

© О. М. ОЛЕЩУК

ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського"

Експериментальне обрuntuвання застосування попередників синтезу оксиду азоту при ішемії-реперфузії печінки

О. М. OLESHCHUK

SHEI "Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky"

EXPERIMENTAL STUDY OF NITRIC OXIDE PRECURSORS IN HEPATIC ISCHEMIA-REPERFUSION

Проведено експериментальні дослідження впливу профілактичного введення попередників синтезу оксиду азоту L-аргініну, L-аргініну L-глутамату на морфофункціональний стан печінки при ішемічно-реперфузійному ураженні. Встановлено, що прекурсори оксиду азоту проявляють цито- та органопротекторну дію при ішемії-реперфузії, про що свідчить зниження активності iNOS та зростання eNOS в печінці, зменшення концентрації прозапальних цитокінів у сироватці крові, пригнічення процесів цитолізу та ліпопероксидації, відновлення морфологічної структури печінки.

Experimental study of prophylactic administration of precursor nitric oxide L-arginine, L-arginine L-glutamate on the hepatic morphofunctional state in case of liver ischemia-reperfusion was conducted. It was determined that nitric oxide precursors exhibit cyto- and organo protective in case of ischemia-reperfusion, as evidenced by reduced activity of iNOS and increased eNOS in the liver, reduced blood proinflammatory cytokines, depressed cytolysis and lipid peroxidation, restoration of the morphological structure of the liver.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень та публікацій. Ішемічно-реперфузійне ураження (I/P) печінки є складним патофізіологічним процесом, який виникає при печінковій хірургії, травмі, кровотечі, сепсисі і трансплантації печінки та може призвести до печінкової дисфункції. Хоча основні механізми I/P залишаються до кінця не з'ясованими, на сьогодні можна стверджувати про важливе значення активних форм кисню (АФК), активних форм азоту (АФА) у цьому процесі. Однак, на думку Bahde H., 2010, центральну роль у патофізіології I/P відіграє дисфункція ендотелію печінки [1]. Генерація АФК активованими клітинами Купфера і нейтрофілами викликає ряд токсичних ефектів, включаючи зміни в окисненні ліпідів і білків, виділення прозапальних медіаторів та дисфункцію мікросудин, які разом призводять до клітинного і тканинного ушкодження органа [2]. Окрім того, порушення печінкової мікроциркуляції в період реперфузії є одним з основних механізмів, що спричиняють розвиток I/P ураження [1]. Оксид азоту відіграє провідну роль як у формуванні АФК, АФА, так і в процесах вазодилатації. Разом з тим, дані літератури щодо протективної чи токсичної ролі NO при I/P є суперечливими. Відомо, що застосування NO прекурсорів, таких як L-аргінін та сполуки FK409, мінімізує негативний вплив печінкової реперфузії та покращує стан мікроциркуляції [3, 4]. Водночас результати деяких досліджень свідчать, що призна-

чення інгібіторів NO може попереджувати ураження печінки за I/P [5].

Мега роботи: вивчення ефективності профілактичного введення попередників синтезу оксиду азоту при ішемічно-реперфузійному ураженні печінки.

Матеріали і методи. Дослідження проведено на базі лабораторії доклінічних досліджень лікарських засобів ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського". В експерименті використано 24 білих щурів-самців масою 140–220 г. Тварини перебували у віварії на стандартному раціоні з контрольованим температурним режимом і вільним доступом до їжі та води і 12-годинним циклом день-ніч. Робота з тваринами виконувалась відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Тварин знеболювали тіопенталом натрію (50 мг/кг маси тіла інтраперитонеально), хірургічне моделювання I/P проводили з дотриманням правил асептики. Здійснювали 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 [7]. Дана модель спричиняє розвиток ішемії лише лівих і серединних часток печінки

(~70 % печінки), залишаючи кровопостачання правої і хвостової часток неушкодженим [8]. У кінці періоду ішемії судинний затискач був знятий і відновлювався кровотік. Операційне поле покривали стерильною серветкою, змоченою у фізіологічному розчині. По закінченні експерименту для біохімічного та гістологічного дослідження забирали кров та зразки печінкової тканини. Тварин рандомізували на 4 групи по 6 тварин: 1 група – контрольна (несправжньооперовані тварини – лапаротомія); 2 група – I/P (ішемія серединної та лівої латеральної часток печінки на 45 хв, за якою слідував 2-годинний період реперфузій при кімнатній температурі); 3 група – I/P + L-аргінін (LA) (“Sigma”, США) (25 мг/кг інтраперитонеально, повторно 3 дні перед ішемією, останній раз за 10 хв до I/P); 4 група – I/P+L-аргініну L-глутамат (препарат “Глутаргін”, фармацевтична компанія “Здоров’я”, м. Харків) (L-A L-Г) (45 мг/кг інтраперитонеально, повторно 3 дні перед ішемією, останній раз за 10 хв до I/P).

У сироватці крові за допомогою стандартних наборів реактивів “Філісіт діагностика” (Україна) визначали активність ферментів цитолізу АлАт та

АсАт. У сироватці крові також визначали вміст кінцевих продуктів метаболізму оксиду азоту NO_2^- та NO_3^- [9, 10]. Про стан системи прооксиданти-антиоксиданти судили за вмістом у гомогенатах печінки ТБК-активних продуктів (ТБК) [11], гідроперексидів ліпідів (ГПЛ) [12], відновленого глутатіону (GSH) [13], активності каталази (КАТ) [14], супероксиддисмутази (СОД) [15]. Імуноферментним методом за допомогою наборів реактивів USCN Life Science Inc. у сироватці та гепатоцитах визначали вміст ендотеліальної (eNOS) та індукцибельної (iNOS) NO-синтаз та прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-6 та TNF- α . Всі отримані результати були оброблені методом варіаційної статистики з використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA за допомогою програми Originpro 7.5.

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті проведених досліджень встановлено значне зростання активності АлАТ та АсАТ (в 5,3 і 2,6 раза), що свідчить про розвиток процесу цитолізу в печінці при I/P (табл. 1). Відомо, що на ранній стадії реперфузії значно збільшується рівень

Таблиця 1. Показники функціонального стану печінки при введенні попередників NO при ішемії-реперфузії печінки (M \pm m, n=6)

Серія дослідів	1 група – контроль	2 група – I/P	3 група – IPC + LA	4 група – I/P + L-A L-Г
АлАТ, ммоль/(г·л)	0,44 \pm 0,10	2,35 \pm 0,15 p<0,001	1,10 \pm 0,09 p<0,005 p ₁ <0,001	0,90 \pm 0,05 p<0,01 p ₁ <0,001
АсАТ, ммоль/(г·л)	1,63 \pm 0,12	4,27 \pm 0,37 p<0,001	2,83 \pm 0,20 p<0,01 p ₁ <0,05	2,57 \pm 0,07 p<0,001 p ₁ <0,005
КАТ, мкат/г	4,47 \pm 0,12	2,87 \pm 0,27 p<0,0025	3,97 \pm 0,20 p>0,05 p ₁ <0,05	3,81 \pm 0,06 p<0,01 p ₁ <0,05
СОД, ум. од./г	5,61 \pm 0,25	2,16 \pm 0,16 p<0,001	3,59 \pm 0,24 p<0,01 p ₁ <0,05	3,25 \pm 0,27 p<0,01 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<0,01 p ₁ <0,01	4,63 \pm 0,12 p<0,05 p ₁ <0,01
ТБК (печ.), ммоль/кг	3,04 \pm 0,24	5,18 \pm 0,33 p<0,002	3,66 \pm 0,07 p<0,01 p ₁ <0,01	3,77 \pm 0,16 p<0,05 p ₁ <0,01
GSH, ммоль/кг	4,07 \pm 0,21	2,82 \pm 0,18 p<0,005	3,84 \pm 0,19 p>0,05 p ₁ <0,01	3,97 \pm 0,07 p>0,05 p ₁ <0,001
NO ₂ ⁻ (сир.), мкмоль/л	1,62 \pm 0,08	0,78 \pm 0,06 p<0,001	2,84 \pm 0,07 p<0,001 p ₁ <0,002	2,96 \pm 0,11 p<0,001 p ₁ <0,001
NO ₃ ⁻ (сир.), мкмоль/л	10,18 \pm 0,42	9,90 \pm 0,46 p>0,05	13,05 \pm 0,63 p<0,01 p ₁ <0,01	13,05 \pm 0,17 p<0,001 p ₁ <0,001

Примітка. p – рівень значущості відносно контролю, p₁ – відносно ураження.

продуктів ліпопероксидації та цитокінів, генерація яких відбувається в купферівських клітинах [16, 17]. Нами було показано, що вже через 2 год від початку реперфузії вміст ТБК та ГПЛ в ураженому органі збільшився в 1,7 та 6,6 раза відповідно. Відомо, що вільні кисневі радикали активно нейтралізуються такими ендogenous антиоксидантами, як СОД, каталаза. Тому вірогідне зниження їх активності на 61,4 та 35,9 % при I/P приводить до поглиблення патологічного процесу (табл. 1). Зниження протекторних властивостей при оксидативному стресі зумовлено, на думку Chang E. J. et all.,

2004, значною мірою пригніченням глутатіонсинтезуючої функції печінки [18]. Наші дослідження показали зменшення пулу відновленого глутатіону на 30,7 % за умов I/P ураження.

Відомо, що реактивні форми кисню та цитокіни є потужними індукторами iNOS [19]. Нами було встановлено, що рівень IL-1 β , IL-6 та TNF- α зростає, відповідно, у 8,8; 3,2 та 6,6 раза. А відповідно, вміст у печінці iNOS за I/P вірогідно збільшувався на 57,6 %, разом з тим рівень eNOS знижувався на 38,8 порівняно з контролем (несправжньооперовані тварини) (рис. 1). Проведений нами аналіз резуль-

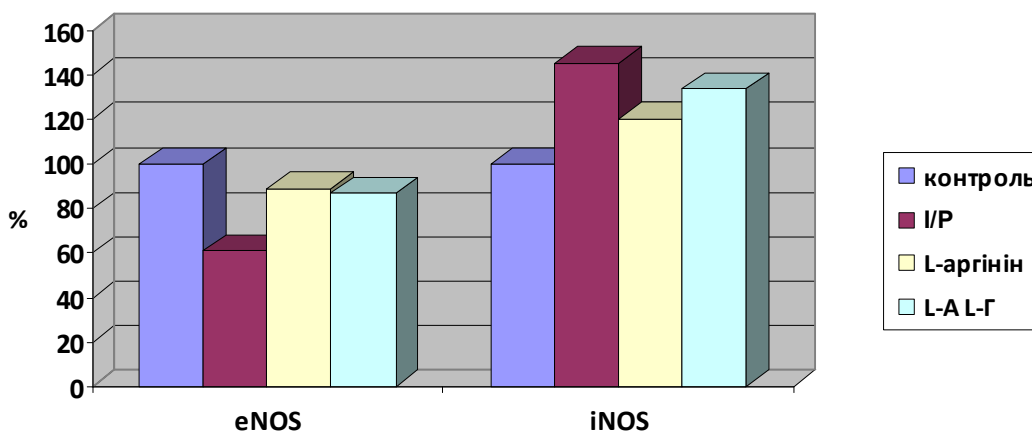


Рис. 1. Вміст eNOS та iNOS у гепатоцитах.

татів досліджень інших науковців показав, що найбільш виражена гіперпродукція iNOS-залежного NO настає лише через 4–6 год від початку реперфузії, що зумовлено затротою часу на процес транскрипції та синтезу ферменту [1, 2, 5, 19]. Тому в ранні періоди реперфузії виникає недостатність синтезу NO, яка може бути зумовлена пригніченням активності eNOS [19]. Нами було встановлено, що на 2-гу год реперфузії рівень кінцевих продуктів метаболізму оксиду азоту нітратів вірогідно не змінювався, а нітритів знижувався на 52 % порівняно з контрольною групою тварин. На нашу думку, зниження вмісту NO за рахунок пригнічення eNOS та, можливо, роз'єднання iNOS [20], що приводить до зниження біодоступності NO, є одним із вирішальних факторів ураження при I/P. Останнім часом з'явилися повідомлення про порушення біодоступності NO в ранні періоди реперфузії [21]. Отже, NO сприяє відновленню мікроциркуляції в органі, яка порушується в ранньому періоді реперфузії. Таким чином, I/P супроводжувалася порушенням мікроциркуляції і гіпоксією, розвитком процесів цитолізу та оксидативного стресу в печінці.

При гістологічному дослідженні тканини печінки тварин, яким моделювали I/P, виявлено, що

структура печінкової часточки була збереженою лише частково. Центральні вени помірно розширювались, містили невелику кількість еритроцитів. Синусоїди контурувались слабо. Дистрофічні зміни в гепатоцитах проявлялися в дифузній формі, поширюючись на всю часточку. Гідропічна дистрофія, яка трансформувалась у балонну, переважала у центроlobулярно розміщених гепатоцитах. При еозинофільній дегенерації ядра клітин переважно зменшувались у розмірі, пікнотично зморщувались, що проявлялось конденсацією хроматину. Іноді ці зміни поєднувались із некрозом клітин, і формувалися поля некрозу (рис. 2). Поряд із ушкодженими гепатоцитами спостерігали клітини із вираженим набуханням ядер, в яких мали місце великі ядерця, що можна розцінювати як прояв репарації. Портальні тракти містили помірно розширені судини та були частково інфільтровані лімфо-гістіоцитарними компонентами. Отже, при ішемічно-реперфузійному ураженні порушувалася структурна організація печінкової часточки, що проявлялось різким звуженням синусоїдальних просторів через розвиток балонної дистрофії в гепатоцитах.

Профілактичне введення попередників NO LA та L-A L-G сприяло поліпшенню функціонального стану печінки та пригніченню активності процесів

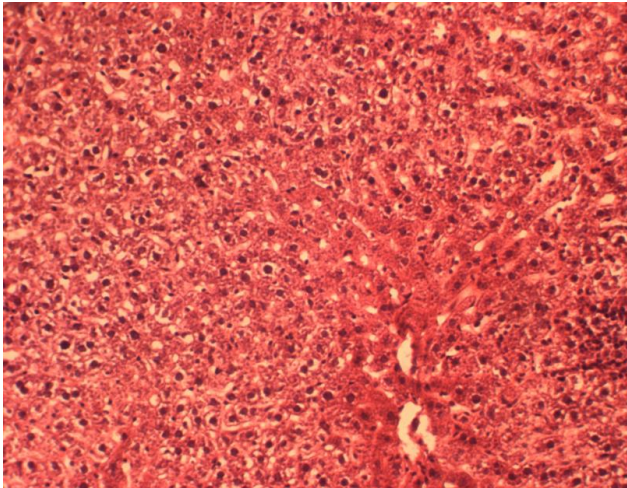


Рис. 2. Гістологічна структура печінки тварин при ішемії-реперфузії. Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 160$.

ліпопероксидації при I/P. Активність ферментів цитолізу АлАТ (на 53,2 та 61,7 %), АсАТ (на 33,6 та 39,8 %) була вірогідно нижчою, ніж за умов ураження (табл. 1). Рівень продуктів ліпопероксидації у печінці знижувався порівняно з I/P (ГПЛ – на 19,1 та 24,0 %; ТБК – на 29,3 та 27,2 % відповідно). Рівень GSH зростав на 35,9 та 40,6 %. Активність антиоксидантних ферментів: підвищувалися КАТ на 38,5 і 32,7 % та СОД на 66,0 і 49,6 %. Рівень NO_2^- зростав, відповідно, в 3,7 та 3,8 раза, а NO_3^- – на 31,7 та 31,8 % за введення LA та L-A L-Г впродовж 3 днів перед моделюванням I/P (табл. 1).

Рівень IL-1 β , IL-6 та TNF- α знижувався на 38,9; 29,0; 33,9 % та 36,3; 21,5; 25,0 % відповідно при введенні обох коригувальних чинників (рис. 3). Наші дослідження узгоджуються з результатами інших науковців, які встановили вірогідне зниження кількості прозапальних цитокінів при введенні

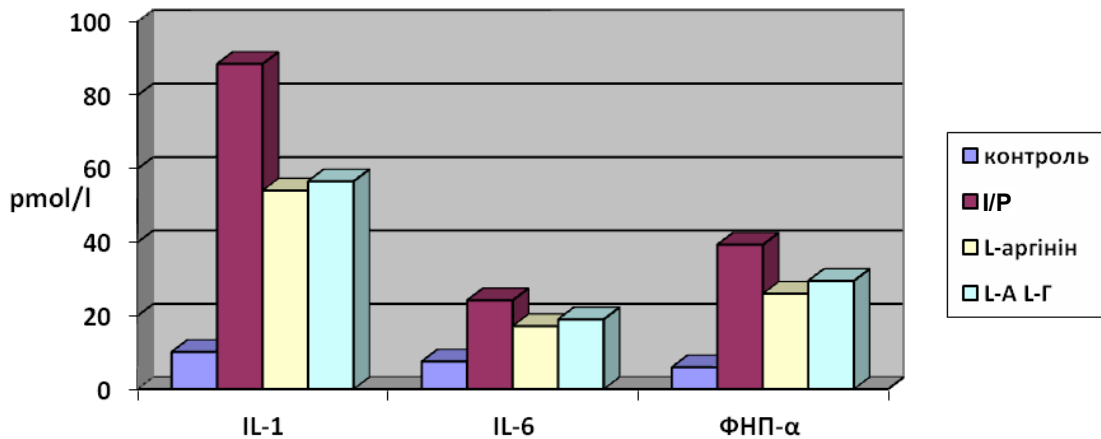


Рис. 3. Вміст прозапальних цитокінів у сироватці крові.

донаторів NO [22]. Результати наших досліджень також показали, що LA та L-A L-Г приводять до зростання експресії eNOS в гепатоцитах при I/P на 43,5 та 42,0 % та зниження iNOS на 19,2 та 15,0 % відповідно (рис. 1).

При гістологічному дослідженні тканини печінки тварин, яким попередньо впродовж 3 днів вводили L-аргінін та моделювали ішемію-реперфузію, нами виявлено (рис. 4), що трабекулярна структура печінкової часточки була збереженою. Центральні вени були розширеними, добре візуалізувалися, просвіти даних структур не містили еритроцитів. Макрофагальна активність не проявлялась.

Судини портальних трактів не зазнавали значних структурних змін, в перипортальних зонах мала місце незначна лімфо-гістіоцитарна інфільтрація, особливо навколо жовчних проток, проте ознак холестазу не виявлено.

При світлооптичному дослідженні центролобулярні гепатоцити були звичайної форми, містили чітко виражені ядра, цитоплазма насиченого кольо-

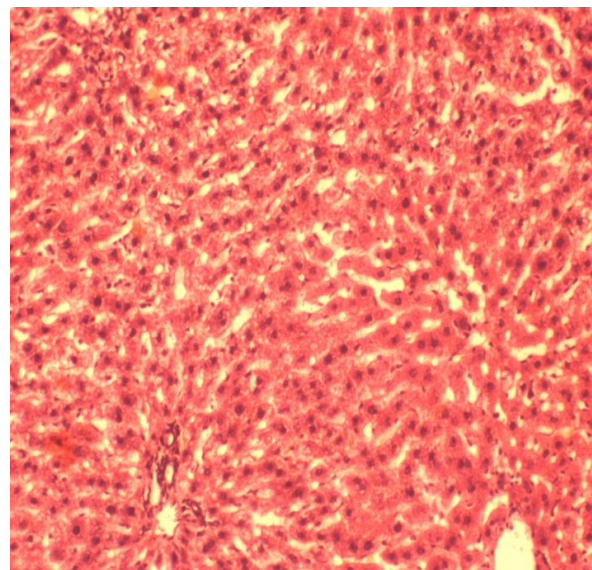


Рис. 4. Гістологічна структура печінки тварин при ішемії та застосуванні L-аргініну. Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 160$.

ру. Гепатоцити середньої третини печінкової часточки представлені крупними клітинами з блідо-еозинофільною дрібнозернистою цитоплазмою, яка була відділена від оболонки клітини світлим обідком. Клітини периферичної частини печінкової часточки мали ознаки незначно вираженої гіаліново-краплинної дистрофії.

При гістологічному дослідженні тканини печінки тварин при моделюванні ішемії та застосуванні глутаргіну ми виявили (рис. 5), що трабекулярна структура печінкової часточки була збережена. Центральні вени дещо розширені і містили поодинокі еритроцити. Синусоїди також були дещо розширені, однак вільними від еритроцитів, макрофагальна активність слабовиражена. Портальні тракти трохи розширювались за рахунок лімфо-гістіоцитарної інфільтрації та збільшення просвіту жовчних проток (без ознак внутрішньопечінкового холестазу). В окремих ділянках зустрічались лімфо-гістіоцитарні інфільтрати навколо жовчних проток.

Гепатоцити централобулярних зон мали звичайну форму, їх цитоплазма була однорідною, інтенсивного забарвлення, ядра правильної форми, гіперхромні. Клітини центральної частини печінкової часточки мали ознаки слабовираженої білкової дистрофії, структура ядер майже не змінювалась, ділянок некрозу не спостерігали.

Структура печінки зазнавала мінімальних змін при профілактичному перед І/Р введенні донаторів оксиду азоту L-аргініну та L-A L-Г, які проявлялися лише слабовираженою білковою дистрофією клітин середньої третини часточки.

Таким чином, при профілактичному перед І/Р введенні донаторів оксиду азоту структура печінки зазнавала мінімальних змін, які проявлялися лише слабовираженою білковою дистрофією клітин середньої третини часточки, що свідчить про органо-протекторний ефект оксиду азоту при І/Р.

Висновки. 1. Ішемія-реперфузія печінки супроводжується активацією процесів цитолізу та ліпопероксидації в печінці, зростанням концентрації прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-6 та TNF- α

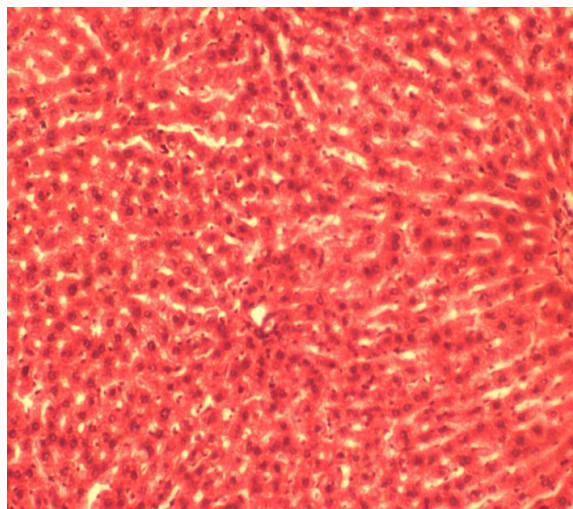


Рис. 5. Гістологічна структура печінки тварин при ішемії-реперфузії та застосуванні L-аргініну L-глутамату. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 160$.

в сироватці крові, зниженням експресії eNOS та зростанням iNOS у печінці, порушенням структурної організації печінкової часточки.

2. Попередники синтезу оксиду азоту L-аргінін та L-аргініну L-глутамат при їх профілактичному введенні перед ішемією-реперфузією печінки сприяють пригніченню процесів цитолізу, нормалізації системи прооксиданти-антиоксиданти, зниженню активності iNOS та зростання eNOS в печінці, зменшенню рівня прозапальних цитокінів у сироватці крові.

3. Прекурсори оксиду азоту мають протективний характерний вплив на морфологічну структуру гепатоцитів та структурно-функціональну організацію печінкової часточки.

Перспективи подальших досліджень. Встановлення ролі системи L-аргінін – оксид азоту в патогенезі ішемічно-реперфузійного ураження обґрунтовує необхідність подальшого пошуку та вивчення сполук – попередників синтезу оксиду азоту, здатних зменшувати прояви функціональних порушень печінки, а також поліпшувати результати фармакотерапії даного патологічного стану.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Bahde H. Hepatic ischemia-reperfusion injury from bench to bedside / H. Bahde, H. U. Spiegel // *Bri. J. Surg.* – 2010. – Vol. 97. – P. 1461–1475.
2. Protective strategies against ischemic injury of the liver / N. Selzner, H. Rudiger, R. Graf, P. Clavien // *Gastroenterol.* – 2003. – Vol. 125. – P. 917–936.
3. Посохова К. А. Ефективність L-аргініну при ішемічно-реперфузійному пошкодженні печінки в експерименті / К. А. Посохова, Л. Й. Плосканич, О. М. Олещук // *Буковинський медичний вісник.* – 2004. – Т. 8, №1. – С. 138–141.

4. Beneficial effects of FK409, a novel nitric oxide donor on reperfusion injury of rat liver / H. Ohmori, D. Dhar, Y. Nakashima [et al.]. // *Transplantation.* – 1998. – V. 66 – P. 579–585.
5. Ischemia and reperfusion of liver induces eNOS and iNOS Expression: Effects of NO donor and NOS inhibitor / H. I. Lin, D. Wang, F.-J. Leu [et al.] // *Chinese J. of Physiol.* – 2004. – Vol. 47(3). – P. 121–127.
6. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasburg. – 1986. – N123. – 52p.

7. Експериментальне вивчення жовчогінної, холеспазмолітичної, холелітазної та гепатопротекторної активності нових лікарських засобів / С. М. Дроговоз, Ю. І. Губський, М. П. Скакун [та ін.] // Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рекомендації за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – С. 334–351.
8. 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. – Vol. 15. – P. 507–514.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Гаврилов В. Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В. Б. Гаврилов, М. И. Мишкорудная // *Лаб. дело*. – 1983. – № 3. – С. 33–35.
13. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – № 82. – P. 70–77.
14. Метод определения активности каталазы / М. А. Королук, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // *Лаб. дело*. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
15. 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.
16. 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.
17. Ярошенко И. Ф. Патогенез ишемии-реперфузии : обзор литературы / И. Ф. Ярошенко, Т. Ю. Каланчина // *Бюл. Волгоградского науч. центра РАМН*. – 2006. – № 1. – С. 29–34.
18. 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. – Vol. 36. – P. 1959–1961.
19. Role of nitric oxide in liver ischemia and reperfusion injury / N. Ian Hines, Shigeyuki Kawachi, Hirohisa Harada [et al.] // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2002. – Vol. 234/235 – P. 229–237.
20. 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.
21. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat / B. Pannen, F. Al-Adili, M. Bauer [et al.] // *Hepatology*. – 1998. – N 27. – P. 755–764.
22. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury / L. Phillips, F. Lopez-Neblina, L. H. Toledo-Pereyra [et al.] // *J. of Investig. Surgery*. – 2009. – Vol. 22. – P. 46–55.

Отримано 15.08.12