

БЛОКАТОРИ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ ПРИ ІШЕМІЇ-РЕПЕРFUЗІЇ ПЕЧІНКИ

©О.М. Олещук

Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського

РЕЗЮМЕ. Вивчали вплив блокаторів синтезу оксиду азоту на морфо-функціональний стан печінки за умов експериментальної ішемії-реперфузії.

Показано, що введення неселективного блокатора NO-синтази та селективного блокатора iNOS веде до погіршення морфо-функціонального стану печінки при ішемії-реперфузії, що проявляється активацією цитолізу, процесів ліпопероксидації та порушенням мітохондріального дихання, розвитком дистрофічно-некротичних змін тканини печінки із формуванням вогнищевих некрозів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: N-нітро-L-аргінін, аміногуанідин, печінка, ішемія-реперфузія.

Вступ. Ішемічно-реперфузійне ураження є однією з основних причин дисфункції транспланта в ранні терміни після операції і негативно впливає на виживання пацієнтів після трансплантації [1]. В клінічних умовах негативний вплив ішемії-реперфузії (IP) може проявлятися від незначних порушень функції транспланта зі збереженням чи порушенням мікроциркуляції до ураження паренхіматозних клітин і відсутності функції транспланта. Базуючись на результатах експериментальних досліджень, можна сказати, що основними в патогенезі IP є порушення мікроциркуляції в печінці, виникнення адгезії лейкоцитів, окисного стресу і синусоїдальної констрикції [2]. Серед медіаторів ураження, що беруть участь в патогенезі IP, значну роль відіграє оксид азоту (NO), який модулює кровотік і клітинну адгезію в судинах, а також окислювально-відновний статус паренхіматозних клітин печінки [3]. Однак дані щодо протективної чи токсичної ролі NO при IP є суперечливими. Відомо, що застосування NO прекурсорів, таких як L-аргінін та сполуки FK409, мінімізує негативний вплив печінкової реперфузії та покращує стан мікроциркуляції [4, 5]. Разом з тим, результати ряду досліджень свідчать, що призначення інгібіторів NO-синтаз (NOS) посилює ураження при експериментальній IP, про що свідчить підвищення активності печінкових трансаміназ, зменшення швидкості перфузії та порушення мікроциркуляції [6, 7]. Цікаво, що інгібітори NOS з високою специфічністю до індукційної ізоформи iNOS, на відміну від неселективних інгібіторів NOS, дещо усувають негативний вплив IP [8]. Деякі, хоча і не всі, дослідники вказують, що оксид азоту, синтезований eNOS, проявляє протективну функцію, а надмірна кількість NO, яка зумовлена активацією iNOS, може мати згубні наслідки через генерацію токсичних супероксид радикалу та пероксинітриту, що в результаті призводить до активації ліпопероксидації, некрозу та апоптозу гепатоцитів [9, 10].

Мета дослідження. Вивчення ролі оксиду азоту в патогенезі ураження можливе шляхом

модуляції синтезу NO, тобто застосування попередників його синтезу чи інгібіторів NOS. Метою нашого дослідження став вплив блокаторів синтезу оксиду азоту на морфо-функціональний стан печінки в ранні стадії реперфузії.

Матеріал і методи дослідження. Дослідження проведено на базі лабораторії доклінічних досліджень лікарських засобів ТДМУ ім. І.Я. Горбачевського. В експерименті використано 36 білих щурів-самців лінії Вістар вагою від 220-300 г. Тварини перебували у віварії з контрольованим температурним режимом, на стандартному раціоні з вільним доступом до їжі та води і 12-годинним циклом день-ніч. Робота з тваринами виконувалась згідно з Європейською конвенцією про гуманне ставлення до лабораторних тварин [11]. Тварин знечулювали тіопенталомнатрію (50 мг/кг маси тіла інтраперитонеально), хірургічне моделювання IP проводили з дотриманням правил асептики. Проводили серединну лапаротомію, відділяли печінку від діафрагми, виділяли орган. Ішемію медіальної та лівої латеральної часток печінки проводили шляхом перетискання судинного пучка, що містить портальну вену і гілки печінкової артерії, використовуючи атравматичний капілярний затискач [12]. Дана модель спричиняє розвиток ішемії лише ліво- і серединних часток (~70 % печінки), залишаючи кровопостачання правої і хвостової часток неушкодженим [13]. В кінці періоду ішемії судинний затискач знімали і відновлювалась реперфузія. По закінченні експерименту для біохімічних та гістологічних досліджень забирали кров та зразки печінкової тканини. Тварин рандомізували на 4 групи по 6 тварин: 1 група – контрольна (несправжньо-оперовані тварини – лапаротомія); 2 група – IP (ішемія протягом 45 хв, за якою слідував 2 год період реперфузій при кімнатній температурі); 3 група – неселективний блокатор NOS N-nitro-L-arginine (L-NAME)+IP; 4 група – селективний блокатор iNOS аміногуанідин (AG) +IP. Досліджувані препарати вводили в дозі 10 мг/кг і.п., повторно 3 дні, останній раз за 10 хв до моделювання IP.

У сироватці крові за допомогою стандартних наборів реактивів “Філісіт діагностика” (Україна) визначали активність ферментів цитолізу АлАТ та АсАТ. У сироватці крові визначали вміст кінцевих продуктів метаболізму оксиду азоту NO_2^- та NO_3^- [14, 15]. Про активність процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та стан антиоксидантної системи (АОС) судили за вмістом у гомогенатах печінки ТБК-активних продуктів (ТБК) [16], гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) [17], відновленого глутатіону (GSH) [18], активності каталази (КАТ) [19], супероксиддисмутази (СОД) [20], сукцинатдегідрогенази (СДГ) [21] і цитохром оксидази (ЦХО) [22]. Всі отримані результати були оброблені методом варіаційної статистики, використовуючи t критерій Стьюдента.

Для гістологічного дослідження шматочки органа фіксували протягом 48 год у 10 %-му розчині формаліну. Потім в отриманих зрізах оцінювали загальну картину структури печінки із забарвленням їх гематоксилином та еозином [23].

Результати й обговорення. Встановлено, що вже на ранній стадії реперфузії виникають порушення функціонального стану печінки (табл. 1). Про це свідчить значне зростання активності АлАТ та АсАТ при ІР у порівнянні з групою несправжньо оперованих тварин (табл. 1). Відомо, що основним пошкоджувальним фактором при ІР синдромі є вільні радикали кисню,

утворення яких різко зростає в умовах відновлення кровотоку [24]. Вміст ТБК-активних продуктів та ГПЛ в ураженому органі у другій групі тварин у порівнянні з першою збільшився в 1,7 та 6,6 рази відповідно. Вірогідно знижується активність антиоксидантних ферментів СОД та КАТ на 61 та 36 % відповідно. Зниження протекторних властивостей при ІР в значній мірі, на думку Chang E.J. et al., 2004, пов'язане з пригніченням глутатіон-синтезуючої функції печінки [25]. Наші дослідження вказують на зменшення пулу відновленого глутатіону на 31 % при ІР. Відомо, що реактивні форми кисню та цитокіни є потужними індукторами іNOS [26]. На порушення процесів мітохондріального дихання при ІР вказувало вірогідне зниження ферментів СДГ і ЦХО (див. табл. 1). Разом з тим, результати наших досліджень показують, що на 2 годину реперфузії рівень кінцевих продуктів метаболізму оксиду азоту нітратів вірогідно не змінюється, а нітритів знижувався на 52 %. Це може бути пояснене тим, що гіперпродукція іNOS-залежного NO настає лише через 4–6 годин від початку відновлення кровотоку, що зумовлено затратою часу на процес транскрипції та синтезу ферменту [27].

Блокування синтезу NO за допомогою як неселективного блокатора NOS L-NAME та селективного інгібітора тільки іNOS AG при ішемічно-реперфузійному ураженні печінки вело до ще

Таблиця 1. Показники стану печінки за введення L-NAME та AG при ішемії-реперфузії (ІР) ($M \pm m$)

Серії дослідів	1 група-контроль	2 група-ІР	3 група-ІР + L-NAME	4 група-ІР +AG
АлАТ, ммоль/(г·л)	0,44±0,10	2,35±0,09 p<0,001	3,25±0,12 p ₁ <0,001	2,77±0,10 p ₁ <0,05
АсАТ, ммоль/(г·л)	1,63±0,12	4,27±0,37 p<0,001	7,87±0,15 p ₁ <0,005	5,30±0,17 p ₁ <0,05
КАТ, мкат/г	4,47±0,12	2,87±0,27 p<0,0025	1,75±0,07 p ₁ <0,05	2,05±0,20 p ₁ <0,05
СОД, ум.од/г	5,61±0,25	2,16±0,16 p<0,001	1,35±0,06 p ₁ <0,05	1,60±0,15 p ₁ <0,05
ГПЛ, ум. од./г	3,53±0,29	6,10±0,26 p<0,001	8,07±0,42 p ₁ <0,001	6,93±0,22 p ₁ <0,05
ТБК (печ.), ммоль/кг	3,04±0,24	5,18±0,33 p<0,002	6,73±0,43 p ₁ <0,05	6,36±0,32 p ₁ <0,05
GSH, ммоль/кг	4,07±0,09	2,82±0,04 p<0,005	2,12±0,08 p ₁ <0,05	2,78±0,19 p ₁ >0,5
NO_2^- (сир.), мкмоль/л	1,62±0,08	0,78±0,06 p<0,001	0,43±0,04 p ₁ <0,002	0,58±0,05 p ₁ <0,05
NO_3^- (сир.), мкмоль/л	10,18±0,42	9,90±0,46 p>0,05	8,65±0,12 p ₁ <0,002	8,74±0,18 p ₁ <0,05
ЦХО, ммоль/(кг·хв)	8,80±0,24	6,72±0,19 p<0,05	8,65±0,12 p ₁ >0,05	8,74±0,18 p ₁ >0,05
СДГ, ммоль/(кг·хв)	8,23±0,12	6,93±0,12 p<0,05	6,48±0,07 p ₁ <0,05	7,08±0,09 p ₁ >0,05

більшого поглиблення патологічного процесу. За введення L-NAME та AG зростала активність АлАТ та АсАТ (на 38 % і 84 % та 17 % і 24 % відповідно). Про активізацію процесів ПОЛ свідчить ще більше, в порівнянні з IP, зростання вмісту у печінці ТБК та ГПЛ (в 1,3 і 1,2 рази – L-NAME та 1,2 і 1,14 рази – AG). Вміст відновленого глутатіону та активність КАТ та СОД у даній групі тварин вірогідно знижувалися (див. табл. 1), що вказує на наростання віднорадикального окислення та виснаження системи антиоксидантного захисту при пригніченні активності як конститутивної NOS, так і індукцибельної форм NO-синтази. Разом з тим наші дослідження вказують на появу більш виражених проявів ураження, якщо блокується конститутивна форма ферменту [28, 29]. Рівень нітрит та нітрат аніона в сироватці крові при введенні блокаторів синтезу NO зростав на 45 та 13 % та на 26 і 12 % відповідно у порівнянні з IP. Введення препаратів вірогідно не змінює активність ферментів дихального ланцюга мітохондрій у порівнянні з IP, що вказує на роз'єднання процесів окислювального фосфорилування в мітохондріях [30, 31]. Погіршення функціонального стану печінки при блокуванні синтезу NO під час IP дозволяє стверджувати про його протективну роль в період ранньої реперфузії.

Результати біохімічних досліджень були підтверджені морфологічно. При гістологічному

дослідженні тканини печінки при застосуванні L-NAME при ішемії-реперфузії виявлено, що трабекулярна структура печінкової часточки була збереженою лише частково. Центральні вени були розширеними, проте не містили еритроцитів. Синусоїди були значно розширеними вільними від еритроцитів в централобулярних ділянках і звуженими та насиченими клітинними макрофагами в центральних та периферичних ділянках печінкової часточки. Портальні тракти були дещо розширеними, жовчні протоки портальних трактів окремих ділянках оточені лімфогістіоцитарними інфільтратами навколо жовчних проток.

Висновки. Таким чином, результати проведених досліджень дозволяють стверджувати, що блокатори синтезу оксиду азоту сприяють погіршенню морфо-функціонального стану печінки при ішемії-реперфузії, що проявляється активацією цитолізу, процесів ліпопероксидації та порушенням мітохондріального дихання, що морфологічно підтверджується появою у печінці дистрофічно-некротичних змін із формуванням вогнищевих некрозів.

Перспективи подальших досліджень.

З'ясування ролі NO в патогенезі ішемічно-реперфузійного ураження печінки дозволить здійснювати ефективний пошук засіб корекції серед групи речовин – модуляторів синтезу оксиду азоту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Reperfusion injury, antioxidants and hemodynamics during orthotopic liver transplantation / H. F. Goode, N. R. Webster, P. D. Howdle et al. // *Hepatology*. – 1994. – V. 19. – P. 354–359.

2. Imamura H., Brault A., Huet P-M. Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation // *Hepatology*. – 1997. – V. 25. – P. 664–671.

3. Ходосовский М. Н., Зинчук В. В. Участие L-аргинин-NO-системы в развитии реперфузионных повреждений печени // *Экспер. и клин. фармакология*. – 2003. – № 3. – С. 89.

4. Посохова К. А. Плосканич Л. Й., Олещук О. М. Ефективність L-аргініну при ішемічно-реперфузійному пошкодженні печінки в експерименті // *Буковинський медичний вісник*. – 2004. – Т. 8, № 1. – С. 138–141.

5. Beneficial effects of FK409, a novel nitric oxide donor on reperfusion injury of rat liver / Ohmori H., Dhar D., Nakashima Y et al. // *Transplantation*. – 1998. – V. 66. – P. 579–585.

6. Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia. / Y. Wang, W. Mathews, D. Guido et al. // *Shock*. – 1995. – V. 4. – P. 282–288.

7. NO modulates P-selectin and ICAM-1 mRNA expression and hemodynamic alterations in hepatic I/

R. P. Liu, B. Xu, C. Hock et al. // *Am. J. Physiol.* – 1998. – V. 275. – P. 2191–2198.

8. Beneficial effects of inducible nitric oxide synthase inhibitor on reperfusion injury in the pig liver / M. Isobe, T. Katsuramaki, K. Hirata et al. // *Transplantation*. – 1999. – V. 68. – P. 803–813.

9. Wang Y., Lawson J., Jaeschke H. Differential effect of 2-aminoethyl-isothiourea, an inhibitor of the inducible nitric oxide synthase, on microvascular blood flow and organ injury in models of hepatic ischemia-reperfusion and endotoxemia // *Shock*. – 1998. – V. 10. – P. 20–25.

10. Billiar T. The delicate balance of nitric oxide and superoxide in liver pathology // *Gastroenterology*. – 1995. – V. 108. – P. 603–605.

11. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasbourg. – 1986. – № 123. – 52 p.

12. Експериментальне вивчення жовчогінної, холеспазмолітичної, холелітіазної та гепатопротекторної активності нових лікарських засобів / С.М. Дроговоз, Ю.І. Губський, М.П. Скакун та ін. // У кн.: Доклінічні дослідження лікарських засобів (метод. рекомендації) / За ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – С. 334–351.

13. Koo A. et al. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion:

- evidence for a role for superoxide anion / A. Koo, H. Komatsu, G. Tao et al. // *Hepatology*. – 1992. – V. 15. – P. 507–514.
14. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids / L.C. Green, A.W. Davie, J. Glogowski et al. // *Analyt. Biochem.* – 1982. – Vol. 126, № 1. – P. 131–138.
15. Кіселик І.О., Луцик М.Д., Шевченко Л.Ю. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології // *Лабораторна діагностика*. – 2001. – № 3. – С. 43–45.
16. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // *Лаб. дело*. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
17. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // *Лаб. дело*. – 1983. – № 3. – С. 33–35.
18. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – № 82. – P. 70–77.
19. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // *Лаб. дело*. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
20. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах // *Лаб. дело*. – 1985. – № 11. – С. 678–684.
21. Ещенко Н.Д., Вольский Г.Г. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы // *Методы биохимических исследований*. – Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1982. – С. 207–212.
22. Современные методы в биохимии / Под ред. акад. АМН СССР В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – 390 с.
23. Кононский А.И. Гистохимия. – К.: Вища школа, 1976. – 280 с.
24. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion / A. Koo, H. Komatsu, G. Tao et al. // *Hepatology*. – 1992. – V. 15(3) – P. 507–514.
25. Effect of artificial cells on hepatic function after ischemia-reperfusion injury in liver / E.J. Chang, S.H. Lee, K.C. Mun et al. // *Transplant. Proc.* – 2004. – V. 36. – P. 1959–1961.
26. Ramanoli G., Armbrust T. Cytokines in the liver // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2011. – V. 13. – P. 777–784.
27. Kjuj Sbih, Putrick S. Kumutb Nitric Oxide in Liver Transplantation: Pathobiology and Clinical Implications // *Liver Transpl.* – 2003. – V. 9. – P. 1–11.
28. Kupffer cells protect liver from ischemia-reperfusion injury by an inducible nitric oxide synthase-dependent mechanism / Hsu C.M., Wang J.S., Liu C.H., Chen L.W. // *Shock* – 2002. – V. 17. – P. 280–285.
29. The role of iNOS in liver ischemia-injury / V.G. Lee, M.L. Johnson, J. Baust, V.E. Laubach et al. // *Shock*. – 2001. – V. 16. – P. 355–360.
30. Кургалюк Н. Вплив L-аргініну і блокатора синтази оксиду азоту L-NNA на показники енергозабезпечення мітохондрій міокарда мурчаків за умови гострої гіпоксії // *Вісник Львів. ун-ту*. – 2002. – В. 29. – С. 177–186.
31. Tatoyan A., Giulivi C. Purification and characterization of a nitric oxide synthase from rat liver mitochondria // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – P. 11044–11048.

NITRIC OXIDE SYNTHESIS BLOCKERS AT LIVER ISCHEMIA-REPERFUSION

O.M. Oleshchuk

Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky

SUMMARY. Influence of inhibitors of nitric oxide synthesis on morpho-functional status of liver under experimental ischemia-reperfusion. Introduction of non-selective NOS and selective iNOS blockers aggravate the liver injury in ischemia-reperfusion, causes activation of cytolysis, lipid peroxidation processes and violation of mitochondrial respiration, the development of dystrophic-necrotic changes with the formation of focal necrosis.

KEY WORDS: N-nitro-L-arginine, aminoguanidine, liver, ischemic-reperfusion.