

УДК 547.495.9+546.172.6

МЕТОДИКА ИЗУЧЕНИЯ РОЛИ ОКСИДА АЗОТА В РАЗВИТИИ ПОСТИШЕМИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЕЧЕНИ

М.Н. ХОДОСОВСКИЙ

Кафедра патологической физиологии

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Описывается методика исследования роли оксида азота в механизмах развития постишемических (реперфузионных) повреждений печени у кроликов. Анализируются экспериментальные данные, полученные при изучении механизма протективного влияния L-аргинина при реперфузии печени. Рассматриваются методические и патофизиологические аспекты моделирования постишемических повреждений печени у кроликов, а также способ оценки роли оксида азота при данной патологии.

Ключевые слова: печень, ишемия, реперфузия, L-аргинин, оксид азота.

Methods of investigation of nitric oxide role in mechanisms of development of hepatic postischemic (reperfusion) injury in rabbits is described. Experimental data concerning the mechanism of L-arginine protective effect in hepatic reperfusion are analyzed. The methodological and pathophysiological aspects of postischemic liver injury modeling in rabbits as well as the way of estimating of nitric oxide role in this pathology are considered.

Key words: liver, ischemia, reperfusion, L-arginine, nitric oxide.

В развитии постишемических (реперфузионных) повреждений печени большое значение отводят нарушениям микроциркуляции [8, 12]. Известно, что в организме L-аргинин является субстратом для синтеза оксида азота (NO) – известного вазодилататора [13]. Установлено, что инфузия L-аргинина перед началом реперфузионного периода улучшает прооксидантно-антиоксидантное и функциональное состояния печени у кроликов [4, 17]. При этом механизм протективного влияния данной аминокислоты на печень изучен недостаточно. Защитное действие L-аргинина может быть обусловлено взаимодействием NO с генерируемыми при реперфузии активными формами кислорода (АФК), главным эффектом которого является устранение этих радикалов [5]. NO в данном случае может выступать как эндогенный гаситель свободных радикалов, в его присутствии цитотоксичность супероксид-анион радикала ($O_2^{\cdot-}$) и перекиси водорода (H_2O_2) заметно уменьшается [18]. С другой стороны, непосредственно L-аргинин, обладая антиоксидантными свойствами, может предупреждать истощение антиоксидантного потенциала организма, что оказывает стабилизирующий эффект на мембраны, ограничивая проникновение АФК в глубь гидрофобного слоя [3].

Цель исследования – разработать методику оценки роли оксида азота в развитии постишемических повреждений печени.

Методика исследования

Моделирование постишемических повреждений печени у кроликов. Была разработана модель для изучения ишемии-реперфузии печени, где за основу положена временная окклюзия *a. hepatica propria* у кроликов (рац. предложение

Ходосовского М.Н. № 1362 от 12.12.2000 г.), которая реализовывалась следующим образом:

Для исследования использовали взрослых кроликов-самцов весом 3,5-4,5 кг, предварительно выдержанных в стандартных условиях вивария. Под комбинированным внутривенным наркозом (реланиум 1,5 мг/кг; гексенал 30 мг/кг; калипсол 1,5 мг/кг/мин) вводили полиэтиленовые катетеры: первый – в *v. hepaticae* для забора печеночной венозной крови, второй – в правое предсердие для получения смешанной венозной крови 1. После срединной лапаротомии и гемостаза контролировали положение катетера в печеночных венах, и ниже места впадения последних в полую вену накладывали лигатуру, которой на время забора печеночной венозной крови пережимали полую вену для предупреждения смешивания исследуемой фракции с кровью из поллой вены. Затем вызывали ишемию печени путем наложения сосудистого зажима на *a. hepatica propria* в течение 30 минут [7, 17]. Реперфузионный период длился 120 минут. Забор образцов крови осуществляли до и в конце ишемии, а также через 30 и 120 мин после её прекращения. Оперативные вмешательства осуществляли в условиях адекватной анальгезии в соответствии с этическими нормами, принятыми Гродненским государственным медицинским университетом.

Степень тяжести постишемических повреждений печени оценивали по изменению активности аланин- и аспартатаминотрансфераз (АлАТ, АсАТ) в плазме венозной крови, стабилизированной гепарином, по Reitman S. et al. [15] на протяжении экспериментов.

Модификация способа модуляции L-аргинин-NO системы для изучения роли оксида

азота в развитии постишемических повреждений печени. Известно, что для модуляции L-аргинин-NO системы при ишемии-реперфузии у экспериментальных животных используются дозы ингибитора NO-синтазы (L-NAME) от 3 до 50 мг/кг при внутривенной инфузии [9, 10, 11, 14]. Для изучения роли NO в развитии постишемических повреждений печени модифицирован способ Liu P. et al. (2000). Согласно данному способу модуляция NO-синтазной функции организма достигается путем внутривенной инфузии L-NAME в дозе 10 мг/кг за 10 мин до начала реперфузионного периода. Модификация способа заключается в дополнительном внутривенном введении L-аргинина (300 мг/кг) за 5 минут до начала реперфузии (n=8). Данная доза L-аргинина использовалась нами ранее и оказывала протективное влияние на печень при ишемии-реперфузии [4].

Определение суммарного количества нитритов и нитратов (NOx) в плазме крови проводили с помощью реактива Грисса [16]. Первоначально белки пробы осаждали 30% ZnSO₄. После центрифугирования супернатант инкубировали в течение 12 часов с металлическим кадмием для восстановления нитратов в нитриты. Затем добавляли реактив Грисса и спектрофотометрически определяли суммарную концентрацию нитритов в пробе, которую выражали в мкмоль/л плазмы.

Оценка прооксидантно-антиоксидантного состояния. Изучались следующие параметры прооксидантно-антиоксидантного состояния: диеновые конъюгаты (ДК), малоновый диальдегид (МДА) и активность каталазы. Содержание ДК в биологическом материале определяли методом ультрафиолетовой спектрофотометрии при длине волны 233 нм, типичной для конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов [1]. Для исследования уровня МДА применялся метод Yagi K. [19] в модификации Ishihara Y. [6]. Каталазная активность в биологическом материале оценивалась спектрофотометрическим методом, основанном на способности H₂O₂ образовывать с солями молибдена стойко окрашенный комплекс, на спектрофотометре СФ-46 «ЛОМО» [2].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что при введении ингибитора NO-синтазной функции и L-аргинина в условиях ишемии-реперфузии печени у кроликов в крови наблюдается увеличение содержания продуктов перекисного окисления липидов (ДК, МДА) (табл. 1). Так, в плазме и эритроцитах печеночной венозной крови в конце постишемического периода уровень ДК превышал исходный на 65% (p<0,05) и 66,9 % (p<0,05) соответственно. Содержание МДА в плазме и эритроцитах печеночной венозной крови в конце реперфузии возросло на 51,1 % (p<0,05) и 44,8 % (p<0,05) соответственно. Схожее измене-

Таблица 1. Влияние совместной инфузии L-аргинина и метилового эфира Nω-нитро-L-аргинина на прооксидантно-антиоксидантное состояние, активность АлАТ и АсАТ, а также суммарный уровень нитрит/нитратов печеночной венозной крови при ишемии-реперфузии печени у кроликов (M±m).

Показатель	Исходное значение	30 минут ишемии	Реперфузионный период	
			30 минут	120 минут
n	8	8	8	8
ДК _{пл.} , ΔD ₂₃₃ /мл	0,51 ± 0,04	0,7 ± 0,08*	0,66 ± 0,07	0,84 ± 0,08*
ДК _{эр.} , ΔD ₂₃₃ /мл	5,25 ± 0,46	7,74 ± 0,77*	6,99 ± 0,87	8,76 ± 1,21*
МДА _{пл.} , мкмоль/мл	2,05 ± 0,22	2,34 ± 0,28	3,0 ± 0,25*	3,1 ± 0,38*
МДА _{эр.} , мкмоль/мл	6,96 ± 0,84	7,82 ± 0,6	9,94 ± 0,69*	10,08 ± 0,59*
Кат. _{эр.} ммоль H ₂ O ₂ /сек*гHb	2,01 ± 0,18	2,72 ± 0,21	3,3 ± 0,21*	3,62 ± 0,19*
АлАТ мкмоль/мин*л	4,56 ± 0,27	5,09 ± 0,22	6,04 ± 0,31*	8,69 ± 0,59*
АсАТ мкмоль/мин*л	3,5 ± 0,26	3,92 ± 0,21	5,43 ± 0,27*	6,14 ± 0,39*
NOx _{пл.} мкмоль/л	4,42 ± 0,57	5,07 ± 0,83	5,31 ± 0,55	5,42 ± 0,6

Примечание: пл – плазма, эр – эритроциты, * – достоверные изменения по отношению к исходному значению (p<0,05).

Таблица 2. Влияние совместной инфузии L-аргинина и метилового эфира Nω-нитро-L-аргинина на прооксидантно-антиоксидантное состояние, активность АлАТ и АсАТ, а также суммарный уровень нитрит/нитратов смешанной венозной крови при ишемии-реперфузии печени у кроликов (M±m).

Показатель	Исходное значение	30 минут ишемии	Реперфузионный период	
			30 минут	120 минут
n	8	8	8	8
ДК _{пл.} , ΔD ₂₃₃ /мл	0,64 ± 0,06	1,2 ± 0,14*	0,93 ± 0,1*	1,18 ± 0,17*
ДК _{эр.} , ΔD ₂₃₃ /мл	5,54 ± 0,65	7,76 ± 0,81*	6,57 ± 0,8	8,45 ± 0,88*
МДА _{пл.} , мкмоль/мл	2,4 ± 0,2	2,62 ± 0,23	3,14 ± 0,29*	3,47 ± 0,18*
МДА _{эр.} , мкмоль/мл	6,58 ± 0,75	7,87 ± 0,98	9,98 ± 0,71*	9,89 ± 0,7*
Кат. _{эр.} ммоль H ₂ O ₂ /сек*гHb	2,13 ± 0,21	2,74 ± 0,28	3,21 ± 0,18*	3,81 ± 0,31*
АлАТ мкмоль/мин*л	4,58 ± 0,25	4,83 ± 0,16	6,74 ± 0,35*	8,57 ± 0,7*
АсАТ мкмоль/мин*л	3,77 ± 0,47	4,65 ± 0,32	6,15 ± 0,27*	7,16 ± 0,61*
NOx _{??} мкмоль/л	4,26 ± 0,69	5,1 ± 1,03	5,85 ± 0,73	5,02 ± 0,52

Примечание: пл – плазма, эр – эритроциты, * – достоверные изменения по отношению к исходному значению (p<0,05).

ние данных показателей ПОЛ наблюдалось и в смешанной венозной крови (табл. 2). Так, содержание ДК и МДА в плазме смешанной венозной крови в конце реперфузии превышало исходное на 85,8 % (p<0,05) и 44,7 % (p<0,05).

Одновременно в эритроцитах крови наблюдалось повышение активности каталазы к концу реперфузионного периода (см. табл. 1 и 2), что может косвенно указывать на накопление эндогенной H₂O₂. Так в печеночной венозной крови на 120-й мин реперфузии активность каталазы эритроцитов увеличилась на 79,9 % (p<0,05), а в эритроцитах смешанной венозной крови – на 78,9 % (p<0,05). Содержание NOx на протяжении экспериментов при этом достоверно не изменялось. Активность АлАТ в плазме печеночной и смешанной венозной крови в конце постишемического периода возрастала на 90,5% (p<0,05), и 87 % (p<0,05) соответ-

ственно. Активность АсАТ в этих образцах в конце реперфузии также возрастала (см. табл. 1 и 2), что свидетельствовало о тяжелых нарушениях функционального состояния печени.

Проведенные исследования показали, что в условиях ингибирования NO-синтазной функции организма протективный эффект L-аргинина при ишемии-реперфузии печени у кроликов выражен слабее (судя по показателям прооксидантно-антиоксидантного баланса, активности аланин- и аспаратаминотрансфераз в крови), чем в условиях использования этой аминокислоты отдельно [9]. Защитный эффект L-аргинина, по-видимому, не мог реализоваться вследствие ингибирования синтеза NO в постишемическом периоде. Суммарное количество нитритов/нитратов существенно не изменялось на протяжении экспериментов. Полученные данные указывают на важную протективную роль оксида азота при данной патологии и делают перспективным использование донаторов оксида азота для коррекции постишемических повреждений печени. Данная методика оценки роли оксида азота в развитии постишемических повреждений печени может применяться и при другой патологии, существенным звеном которой являются микроциркуляторные расстройства и дисбаланс между вазоконстрикторным и вазодилаторным звеньями регуляции сосудистого тонуса.

Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (договор № Б04М-180).

Литература:

1. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара А.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов // Лаб. дело.- 1988.- № 2.- С. 60-64.
2. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Измерение активности каталазы в биологических средах // Лаб. дело.- 1988.- № 1.- С. 16-19.
3. Львова С.П., Горбунова Т.Ф., Абаева Е.М. Влияние гипотермии и даларгина на перекисное окисление липидов в тканях крыс // Вопр. мед. химии.- 1993.- №3.- С. 21-24.
4. Ходосовский М.Н., Зинчук В.В. Участие L-аргинин-NO системы в развитии реперфузионных повреждений печени // Эксперим. и клиническая фармакол.- 2003.- Т.66, №3.- С.39-43.
5. Gaboury J., Woodman R.C., Granger D.N. et al. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide // Am. J. Physiol.- 1993.- Vol. 265, № 3.- P. H862-H867.
6. Ishihara Y. Serum lipids in diabetics (author's transl) // Sangyo Igaku.- 1978.- Vol. 20, N 6.- P. 376-377.
7. Kohli V., Selzner M., Madden J.F. et al. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver // Transplantation.- 1999.- Vol. 67, № 8.- P. 1099-1105.
8. Kubes P., Payne D., Woodman R.C. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in postischemic liver microcirculation // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.- 2002.- Vol. 283, № 1.- P. G139-G147.
9. Liu P., Xu B., Quilley J., Wong P.Y. Peroxynitrite attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury // Am. J. Physiol. Cell. Physiol.- 2000.- Vol. 279, № 6.- P. C1970-C1977.
10. Li S.Q., Liang L.J. Protective mechanism of L-arginine against liver ischemic-reperfusion injury in rats// Hepatobiliary Pancreat Dis Int. - 2003.- Vol. 2, N 4.- P. 549-552.
11. Matsumoto M., Iida Y., Wakamatsu H., et al. The effects of N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester on neurologic and histopathologic outcome after transient spinal cord ischemia in rabbits. // Anesth. Analg. - 1999.- Vol.89, N 3.- P.696-702.
12. Menger M.D., Richter S., Yamauchi J., Vollmar B. Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury // Hepatogastroenterology.- 1999.- Vol.46, № 2.- P. 1452-1457.
13. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology and pharmacology // Pharmacol Rev.-1991.- Vol. 44, № 2. - P. 109-142.
14. Ozakyol A.H., Tuncel N., Saricam T., et al. Effect of nitric oxide inhibition on rat liver ischemia reperfusion injury // Pathophysiology.- 2000.- Vol.7, N3.- P. 183-188.
15. Reitman S., Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases // J. Clin. Path.- 1957.- Vol. 28, № 1.- P. 56-63.
16. Schulz K., Kerber S., Kelm M. Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO2- in aqueous and protein-containing samples. Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO2- in aqueous and protein-containing samples // Nitric Oxide. - 1999. - Vol. 3, N 3.- P. 225-234.
17. Uhlmann D., Scommotau S., Witzigmann H., Spiegel H.U. Exogenous L-arginine protects liver microcirculation from ischemia reperfusion injury // Eur. Surg. Res.- 1998.- Vol. 30, № 3.- P. 175-184.
18. Wink D.A., Cook J.A., Pacelli R. et al. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species // Toxicol. Lett.- 1995.- Vol. 82-83. - P. 221-226.
19. Yagi K. Biochemistry of lipid peroxides in disease state // Nippon Rinsho.- 1983. - Vol.41, N8.- P. 1920-1933.

Resume

METHODS OF STUDY OF NITRIC OXIDE ROLE IN DEVELOPMENT OF LIVER POSTISCHEMIC INJURY

M.N. Khodosovsky

The Grodno State Medical University

We analyzed the role of nitric oxide in the mechanism of L-arginine protective effect on the liver during postischemic period. These data suggested the important role of nitric oxide in liver defense during reperfusion. The methods of investigation can be used in many pathophysiological states, when disbalance between vasodilators and vasoconstrictors exists.