

УДК 616.36-099:546.264-092.9

© О.М. Олещук, Т.В. Дацко, Я.Я. Боднар, М.Я. Фурдела

Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського

**ЗМІНИ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ПЕЧІНКИ НА ФОНІ ВВЕДЕННЯ L-АРГІНІНУ ТА N-НІТРО-L-АРГІНІНУ ПРИ ІШЕМІ -РЕПЕРФУЗІ**

ЗМІНИ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ПЕЧІНКИ НА ФОНІ ВВЕДЕННЯ L-АРГІНІНУ ТА N-НІТРО-L-АРГІНІНУ ПРИ ІШЕМІ - РЕПЕРФУЗІ – Досліджували вплив попередника синтезу оксиду азоту L-аргініну та неселективного блокатора NOS N-нітро-L-аргініну (L-NAME) на морфологічну структуру печінки при експериментальній ішемії-реперфузії. Встановлено, що введення попередників синтезу оксиду азоту частково нівелює порушення кровообігу та розвиток дистрофічно-некротичних змін, що виникають при ішемічно-реперфузійному пошкодженні органа. Блокування синтезу NO веде до погіршення морфофункціонального стану печінки при ішемії-реперфузії. В ураженому органі нарастають дистрофічно-некротичні зміни, формуються вогнищеві некрози.

ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ L-АРГИНИНА И N-НИТРО-L-АРГИНИНА ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ – Исследовали влияние предшественника синтеза оксида азота L-аргинина и неселективного блокатора NOS N-нитро-L-аргинина (L-NAME) на морфологическую структуру печени при экспериментальной ишемии-реперфузии. Установлено, что введение предшественника синтеза NO частично нивелирует нарушение кровообращения и развитие дистрофически-некротических изменений, возникающих при ишемически-реперфузионном повреждении органа. Блокирование синтеза NO ведёт к ухудшению морфофункционального состояния печени при ишемии-реперфузии. В поражённом органе нарастают дистрофически-некротические изменения, формируются очаговые некрозы.

CHANGES IN MORPHO-FUNCTIONAL STATE OF LIVER IN CASE OF L-ARGININE AND N-NITRO-L-ARGININE INTRODUCTION AT ISCHEMIA-REPERFUSION – The effect of nitric oxide synthesis precursor L-arginine and non-selective NOS blocker N-nitro-L-arginine (L-NAME) on morphology structure of the liver in experimental ischemia-reperfusion has been studied. The introduction of nitric oxide synthesis precursor partly eliminates the injury and dystrophic-necrotic changes that occur at ischemic-reperfusion organ damage. Blocking of NO synthesis leads to deterioration of morpho-functional state of liver at ischemia-reperfusion. Growing dystrophic-necrotic changes, focal necroses are formed in damaged organ.

**Ключові слова:** L-аргінін, N-нітро-L-аргінін, ішемія, реперфузія, некрози.

**Ключевые слова:** L-аргинин, N-нитро-L-аргинин, ишемия, реперфузия, некрозы.

**Key words:** L-arginine, N-nitro-L-arginine, ischemia, reperfusion, necroses.

**ВСТУП** У практиці лікування тяжких уражень печінки все ширше використовують трансплантацію печінки [1, 2], і часткова резекція печінки, при яких можливе тимчасове перетискання гепатодуоденально зв'язки з наявними в ній кровонесними судинами [3]. Порушення кровопостачання печінки спостерігається також при шоках різної етіології, у тому числі геморагічному, опіковому та ін. [4]. В усіх цих випадках відбувається ішемізація тканини печінки різної тривалості. Через різні інтервали часу кровопостачання печінки відновлюється за рахунок реперфузії. Проте ішемія-реперфузія (ІР) призводить до таких тяжких усклад-

нень як: відторгнення трансплантата, поява запальних проявів і навіть некротичного ураження гепатоцитів, що зрештою і вирішує долю ураженого органа. Патогенез ураження при ІР печінки є мультифакторним процесом [5]. Порушення мікроциркуляції є головною мішенню в ураженні печінки при ІР. Наслідком порушення мікроциркуляції є патологія паренхіми печінки, недостатність мікроциркуляторної перфузії призводить до no-reflow і пов'язано з реперфузією запальною реакцією, яка включає активацію і дисфункцію лейкоцитів і клітин Купфера (парадокс реперфузії). No-reflow в синусоїдах зумовлений набряком ендотеліальних клітин і внутрішньосудинним стазом, а також погіршення балансу між ендотеліном і NO. Парадокс реперфузії зв'язаний: 1) із звільненням і дією прозапальних цитокінів (TNF- $\alpha$ , ІЛ-1) і кисневими радикалами; 2) збільшенням регуляції ендотеліальних і лейкоцитарних молекул адгезії; 3) взаємодією лейкоцитів з ендотелієм в мікросудинах печінки. Безумовно, порушення мікроциркуляції пов'язане із змінами в системі гемокоагуляції [6].

Як вже зазначалося, важливу роль у розвитку мікроциркуляторних порушень при ІР печінки відіграє оксид азоту, тому метою наших досліджень стало вивчення змін морфологічної структури печінки при профілактичному введенні попередника синтезу NO-L-arginine та блокатора NO-синтази N-нітро-L-аргініну (L-NAME).

**МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** В експерименті було використано 36 білих щурів-самців лінії Вістар масою від 220-300 г. Тварини перебували у віварі з контрольованим температурним режимом, на стандартному раціоні з вільним доступом до їжі та води і 12-годинним циклом день-ніч. Роботу з тваринами виконували згідно з Європейською конвенцією про гуманне ставлення до лабораторних тварин [7].

Тварин знеболювали тіопенталом-натрієм (50 мг/кг маси тіла інтраперитонеально), хірургічне моделювання ІР проводили з дотриманням правил асептики. Проводили серединну лапаротомію, відділяли печінку від діафрагми, виділяли орган. Ішемію медіально та ліво латерально частки печінки проводили шляхом перетискання судинного пучка, що містить порталну вену і гілки печінкової артерії, використовуючи атравматичний капілярний затискач [8]. Інші частки печінки не включали в експеримент. Дана модель спричиняє розвиток ішемії лише ліво і серединних часток печінки (~70 % печінки), залишаючи кровопостачання правої та хвостової часток непошкодженими [9]. У кінці періоду ішемії судинний затискач було знято і відновлювалась реперфузія. Операційне поле покривали стерильною салфеткою, змоченою у фізіологічному розчині.

Тварин рандомізували на 4 групи по 6 тварин: І група – контрольна (несправжньооперовані тварини); ІІ група – ІР (ішемія серединно та ліво латерально

частки печінки на 45 хв, за якою слідував 2 годинний період реперфузі при кімнатній температурі); III група – L-arginine + IP (L-arginine [25 мг/кг] і.п., повторно 3 дні, останній раз за 10 хв до IP); IV група – N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ефір (L-NAME)+IP (10 мг/кг і.п., повторно 3 дні, останній раз за 10 хв до IP). У кінці експерименту збирали зразки печінкової тканини для гістологічного дослідження. Шматочки органа фіксували у 10 % розчині формаліну і ущільнювали парафіном. Гістологічно оцінювали загальну картину структур печінки.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА Х ОБГОВОРЕННЯ** При гістологічному дослідженні тканини печінки у тварин, у яких моделювали ішемію-реперфузію, виявлено, що структура печінкової часточки була збереженою частково (рис. 1). Центральні вени були помірно розширені, містили невелику кількість еритроцитів. Синусоїди контурувались слабо. Дистрофічні зміни в гепатоцитах проявлялися у дифузній формі, поширюючись на всю часточку. Гідропічна дистрофія, яка трансформувалась у балонну, переважала у центролобулярно розміщених гепатоцитах.



Рис. 1. Гістологічна структура печінки тварин при ішемії та реперфузії. Забарвлення гематоксилином та еозином, х160.

Ядра клітин пікнотично зморщувались. Поряд із пошкодженими гепатоцитами простежували клітини із вираженим набуханням ядер, в яких спостерігалися великі ядерця, що можна розцінювати як прояв репарації. Портальні тракти містили помірно розширені судини із дифузною лімфо-гістіоцитарною інфільтрацією.

При гістологічному дослідженні тканини печінки тварин на фоні попереднього введення препарату L-аргініну та послідовному моделюванні ішемії-реперфузії ми виявили (рис. 2), що трабекулярна структура печінкової частки була збереженою.

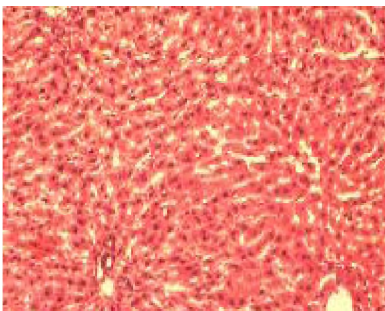


Рис. 2. Гістологічна структура печінки тварин при ішемії та застосуванні L-аргініну. Забарвлення гематоксилином та еозином, х160.

При світлооптичному дослідженні центральні вени та синусоїди були розширеними, проте були відсутні прояви стазу. Синусоїди були також дещо розширеними і вільними від еритроцитів. Макрофагальна активність не проявлялась. Жовчні протоки портальних трактів розширені, проте без ознак холестазу.

Гістологічно центролобулярні гепатоцити були з блідо-еозинофільною дрібнозернистою цитоплазмою, яка була відділена від оболонки клітини світлою облямівкою. Клітини периферичної частини печінкової частки – з ознаками незначно вираженої гіаліново-краплино дистрофії.

При гістологічному дослідженні тканини печінки при застосуванні L-NAME та моделюванні ішемії-реперфузії виявлено (рис. 3), що трабекулярна структура печінкової часточки була збереженою лише частково.

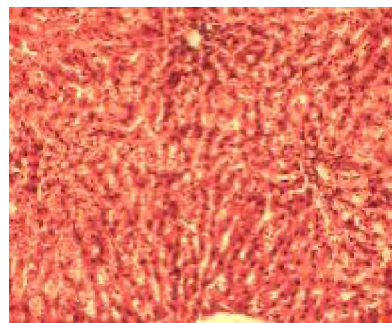


Рис. 3. Гістологічна структура печінки тварин при ішемії та застосуванні L-NAME. Забарвлення гематоксилином та еозином, х160.

Просвіти центральних вен та синусоїдів були значно розширеними, вільними від еритроцитів у центролобулярних ділянках. Навпаки, в периферичних ділянках просвіти синусоїдів були насичені клітинними макрофагами та звуженими, а за часом відмічається збільшення кількості клітин Купфера. Портальні тракти були дещо розширеними, із осередковою лімфо-гістіоцитарною інфільтрацією навколо жовчних проток. Гепатоцити були збереженими лише в центролобулярних ділянках печінкової часточки. Цитоплазма перипортальних клітин була із гіаліново-краплинною зернистістю зі зміщеними ядрами на периферію, які у більшості клітин були пікнотично змінені.

Проведене дослідження підтверджує, що однією із можливих причин розвитку морфофункціональних змін у печінці при ішемічно-реперфузійному пошкодженні є недостатня біодоступність оксиду азоту у печінці. Зниження кількості активного NO веде до розвитку стазу в синусоїдах та розвитку конструкції та порушення перфузії в синусоїдах [10]. Разом з тим специфічний механізм недостатньо функціональної активності оксиду азоту за умов IP залишається недостатньо розкритим. Деякі дослідники морфологічні зміни у печінці пов'язують із дефіцитом ко-факторів біодоступності NO, інші висувують версію про надмірну активність інгібіторів NOS, таких, як наприклад, аргіназа або асиметричний диметиларгініну [11]. Очевидно, що активна продукція NO на ранній стадії реперфузії покликана виконувати роль захисту від ішемії.

**ВИСНОВКИ** 1. Оксид азоту відіграє протекторну роль на ранній стадії реперфузії при ішемічно-реперфузійному ураженні печінки.

2. Уведення попередників синтезу оксиду азоту частково нівелює розвиток розладів кровообігу та дистрофічно-некротичних змін печінки при ішемічно-реперфузійному синдромі.

3. Блокатори синтезу оксиду азоту сприяють погіршенню морфофункціонального стану печінки при ішемічній реперфузії, наростанню дистрофічно-некротичних змін із формуванням вогнищевих некрозів.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Трансплантація печінки від живого родинного донора в Україні / В.Ф. Саєнко, О.Г. Котенко, О.О. Попов та ін. // Клін. хірургія. – 2007. – № 2–3. – С. 59.
2. Living donor liver transplantation for a patient with renal failure / H. Ijichi, M. Shimada, T. Suehiro et al. // Fukuoka Igaku Zasshi – Fukuoka Acta Medica. – 2002. – Vol. 93, № 12. – P. 266–271.
3. Henderson J.M. Liver transplantation and rejection: an overview. *Hepatology* – 1999. – Vol.46 (Suppl 2). – P. 1482–1484.
4. Neutrophil recruitment in the reperfused-injured rat liver was effectively attenuated by repertaxin, a novel allosteric noncompetitive inhibitor of CXCL8 receptors: a therapeutic approach for the treatment of post-ischemic hepatic syndromes / B. Cavalieri, M. Mosca, P. Ramadori et al. // *Int J Immunopathol Pharmacol.* – 2005. – Vol. 18. – P. 475–486.
5. Fondevila C., Busuttil R.W., Kupiec-Weglinski J.W. Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look // *Exp. Mol. Pathol.* – 2003. – Vol.74 – P. 86–93.
6. Effect of ischemia-reperfusion injury on the microcirculation of the steatotic liver of the Zucker rat / Sun C.K., Zhang X.Y., Zimmermann A., Davis G., Wheatley A.M. // *Transplantation.* – 2001. – № 72(10). – P. 1625–1631.
7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasbourg. – 1986. – № 123. – 52 p.
8. Експериментальне вивчення жовчогінно, холеспазмолітично, холелітіазно та гепатопротекторно 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.
9. Koo A. et al. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. / Koo A., Komatsu H., Tao G. et al. // *Hepatology.* – 1992. – Vol.15. – P. 507–514.
10. Pannen B., Al-Adili F., Bauer M. et al. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat // *Hepatology.* – 1998. – Vol. 27. – P. 755–764.
11. Shah V., Kamath P.S. Nitric oxide in Liver transplantation: Pathobiology and Clinical Implications // *Liver transplantation.* – 2003. – Vol. 9, № 1. – P. 1–11.

Отримано 25.10.10