

## МОДУЛЯЦІЯ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ ПРИ ІШЕМІЇ-РЕПЕРFUЗІЇ ПЕЧІНКИ

©Я. Я. Боднар, О. М. Олещук, Т. В. Дацко, О. О. Шевчук,  
Ю. М. Орел, А. З. Миколенко

*ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського»*

**РЕЗЮМЕ.** Ішемічно-реперфузійне ураження печінки виникає при відновленні кровотоку після тривалого періоду ішемії. Проведені дослідження показали, що оксид азоту відіграє провідну роль в пристосуванні до ішемії та проявляє цитопротекторну роль при ішемічно-реперфузійному ураженні печінки. Інгібування синтезу NO погіршує мофодифункціональний стан печінки, а застосування попередників синтезу NO зменшує прояви патологічного процесу в період реперфузії

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** печінка, ішемія-реперфузія, оксид азоту.

**Вступ.** Відомо, що при травмах, під час хірургічних втручань (при резекції, трансплантації печінки, при тимчасовому перетисканні гепатодуоденальної зв'язки), геморагічному, опіковому та інших шоківих станах може розвиватись ішемічне ураження печінки [1, 2]. Через деякий час кровопостачання в органі відновлюється за рахунок реперфузії. Цей феномен – ішемія-реперфузія (ІР) – патофізіологічно асоціюється з гострою реактивною відповіддю запального характеру, капілярною дисфункцією, гіперпродукцією вільних радикалів, котрі індують апоптоз, і призводить до тяжких ускладнень: відторгнення трансплантата, розвитку запальних процесів, некрозу гепатоцитів, що, в кінцевому результаті, визначає подальшу долю ураженого органа [3, 4]. Як центральний медіатор пристосування до ішемії Peralta et al. розглядають оксид азоту (NO) [5]. В тканинах NO утворюється під впливом ізоформ ферменту NO-синтази (NOS), які за характером індукції і дією поділяють на конститутивну (нейрональну – nNOS і ендотеліальну – eNOS) та індукційну (iNOS). Нещодавні дослідження показали наявність взаємозв'язку між рівнем NO та станом оксигенації [6] і мікроциркуляції у печінці [7]. Однак дискусія щодо цитотоксичної чи цитопротективної ролі NO продовжується, є повідомлення щодо можливості застосування інгібіторів NOS в умовах ішемії [8].

Таким чином, очевидним є важливе значення NO при ІР. Ми сподіваємося, що результати наших експериментальних досліджень зможуть сприяти формуванню фармакологічної стратегії щодо використання модюляторів синтезу NO з метою захисту від ішемічних ушкоджень. Разом з тим, механізм цього впливу при певних патологічних станах, в тому числі ІР, залишається до кінця не з'ясованим.

**Метою дослідження** було з'ясування ролі NO при ІР печінки.

**Матеріал та методи дослідження.** Дослідження було проведено на базі лабораторії доклінічних досліджень лікарських засобів ТДМУ імені І. Я. Горбачевського. В експерименті використано

30 білих щурів-самців лінії Вістар вагою 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 [9]. Тварин знеболювали тіопенталом натрію (50 мг/кг маси тіла інтраперитонеально (і.п.), хірургічне моделювання ІР 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 порталну вену і гілки печінкової артерії, використовуючи атравматичний капілярний затискач [10]. Дана модель спричиняє розвиток ішемії лише лівої і серединних часток печінки (~70 % печінки), залишаючи кровопостачання правої і хвостової часток неушкодженим [11]. В кінці періоду ішемії судинний затискач був знятий і кровотік відновлювався (реперфузія). Операційне поле покривали стерильною серветкою, змоченою у фізіологічному розчині. Після закінчення експерименту забирали зразки крові та печінкової тканини. Тварин рандомізували на 5 груп по 6 тварин: 1 група – контрольна (несправжньооперовані тварини – лапаротомія); 2 група – ІР (ішемія серединної та лівої латеральної часток печінки на 45 хв, за якою слідував 2-годинний період реперфузії при кімнатній температурі); 3 група – ІР + LA (L-arginine 25 мг/кг і.п. повторно 3 дні перед ішемією, останній раз за 10 хв до ІР); група 4 – ІР+ L-NAME (10 мг/кг і.п., повторно 3 дні перед ішемією, останній раз за 10 хв до ІР), група 5 – ІР + аміногуанідин (10 мг/кг і.п., повторно 3 дні перед ішемією, останній раз за 10 хв до ІР).

У сироватці крові за допомогою стандартних наборів реактивів "Філісіт діагностика" (Україна) визначали активність аланінамінотрансферази (АлАТ) та аспартатамінотрансферази (АсАТ). У сироватці крові визначали вміст кінцевих продуктів

метаболізму оксиду азоту  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  [12, 13]. Про стан системи прооксиданти-антиоксиданти судили за вмістом у гомогенатах печінки ТБК-активних продуктів (ТБК) [14], гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) [15], відновленого глутатіону (GSH) [16], активності каталази (КАТ) [17], супероксиддисмутази (СОД) [18]. Всі отримані результати були оброблені методом варіаційної статистики, використовуючи t-критерій Стюдента (Microsoft Excel XP) та методом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) за допомогою програми Origin 7.5 (OriginLab Corp., USA).

**Результати й обговорення.** Маркерами ураження печінки при ІР є показники активності ферментів, що виділяються в кров при руйнуванні гепатоцитів, такі як АлАТ та АсАТ. Тому зростання їх активності в 5,3 і 2,6 раза відповідно свідчить про розвиток цитолітичних процесів у печінці при її ІР ураженні. На ранній стадії реперфузії значно збільшується рівень продуктів ліпопероксидації та цитокінів, генерація яких відбувається в купферівських клітинах [19, 20, 21]. Через 2 год від початку реперфузії вміст ТБК-активних продуктів та ГПЛ в ураженому органі збільшився в 1,7 та 6,6 раза відповідно. Вільні кисневі радикали активно нейтралізуються такими ендogenousними антиоксидантами як СОД, каталаза. Тому вірогідне зниження їх активності та вмісту GSH при ІР веде до поглиблення патологічного процесу (табл. 1). Зниження протекторних властивостей при оксидативному стресі зумовлене, на думку Chang E. J. et al.

(2004), в значній мірі, пригніченням глутатіонсинтезувальної функції печінки [22]. Наші дослідження вказують на зменшення пулу відновленого глутатіону на 11 % при ІР. Відомо, що реактивні форми кисню та цитокіни (такі, як ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-12, TNF $\alpha$ ) є потужними індукторами іNOS [23]. Гіперпродукція іNOS-залежного NO настає лише через 4–6 годин від початку реперфузії, що зумовлено затратою часу на процес транскрипції та синтезу ферменту. Тому в ранні періоди реперфузії синтез NO зумовлений eNOS, активність якої порушується при ішемії [24]. На 2 годину реперфузії рівень кінцевих продуктів метаболізму оксиду азоту – нітратів – вірогідно не змінюється, а нітритів знижувався на 52 % в порівнянні з контрольною групою тварин. Останнім часом з'явилися повідомлення про порушення біодоступності NO в ранні періоди реперфузії [25]. Передбачається, що NO має цитопротективний вплив на мікроциркуляцію, яка порушується в ранньому періоді реперфузії. Ступінь ураження при цьому залежить не від тривалості реперфузії, а від часу ішемії. У експериментах на щурах із застосуванням інгібітора NO синтази і контрольним тестом – сироваткової трансамінази – ця властивість NO була підтверджена [25].

Попереднє повторне введення попередника NO L-arginine сприяло покращанню функціонального стану печінки та пригніченню активності процесів ліпопероксидації. Активність ферментів цитолізу АлАТ, АсАТ була вірогідно нижчою, ніж за умов ураження (рис. 1). Рівень продуктів ПОЛ (ГПЛ

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

Серії дослідів	1 група-Контроль	2 група-ІР	3 група-ІР + LA	4 група-ІР + L-NAME	5 група-ІР + аміногуанідин
АлАТ, ммоль/(г·л)	0,44 $\pm$ 0,10	2,35 $\pm$ 0,15 $p < 0,001$	1,10 $\pm$ 0,09 $p_1 < 0,001$	3,25 $\pm$ 0,14 $p_1 < 0,001$	2,77 $\pm$ 0,10 $p_1 < 0,05$
АсАТ, ммоль/(г·л)	1,63 $\pm$ 0,12	4,27 $\pm$ 0,37 $p < 0,001$	2,83 $\pm$ 0,20 $p_1 < 0,001$	7,87 $\pm$ 0,15 $p_1 < 0,005$	5,30 $\pm$ 0,15 $p_1 > 0,05$
КАТ, мкат/г	4,47 $\pm$ 0,12	2,87 $\pm$ 0,27 $p < 0,0025$	3,21 $\pm$ 0,2 $p_1 < 0,05$	1,75 $\pm$ 0,07 $p < 0,05$	2,05 $\pm$ 0,06 $p_1 > 0,05$
СОД, ум.од/г	5,61 $\pm$ 0,25	2,16 $\pm$ 0,16 $p < 0,001$	3,59 $\pm$ 0,08 $p < 0,05$	1,35 $\pm$ 0,06 $p_1 < 0,05$	1,60 $\pm$ 0,15 $p_1 < 0,05$
ГПЛ, ум.од. /г	3,53 $\pm$ 0,29	6,10 $\pm$ 0,26 $p < 0,001$	4,93 $\pm$ 0,18 $p_1 < 0,05$	6,40 $\pm$ 0,27 $p_1 > 0,5$	6,93 $\pm$ 0,22 $p_1 = 0,05$
ТБК (печ.), ммоль/кг	3,04 $\pm$ 0,24	5,18 $\pm$ 0,33 $p < 0,002$	3,66 $\pm$ 0,07 $p_1 < 0,005$	6,73 $\pm$ 0,43 $p_1 < 0,05$	6,36 $\pm$ 0,31 $p_1 < 0,05$
GSH, ммоль/кг	4,07 $\pm$ 0,21	2,82 $\pm$ 0,18 $p < 0,005$	3,84 $\pm$ 0,19 $p_1 < 0,01$	2,12 $\pm$ 0,17 $p_1 < 0,05$	2,77 $\pm$ 0,19 $p_1 > 0,02$
$\text{NO}_2^-$ (сир.), мкмоль/л	1,62 $\pm$ 0,08	0,78 $\pm$ 0,06 $p < 0,001$	2,84 $\pm$ 0,07 $p_1 < 0,002$	0,43 $\pm$ 0,04 $p_1 < 0,002$	0,57 $\pm$ 0,05 $p_1 < 0,05$
$\text{NO}_3^-$ (сир.), мкмоль/л	10,18 $\pm$ 0,42	9,90 $\pm$ 0,46 $p > 0,05$	13,04 $\pm$ 0,63 $p_1 < 0,01$	8,65 $\pm$ 0,12 $p_1 < 0,05$	8,74 $\pm$ 0,18 $p_1 > 0,05$

Примітки. Достовірність:

1.  $p$  – відносно контролю;

2.  $p_1$  – відносно ураження (ІР).

та ТБК) у печінці знижувався, порівняно з ІР. Рівень GSH зростав у 1,4 раза. Активність антиоксидантних ферментів KAT та СОД підвищувалася на 23 та 54 % (табл. 1). Рівень  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  зростав відповідно в 3,0 та 1,3 раза.

Блокування синтезу NO при ішемічно-реперфузійному ураженні печінки вело до поглиблення патологічного процесу. За введення неселективного блокатора NOS L-NAME зростала активність АлАТ та АсАТ (на 38 % та 84 % відповідно, порівняно з групою ІР). Про активізацію процесів ПОЛ свідчить ще більше, порівняно з ІР, зростання вмісту у печінці ТБК та ГПЛ (в 1,3 та 1,2 раза відповідно). Вміст відновленого глутатіону, активність KAT та СОД у даній групі тварин вірогідно знижувалися (табл. 1), що вказує на наростання вільнорадикального окиснення та виснаження системи антиоксидантного захисту при пригніченні активності NOS. Рівень нітрит- та нітратаніону в сироватці крові при введенні блокатора синтезу NO зростав на 45 та 13 %, порівняно з ІР. Погіршення функціонального стану печінки при блокуванні синтезу NO під час ІР дозволяє зробити висновок про його протективну роль в період ранньої реперфузії.

При введенні аміногуанідину, який є селективним блокатором iNOS, ступінь ураження печінки був меншим, порівняно з тваринами, які отримували L-NAME: активність АлАТ та АсАТ була достовірно нижчою на 15 та 33 %, вміст ТБК у сироватці крові був нижчим на 10 %, а GSH – вищим на 32 % на тлі підвищення вмісту  $\text{NO}_3^-$  та  $\text{NO}_2^-$  у печінці на 139 та 56 % відповідно. Таким чином, підвищення вмісту NO асоціюється зі зменшенням ступеня ураження печінки.

Отримані нами результати біохімічних даних підтверджуються і морфологічною картиною.

При гістологічному дослідженні тканини печінки тварин при моделюванні ішемії та застосуванні L-NAME нами виявлено (рис. 1), що трабекулярна структура печінкової часточки була збереженою частково. Центральні вени були розширеними, проте не містили еритроцитів. Синусоїди були значно розширеними і вільними від еритроцитів в центролобулярних ділянках і звуженими та насиченими клітинними макрофагами в центральних та периферійних ділянках печінкової часточки. Портальні тракти були дещо розширеними, жовчні протоки портальних трактів звичайних розмірів, без ознак холестазу. В окремих ділянках зустрічались лімфогістіоцитарні інфільтрати навколо жовчних проток. Гепатоцити були збереженими лише в центролобулярних ділянках печінкової часточки (рис. 2). Клітини центральної та периферійної ділянки печінкової часточки мали блідоєозинофільну дрібнозернисту цитоплазму, відділену від оболонки клітини світлим обідком, та зміщене на периферію ядро (рис. 3). Зустрічалась велика кількість клітин із пікнотично зміненими ядрами та матово-склоподібні клітини із ознаками некрозу.

При моделюванні ішемії та застосуванні аміногуанідину (рис. 4) нами виявлено, що трабекулярна структура печінкової часточки була збереженою. Центральні вени були помірно розширеними і містили незначну кількість еритроцитів. В просвітах синусоїд спостерігались поодинокі макрофаги. В портальних трактах виявлялись окремі лімфо- і гістіоцити. При застосуванні аргініну гепатоцити були звичайної форми, цитоплазма їх дрібнозерниста, насичена глікогеном, про що свідчило сприймання тканиною барвників (рис. 3). Ядра великих розмірів, гіперхромні. Зустрічались

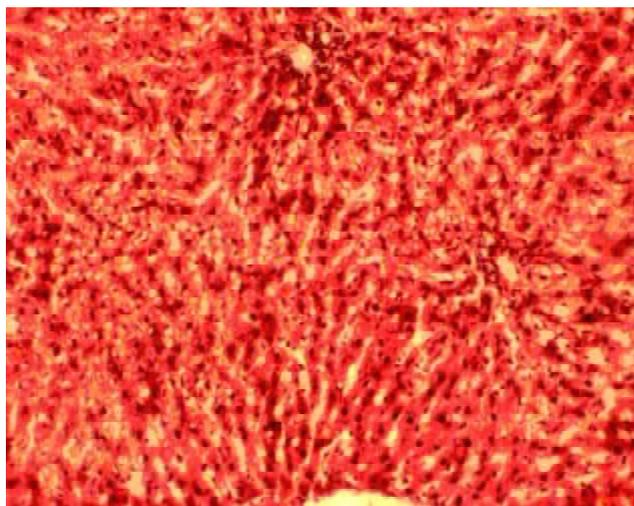


Рис. 1. Гістологічна структура печінки тварин при ішемії та застосуванні L-NAME. Забарвлення гематоксилином та еозином. X160.

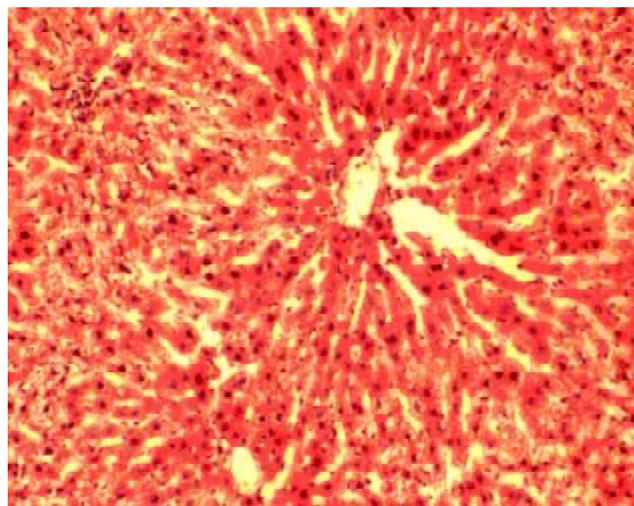


Рис. 2. Гістологічна структура печінки тварин при ішемії та застосуванні L-NAME. Забарвлення гематоксилином та еозином. X160.

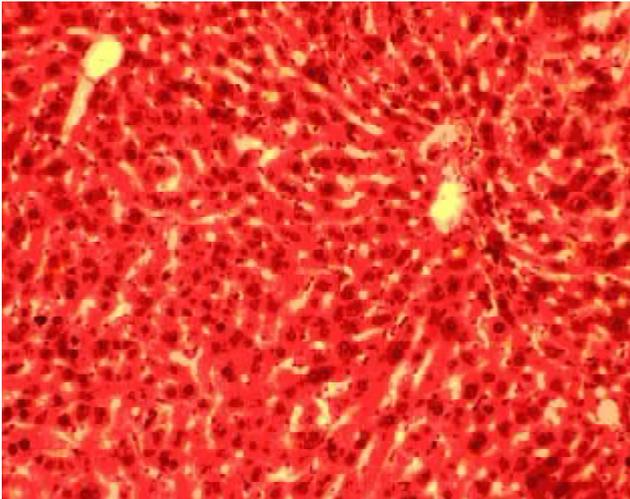


Рис. 3. Гістологічна структура печінки тварин при ішемії та застосуванні аміногуанідину. Забарвлення гематоксилином та еозином. x160.

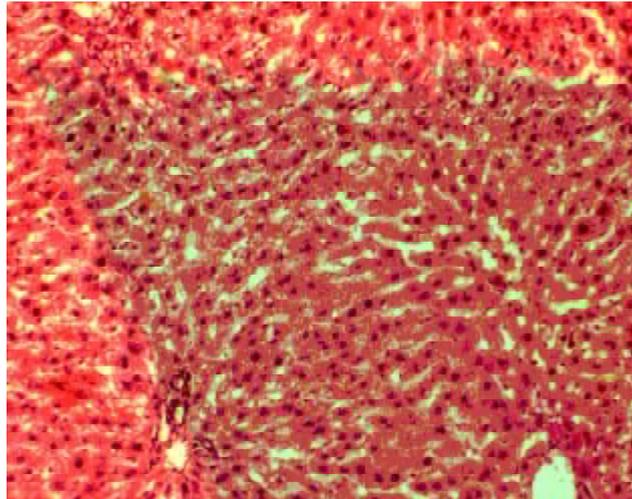


Рис. 4. Гістологічна структура печінки тварин при ішемії та застосуванні L-arginine. Забарвлення гематоксилином та еозином. x160.

поодинокі клітини із явищами гіаліново-крапельної дистрофії.

При гістологічному дослідженні тканини печінки тварин при моделюванні ішемії та застосуванні L-arginine нами виявлено (рис. 4), що трабекулярна структура печінкової часточки була збереженою. Центральні вени були розширеними, проте не містили еритроцитів. Синусоїди були також дещо розширеними і вільними від еритроцитів. Макрофагальна активність не проявлялась. Портальні тракти дещо розширені, жовчні протоки портальних трактів розширені, проте без ознак холестазу. При світлооптичному дослідженні централобулярні гепатоцити були звичайної форми, цитопlasма насиченого кольору, містили чітко виражені ядра. Гепатоцити центральної часточки були представлені крупними клітинами з блідо-еозинофільною дрібнозернистою цитопlasмою,

яка була відділеною від оболонки клітини світлим обідком. Клітини периферійної часточки були з ознаками гіаліново-крапельної дистрофії.

#### **Висновки.**

1. Оксид азоту при ішемічно-реперфузійному ураженні проявляє цитопротекторну дію.

2. Попереднє введення попередників синтезу оксиду азоту сприяє зменшенню проявів ураження за умов ішемії-реперфузії печінки.

3. Блокування синтезу оксиду азоту призводить до порушення морфофункціонального стану печінки.

**Перспективи подальших досліджень.** Додільно провести зіставлення отриманих морфологічних даних з біохімічними параметрами функціонального стану печінки при ішемії-реперфузії та різних методах її корекції.

#### **ЛІТЕРАТУРА**

1. Shah V. Nitric oxide in Liver Transplantation: Pathobiology and Clinical Implication / V. Shah, S. P. Kamath // Liver Transplantation. – 2003. – Vol. 9, № 1. – P. 1–11.

2. Ярошенко И. Ф. Патогенез ишемии-реперфузии печени (обзор литературы) / И. Ф. Ярошенко, Т. Ю. Каланчина // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН. – 2006. – № 1. – С. 29–34.

3. Jaeschke H. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. / H. Jaeschke, A. Farhood // Am. J. Physiol. – 1991. – Vol. 260. – P. 355–362.

4. Салей А. П. Роль оксида азота в регуляции гемодинамических показателей и метаболических функций печени / А. П. Салей, Г. А. Вашанов, М. Ю. Мещерякова // Вестник ВГУ, серия: химия. биология. Фармация. – 2009. – № 2. – С. 129–135.

5. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors / C. Peralta, G. Hotter, D. Closa [et al.] // Hepatology. – 1999. – Vol. 29. – P. 126–132.

6. The relationship of hepatic tissue oxygenation with nitric oxide metabolism in ischemic preconditioning of the liver / R. S. Koti, W. Yang, A. G. McBride [et al.] // FASEB J. – 2002. – Vol. 16. – P. 1654–1656.

7. The effect of ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of ischemia reperfusion injury / R. S. Koti, W. Yang, M. R. Dashwood [et al.] // Liver Transpl. – 2002. – Vol. 8. – P. 1182–1191.

8. Effect of nitric oxide inhibition on rat liver ischemia reperfusion injury / A. Harmanc, N. Tuncel, T. Sarçam [et al.] // Pathophysiology. – 2000. – Vol. 7 – P.183–188.

9. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasburg. – 1986. – № 123. – 52 p.
10. Експериментальне вивчення жовчогінної, холеспазмолітичної, холелітазної та гепатопротекторної активності нових лікарських засобів / С. М. Дрогвоз, 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.
11. 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. – Vol. 15. – P. 507–514.
12. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids / L.C. Green, A.W. Davie, J. Glogowski [et al.] // *Analyt. Biochem.* – 1982. – Vol. 126, № 1. – P. 131–138.
13. Кіселик І. О. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології / І. О. Кіселик, М. Д. Луцик, Л. Ю. Шевченко // *Лабораторна діагностика* – 2001. – № 3. – С. 43–45.
14. Андреева Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // *Лаб. дело*. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
15. Гаврилов В. Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В. Б. Гаврилов, М. И. Мишкорудная // *Лаб. дело*. – 1983. – № 3. – С. 33–35.
16. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – № 82. – P. 70–77.
17. Метод определения активности каталазы / [М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова и др.] // *Лаб. дело*. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
18. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, И. Секей // *Лаб. дело*. – 1985. – № 11. – С. 678–684.
19. Cytokines, endotoxins, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes / D. A. Geller, A. K. Nussler, M. Di Silvio [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1993. – Vol. 90. – P. 522–526.
20. Teoh N. C. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection / N. C. Teoh, G. C. Farrell // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2003. – Vol. 18. – P. 891–902.
21. Ярощенко И. Ф. Патогенез ишемии-реперфузии (обзор литературы) / И. Ф. Ярощенко, Т. Ю. Каланчина // *Бюл. Волгоградского Науч. центра РАМН*. – 2006. – № 1. – С. 29–34.
22. Effect of artificial cells on hepatic function after ischemia-reperfusion injury in liver / E. J. Chang, S. H. Lee, K. C. [et al.] // *Transplant. Proc.* – 2004. – Vol. 36. – P. 1959–1961.
23. Role of nitric oxide in liver ischemia and reperfusion injury / [I. N. Hines, Sh. Kawachi, H. Harada et al.] // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2002. – V. 234/235 – P. 229–237.
24. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat / B. Pannen, F. Al-Adili, M. Bauer [et al.] // *Hepatology*. – 1998. – № 27. – P. 755–764.
25. Беленічев І. Ф. Роль оксиду азоту в регулюванні фізіологічних функцій у нормі та при ішемічній патології / І. Ф. Беленічев, В. А. Дмитряков, О. О. Беляєва // *Військова медицина України* – 2002. – Т. 2, № 3. – С. 48–52.

## PROTECTIVE EFFECT OF NITRIC OXIDE AT LIVER ISCHEMIC-REPERFUSION INJURY

©Ya. Ya. Bodnar, O. M. Oleshchuk, T. V. Datsko, O.O. Shevchuk,  
Yu. M. Orel, A. Z. Mykolenko

*SHEI «Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky»*

SUMMARY. Ischemic-reperfusion liver injury occurs when blood flow is restored after prolonged ischemia. This study has demonstrated prominent role of nitric oxide in cytoprotective effect in case of ischemic-reperfusion injury of liver. NO inhibition enhanced liver injury, NO precursors aggravate hepatic injury during reperfusion.

KEY WORDS: liver, ischemic-reperfusion, nitric oxide.