкмоль/кг	NO_3^- , мкмоль/кг
Контр-оль	1,23 ± 0,06	10,02 ± 0,11	2,20 ± 0,15	8,75 ± 0,26
Цироз	3,68 ± 0,13 $p < 0,001$	12,38 ± 0,23 $p < 0,001$	1,65 ± 0,07 $p < 0,05$	8,18 ± 0,10 $p > 0,05$

Примітка: p – вірогідність відмінностей у порівнянні з контролем.

Імуноферментним методом встановлено, що у вміст ендотеліальної форми NO-синтази у печінці та крові знижувався на 38,8 та 58,6%, індукційної ферми ферменту NOS зростав у 2,5 та 4,1 рази відповідно (табл. 2).

Таблиця 2

Вміст eNOS та iNOS при цирозі печінки ($M \pm m$)

Серія досліджу	сироватка крові		печінка	
	eNOS од. /мл	iNOS нг/мл	eNOS од. /мл (1 мл – $1 \cdot 10^6$ клітин)	iNOS нг/мл (1 мл – $1 \cdot 10^6$ клітин)
Контроль	2,24 ± 0,14	15,73 ± 0,79	7,95 ± 0,60	2,35 ± 0,28
Цироз	0,93 ± 0,10 $p < 0,001$	64,47 ± 5,10 $p < 0,001$	4,87 ± 0,24 $p < 0,001$	5,76 ± 0,20 $p < 0,001$

Примітка: p – вірогідність відмінностей у порівнянні з контролем.

Активация iNOS може бути спричинена зростанням продукції прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-6 та TNF- α , рівень яких при цирозі перевищував контрольні показники в 4,0; 4,1 та 5,8 рази (рис. 2).

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших науковців. Як уже зазначалося, у печінці NO утворюється під дією двох ізоформ – eNOS і iNOS. Картина експресії та активності білків NOS в здоровому органі і при патології різна [10]. При хронічних захворюваннях печінки спостерігається значне підвищення активності індукційної ізоформи NOS в зонах цирозу [9]. Отож, високий рівень нітратів і нітритів у сироватці крові у хворих з цирозом печінки та при експериментальних моделях імовірно зумовлений підвищеною концентрацією iNOS-залежного NO. З іншого боку, Rockey D. C. і Chung J. J. [13] виявили зниження активності конститутивної NOS у щурів з тетрахлорметановим цирозом на 75,0%, що підтверджується результатами, представленими у даній роботі. При цьому відбуваються глибокі зміни в клітинному розподілі eNOS, що призводить до її транслокації в ядра гепатоцитів [8]. Можна припустити, що внаслідок цього у внутрішньопечінковій мікроциркуляції виникає парадоксальна ситуація:

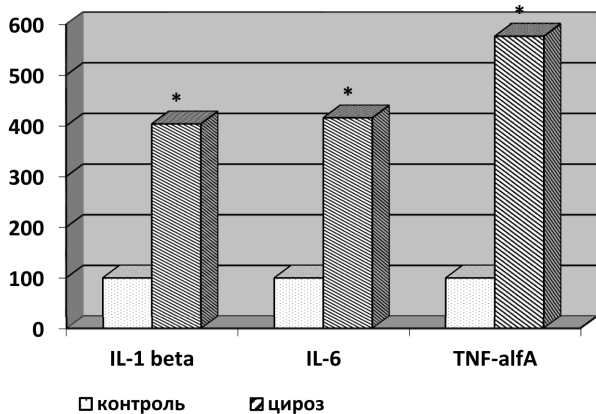


Рис. 2. Зміни рівня прозапальних цитокінів при цирозі печінки

Примітка: * – вірогідність відмінності у порівнянні з контролем.

у крові, що притікає міститься величезна кількість NO, в той же час різко збільшений портальний приплив створює додатковий тиск на стінку синусоїдів, що вимагає подальшої активації eNOS і вироблення оксиду азоту в ендотелії синусоїдів. Однак цього не відбувається. Найімовірніше, підвищена концентрація NO в крові, що притікає, за механізмом зворотного зв'язку різко інгібує експресію eNOS. Розвивається дефіцит вазодилатації, індукованої eNOS, що сприяє зменшенню діаметру синусоїдів і збільшенню загальної портальної судинної резистентності. Таким чином, незважаючи на гіперпродукцію оксиду азоту виникає відносна недостатність медіатора на рівні внутрішньопечінкової мікроциркуляції [15], про що свідчило зниження вмісту нітрит аніону у печінці, яке ми отримали в наших дослідженнях.

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших вчених. Зниження експресії eNOS в печінці при цирозі підтверджую результати імуногістохімічних досліджень А. І. Sarela et al., де показано суттєве зниження активності даної форми ферменту

у хворих з цирозом печінки, яким проводили трансплантацію органу [9]. Зростання рівня NO_2^- та NO_3^- у сироватці крові, яке ми отримали в наших дослідженнях зумовлене, на нашу думку, активацією iNOS, експресія якої у печінці зростала. При зменшенні вмісту субстрату, індукційна форма NO-синтази також може стати роз'єднаною і продукувати активні форми кисню та посилювати деструктивні процеси в печінці [11].

Таким чином, в патогенезі цирозу виникає відносна недостатність eNOS-індукованого NO в ураженому органі на фоні загальної гіперпродукції оксиду азоту, що активації iNOS.

Висновки.

1. Циротичне ураження печінки, яке морфологічно підтверджене наявністю вираженого склерозу перипортальних полів та формуванням псевдочасточок, супроводжується зниженням вмісту ендотеліальної та наростанням концентрації індукційної NO-синтази, збільшенням концентрації стабільних метаболітів оксиду азоту нітрит- та нітрат аніонів в крові та зменшенням NO_2^- у печінці. Активація показників системи оксиду азоту в сироватці крові супроводжується зростанням продукції прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-6 та TNF- α .

2. При цирозі виникає відносна недостатність eNOS-індукованого оксиду азоту в ураженому органі на фоні загальної iNOS-стимульованої гіперпродукції NO. Втягнення системи оксиду азоту в патогенез ураження печінки дає можливість припустити можливість модуляції активності NO-синтаз з метою попередження та усунення морфофункціональних проявів даної патології.

Перспективи подальших досліджень. Встановлення ролі системи оксиду азоту у патогенезі цирозу печінки обґрунтовує необхідність подальшого пошуку та вивчення модуляторів синтезу оксиду азоту як ефективних гепатопротекторних засобів.

Література

- Губская Е. Ю. Существует ли универсальный лекарственный препарат для лечения хронической патологии печени и гепатобилиарной системы? / Е. Ю. Губская // Ліки України. – 2012. – № 5(161). – С. 28–30.
- Кіселик І. О. Особливості визначення нітратів та нітритів у крові хворих на вірусні гепатити та жовтяниці іншої етіології / І. О. Кіселик, М. Д. Луцик, Л. Ю. Шевченко // Лаб. діагностика. – 2001. – № 3. – С. 43–45.
- Корекція ендотеліальної дисфункції у хворих на цироз печінки / В. І. Русин, Є. С. Сірчак, О. І. Петричко [та ін.] // Укр. журн. хірургії. – 2011. – № 2 (11). – С. 9–13.
- Морфометрия митохондриального аппарата гепатоцитов нормальной и цирротически измененной печени крыс / Н. Н. Безбородкина, С. В. Оковитый, М. В. Кудрявцева [и др.] / Цитология. – 2008. – Т. 50, № 3. – С. 228–236.
- Орлова Е. А. Анализ нитритов и нитратов в ткани при экспериментальной острой почечной недостаточности / Е. А. Орлова // Український журнал екстремальної медицини ім. Г. О. Можаяєва. – 2002. – Т. 3, № 1. – С. 79–82.
- Скрипник І. М. Алкогольна хвороба печінки: сучасний погляд / І. М. Скрипник // Внутрішня медицина. – 2007. – № 3(3). – С. 25–29.
- Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids / I. C. Green, A. W. Davie, J. Golawski [et al.] // Anal. biochem. – 1982. – Vol. 126, № 1. – P. 131–138.
- eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity / R. Rafikov, F. V. Fonseca, S. Kumar [et al.] // J Endocrinol. – 2011. – Vol. 210 (3). – P. 271–284.
- Hepatic and splanchnic nitric oxide activity in patients with cirrhosis / A. I. Sarela, F. M. Mihaimed, J. J. Batten [et al.] // Gut. – 1999. – Vol. 44. – P. 749–753.

10. Hon W. M. Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby? / W. M. Hon, K. H. Lee, H. E. Khoo // *Ann NY Acad Sci.* – 2002. – Vol. 962. – P. 275–295.
11. Increased inducible nitric oxide synthase and arginase II expression in heart failure: no net nitrite/nitrate production and protein S-nitrosylation / P. Heusch, S. Aker, K. Boenger [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2010. – Vol. 299. – P. 446–453.
12. Kurabe S. Systemic histopathology of rats with CCl₄-induced hepatic cirrhosis / S. Kurabe, N. Shimazu, M. Inagaki // *Laboratory Animals* – 1991. – Vol. 25. – P. 21–25.
13. Rockey D. C. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension / D. C. Rockey, J. J. Chung // *Gastroenterol.* – 1998. – Vol. 114. – P. 344–351.
14. Vallance P. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? / P. Vallance, S. Moncada // *Lancet* – 1991. – Vol. 337. – P. 776–778.
15. Wiest R. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough / R. Wiest, R. J. Groszmann // *Hepatology.* – 2002. – Vol. 35(2). – P. 478–491.

УДК 616.36-004.001.4-032:615.31

СТАН СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦИРОЗІ ПЕЧІНКИ

Олещук О. М.

Резюме. На моделі CCl₄-індукованого експериментального цирозу печінки досліджували стан системи оксиду азоту. Встановлено, що циротичне ураження супроводжується зниженням вмісту ендотеліальної та наростанням індукцибельної NO-синтази, що супроводжується зростанням продукції прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-6 та TNF- α ; збільшенням концентрації стабільного метаболіту оксиду азоту NO₂⁻ в крові та його зменшення у печінці.

Ключові слова: оксид азоту, печінка, нітрит-аніон, нітрат-аніон, цитокіни, iNOS, eNOS.

УДК 616.36-004.001.4-032:615.31

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ОКСИДА АЗОТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ

Олещук А. М.

Резюме. На модели CCl₄-индуцированного экспериментального цирроза печени исследовали состояние системы оксида азота. Установлено, что цирротическое поражение сопровождается снижением содержания эндотелиальной и нарастанием индуцибельной NO-синтазы, ростом продукции провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α ; увеличением концентрации стабильного метаболита оксида азота NO₂⁻ в крови и его уменьшение в печени.

Ключевые слова: оксид азота, печень, нитрит-анион, нитрат – анион, цитокины, iNOS, eNOS.

UDC 616.36-004.001.4-032:615.31

Nitric Oxide Status in Liver Experimental Cirrhosis

Oleshchuk O. M.

Abstract. Introduction. Chronic liver diseases, such as cirrhosis, are accompanied by changes in splanchnic and systemic circulation. An nitric oxide (NO) has been proposed to play the main role in the pathogenesis of vasodilatation and vascular hypocontractility. NO is formed from the aminoacid L-arginine, due to the action of several isoforms of the enzyme NO synthase (NOS). The endothelial isoform NOS is expressed constitutively in the endothelial and some other cells (including hepatocytes) where it produces NO in a continuous manner, albeit in small amounts, in response to physical factors (shear stress) or chemical mediators (vasoconstrictor hormones, for instance). On the contrary, inducible isoform NOS is induced in the vascular wall and different cells by endotoxins and cytokines, among others, and produces big amounts of NO although in a short period of time. This study was designed to determine the role nitric oxide and NOS in pathogenesis of CCl₄-induced experimental cirrhosis.

Subjects and methods The study was conducted on 24 white male rats weighing 170-210 g weight, which were randomized into 2 groups: control and cirrhosis. Cirrhosis was modeled by the method described Kurabe S. et al., 1991. 50% solution of carbon tetrachloride was administered orally twice a week for 3 months in dose 2 ml per kg of animal. NO₂⁻ and NO₃⁻ concentrations in blood and liver were determined according Kiselyk I. O., 2001. Determinations of eNOS and iNOS levels were performed by ELISA method using Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kits for Rat, Usbn, Life Science. Histopathology. A portion of the tissue from ischemic liver lobe was fixed in 10% neutral-buffered formalin solution for 5 days, embedded in paraffin, and sectioned. The sections were stained with hematoxylin and eosin. Statistical analyses of results were performed by OriginPro Program. All data are expressed as mean \pm standart deviation. Differences between experimental groups were analyzed with an unpaired 2-tailed Student *t* test. All differences were considered statistically significant at a *p* < 0.05.

Results Histological study of liver micro preparations of experimental animals confirmed the formation of cirrhosis in animals. Hepatocytes hepatic lobules were different in shape, some of them do not contain nuclei, in

others – were the nucleus with pronounced symptoms of apoptosis. The hepatocytes which regenerate were trapped by fibrous tissue and form nodules. Fibrous tissue increased in amount and destroyed the normal architecture.

The reduction of the stable metabolite of nitric oxide nitrite anion in the liver (24.9%) and its increase (3-fold) in serum was determined in the case of cirrhosis. The level of NO_3^- in the blood increased by 23.5% and in the liver it did not change relative to control group. The contents of the endothelial form of NO-synthase in the liver and blood decreased by 38.8 and 58.6%, inducible NOS enzyme increased by 2.5 and 4.1 times, respectively. The levels of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α , in experimental cirrhosis were higher than control values at 4.0; 4.1 and 5.8 times.

Conclusion Cirrhotic liver disease, which confirmed by the presence of morphologically pronounced is accompanied by a decreased endothelial and increased the inducible NO-synthase concentrations, increased levels of nitrite and nitrate anions in the blood and a decrease in NO_2^- in the liver. Activation nitric oxide metabolism in the blood s is accompanied by increased production of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL- 6 and TNF- α . In case of experimental cirrhosis, in our opinion, there is a relative lack of eNOS- induced nitric oxide in the affected organ and the overall iNOS-stimulated overproduction of NO. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of liver disease suggests the possibility of modulation of NO-synthase to prevent and eliminate the morphological manifestations of this disease.

Prospects for further development. Establishing of the nitric oxide role in the pathogenesis of liver cirrhosis justifies the perspectives of modulators of nitric oxide synthesis as effective hepatoprotective agents.

Key words: nitric oxide, liver, nitrite-anion, nitrate anion, cytokines, iNOS, eNOS.

Рецензент – проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 20. 05. 2014 р.