

ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ БАЛАНС У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ПРИ ЇЇ ІШЕМІЇ-РЕПЕРFUЗІЇ ЗА ПРИСУТНОСТІ МОДУЛЯТОРІВ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ

Досліджено стан системи прооксиданти–антиоксиданти у печінці при її ішемічно-реперфузійному ураженні на фоні введення попередників та блокаторів синтезу оксиду азоту. Встановлено, що профілактичне введення попередника синтезу оксиду азоту сприяє зменшенню порушень прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу за умов ішемії-реперфузії печінки. Блокування синтезу оксиду азоту, особливо за рахунок інгібування конститутивної NO-синтази, призводить до ще більшої активації процесів ліпопероксидації.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: система прооксиданти–антиоксиданти, ішемічно-реперфузійне ураження, синтез оксиду азоту.

ВСТУП. Феномен оксидативного стресу при відновленні кровотоку після періоду ішемії (“кисневий парадокс”) полягає в тому, що, з одного боку, поява молекулярного кисню необхідна для відновлення нормальної функції органа, а з іншого – саме реоксигенація є критичним фактором у стрімкому розвитку вільнорадикальних процесів у ішемізованих клітинах [19, 23]. При перенесенні електронів у дихальному ланцюзі мітохондрій утворюються активні форми кисню (АФК), серед яких найбільш реакційноздатним є супероксиданіон $O_2^{\cdot-}$ [20]. Відомо, що деякі ферментні системи за критичних умов ішемії також здатні генерувати $O_2^{\cdot-}$, наприклад ксантиноксидаза чи фермент, який каталізує утворення оксиду азоту (NO), NO-синтаза (NOS) [25]. Остання продукує супероксиданіон при роз’єднанні процесів метаболізму NO або при недостатності субстрату аргініну чи кофактора тетрагідробіоптериду [26]. У свою чергу, NO взаємодіє з $O_2^{\cdot-}$ і утворює потужний оксидант – пероксинітрит (NOO[•]), що проявляє виражену цитотоксичну дію. NOO[•] індукує пошкодження ДНК, мутації клітин та інгібує функції багатьох ферментів [3]. Отже, NO може бути чинником порушення рівноваги перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантної системи. З огляду на це, цікавим є вивчення впливу модуляторів синтезу NO на стан прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу при ішемії-реперфузії (IP) печінки.

© О. М. Олещук, 2012.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проведено на 30 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 170–210 г. Маніпуляції з тваринами проводили відповідно до правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Щурів рандомізували на 5 груп по 6 тварин: 1-ша група – контрольна (несправжньооперовані тварини – лапаротомія); 2-га – IP (ішемія середньої та лівої латеральної частки печінки на 45 хв, за якою слідував двогодинний період реперфузії при кімнатній температурі); 3-тя – попередник NO L-arginine (LA)+IP; 4-та – не-селективний блокатор NOS N-nitro-L-arginine (L-NAME)+IP; 5-та – селективний блокатор iNOS та антиоксидант мелатонін (Mel)+IP. LA вводили в дозі 25 мг/кг, а L-NAME та Mel – 10 мг/кг і.п., повторно 3 дні, останній раз за 10 хв до IP.

У сироватці крові визначали вміст кінцевих продуктів метаболізму оксиду азоту NO_2^- та NO_3^- [6, 14], церулоплазміну (ЦП) [7], молекул середньої маси (МСМ) [12]. Про стан системи прооксиданти–антиоксиданти судили за вмістом у гомогенатах печінки ТБК-активних продуктів (ТБК) [1], гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) [4], відновленого глутатіону (GSH) [18], активністю каталази (КАТ) [9], супероксиддисмутази (СОД) [13], сукцинатдегідрогенази (СДГ) [5], цитохромоксидази (ЦХО) [11]. Всі отримані результати було оброблено методом варіаційної статис-

тики з використанням t-критерію Стюдента (Microsoft Excel XP) та методом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) за допомогою програми "Origin 7.5" (OriginLab Corp., USA).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. IP-ураження супроводжувалось активацією процесів ліпопероксидації у печінці, на що вказувало вірогідне зростання концентрації ГПЛ (в 1,72 раза) і ТБК (в 1,7 раза), зменшувалась активність KAT та СОД у гомогенатах печінки (на 36 і 61 % відповідно). Відомо, що виснаження пулу відновленого глутатіону є одним із факторів зниження протекторної функції антиоксидантної системи за умов IP (табл. 1) [17]. Вміст NO_2 у сироватці крові зменшувався на 51,7 %, а вміст NO_3 у крові не змінювався відносно контрольної групи.

Попереднє профілактичне введення впродовж 3 днів LA сприяло нормалізації прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу. Рівень продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) ГПЛ та ТБК у печінці вірогідно знижувався порівняно з групою IP. Рівень GSH зростав у 1,4 раза. Активність антиоксидантних ферментів KAT та СОД підвищувався на 23 і 54 % (табл. 1). В сироватці крові вірогідно знижувався вміст ЦП на 12 % порівняно з групою IP. Вміст NO_2 зростав на 75,2 %, вміст NO_3 у крові був вищим на 28,2 % порівняно з контрольною групою тварин. Відновлення кровотоку після періоду ішемії пов'язане з накопиченням не знешкоджених печінкою токсичних продуктів катаболізму білків, ендо- та екзо-

токсинів – середньомолекулярних пептидів. Зафіксовано збільшення рівня обох фракцій MCM: пептидних (MCM_{254}) до $(0,56 \pm 0,01)$ ум. од. та нуклеотидних (MCM_{280}) до $(0,31 \pm 0,01)$ ум. од. Воно було вірогідним щодо їх рівня в особин контрольної групи – $(0,42 \pm 0,02)$ та $(0,21 \pm 0,01)$ ум. од. відповідно ($p < 0,01$).

Блокування синтезу NO шляхом введення препарату L-NAME, який інгібує як конститутивну (cNOS), так і індукцибельну (iNOS) форми NOS при ішемічно-реперфузійному ураженні печінки, призвело до поглиблення патологічного процесу. Про це свідчили активізація процесів ПОЛ порівняно з групою IP, збільшення вмісту в печінці ТБК і ГПЛ (в 1,3 та 1,2 раза відповідно). Вміст GSH, активність KAT та СОД у гомогенатах печінки вірогідно знижувалися (табл. 1), вміст ЦП у сироватці крові підвищувався (табл. 2), що вказувало на наростання віднорадикального окиснення та виснаження системи антиоксидантного захисту при пригніченні активності NOS. Рівень нітрит- та нітрат-аніона в сироватці крові при введенні блокатора синтезу NO збільшувався на 45 та 13 % порівняно з групою IP. Рівень середньомолекулярних пептидів залишався на рівні ураження.

Застосування селективного блокатора iNOS мелатоніну призводило до часткового поліпшення стану печінки, про що свідчило вірогідне зниження вмісту в печінці ТБК і ГПЛ (в 1,4 та 1,3 раза відповідно). Вміст GSH, активність KAT і СОД у тварин даної групи вірогідно зростали, відповідно, на 18,4, 29,7 та 53,6 % (табл. 1). Спостерігалась тенденція до

Таблиця 1 – Показники стану ПОЛ та антиоксидантної системи печінки ($M \pm m$)

Серія дослідів	1-ша група – контроль	2-га група – IP	3-тя група – IP+LA	4-та група – IP+L-NAME	5-та група – IP+Mel
KAT, мкат/кг	$4,47 \pm 0,12$	$2,87 \pm 0,27$ $p < 0,0025$	$3,21 \pm 0,2$ $p_1 < 0,05$	$1,75 \pm 0,07$ $p_1 < 0,05$	$3,72 \pm 0,22$ $p_1 < 0,05$
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	$3,53 \pm 0,29$	$6,10 \pm 0,26$ $p < 0,001$	$4,93 \pm 0,18$ $p_1 < 0,05$	$8,07 \pm 0,42$ $p_1 < 0,001$	$4,80 \pm 0,1$ $p_1 < 0,01$
ТБК, ммоль/кг	$3,04 \pm 0,24$	$5,18 \pm 0,33$ $p < 0,002$	$3,66 \pm 0,07$ $p_1 < 0,005$	$6,73 \pm 0,43$ $p_1 < 0,05$	$3,79 \pm 0,17$ $p_1 < 0,01$
GSH, ммоль/кг	$4,07 \pm 0,09$	$2,82 \pm 0,04$ $p < 0,005$	$3,84 \pm 0,19$ $p_1 < 0,01$	$2,12 \pm 0,08$ $p_1 < 0,05$	$3,84 \pm 0,19$ $p_1 < 0,01$

Таблиця 2 – Вміст середньомолекулярних пептидів та церулоплазміну в сироватці крові ($M \pm m$)

Серія дослідів	1-ша група – контроль	2-га група – IP	3-тя група – IP+LA	4-та група – IP+L-NAME	5-та група – IP+Mel
MCM_1 , ум. од./л	$0,42 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,01$ $p < 0,01$	$0,48 \pm 0,01$ $p_1 < 0,01$	$0,59 \pm 0,02$ $p_1 > 0,1$	$0,51 \pm 0,01$ $p_1 < 0,05$
MCM_2 , ум. од./л	$0,21 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$ $p < 0,01$	$0,28 \pm 0,01$ $p < 0,05$	$0,34 \pm 0,02$ $p_1 > 0,05$	$0,51 \pm 0,01$ $p_1 < 0,05$
ЦП, мг/л	$230,4 \pm 5,3$	$281,5 \pm 7,2$ $p < 0,01$	$246,5 \pm 8,7$ $p_1 < 0,05$	$323,8 \pm 9,9$ $p_1 < 0,05$	$256,7 \pm 13,8$ $p_1 > 0,1$

зменшення вмісту ЦП у сироватці крові порівняно з групою IP. Вміст молекул середньої маси достовірно знижувався порівняно з групою IP (табл. 2).

Встановлено, що IP-ураження супроводжувалося вірогідним зменшенням активності ферментів мітохондрій ЦХО та СДГ (табл. 3). За умов надмірного синтезу NO спостерігається незворотне пригнічення мітохондріального дихання через утворення пероксинітриду [16]. Це зумовлює зниження синтезу внутрішньоклітинного АТФ та зростання продукування O_2^- електронотранспортною системою, що, у свою чергу, призводить до деполаризації мітохондріальної мембрани та ініціації каскаду апоптозу [22]. Застосування LA сприяло вірогідному підвищенню активності мітохондріальних ферментів ЦХО і СДГ (на 18,7 та 6,9 % відповідно). При блокуванні синтезу NO препаратом L-NAME спостерігалась тенденція до зниження активності СДГ, а Mel вірогідно збільшував активність досліджуваних ферментів мітохондрій ЦХО і СДГ, відповідно, на 7,2 та 13,5 % (табл. 3).

Результати проведених нами досліджень дозволяють припустити, що порушення енергозабезпечення мітохондрій зумовлене зростанням за умов реперфузії концентрації АФК, причому важливу роль тут відіграють токсичні продукти метаболізму NO. Виконані нами дослідження показали, що застосування попередника NO L-аргініну призводить до підвищення активності ферментів мітохондрій, мелатонін вірогідно не змінює їх активність, а при введенні L-NAME активність досліджуваних ферментів мітохондрій залишається на рівні ураження, пінеальний гормон мелатонін сприяє відновленню функціонування дихального ланцюга мітохондрій, що, ймовірно, зумовлено вираженими антиоксидантними властивостями останнього [2] (табл. 3).

Під час ішемії-реперфузії NO проявляє, на думку ряду дослідників, деякі позитивні ефекти. Послаблення NO-залежних процесів, таких, як вазодилатація, відбувається внаслідок захоплення концентраціями супероксиду, що зростають, значної кількості наявного NO і належить до найдетальніше вивчених взаємодій між NO і супероксидом. При перевищенні наномолярного рівня концентрацій NO стає потужним перехоплювачем супероксиду [8]. Це призводить до послаблення АФК-залежних механізмів передачі й активації тих, що зумовлені утворенням ONOO-. При концентрації NO, яка відповідає рівню СОД у тканині, він може конкурувати з останньою, тобто функціонувати як внутрішньоклітинна пастка супероксиду [10]. Враховуючи поліпшення функціонального стану печінки при введенні L-Arginine та Mel, можна припустити, що eNOS виконує проєктивну функцію, а iNOS відповідальна за ураження печінки при її ішемії-реперфузії. Результати проведених нами досліджень узгоджуються з даними V. G. Lee et al. [24].

Таким чином, результати виконаних досліджень дозволяють говорити про проєктивну роль NO в період ранньої реперфузії. Попереднє профілактичне введення L-аргініну сприяє пригніченню процесів ліпопероксидації та активізації антиоксидантної системи у печінці. Блокатори синтезу оксиду азоту сприяють погіршенню прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу і стану печінки при IP. Слід вказати на те, що прояви ураження є більш вираженими, якщо блокується конститутивна форма ферменту. Інгібітори NOS з високою специфічністю до індукцибельної ізоформи iNOS, на відміну від неселективних інгібіторів NOS, а особливо мелатонін, який має виражену антиоксидантну дію [21], певною мірою усувають негативний вплив ішемії-реперфузії [15].

Таблиця 3 – Показники активності мітохондріальних ферментів у печінці ($M \pm m$)

Серія дослідів	1-ша група – контроль	2-га група – IP	3-тя група – IP+LA	4-та група – IP+L-NAME	5-та група – IP+Mel
ЦХО, ммоль/(кг·хв)	8,80±0,24	6,72±0,19 $p < 0,05$	7,98±0,19 $p_1 < 0,01$	6,98±0,13 $p_1 > 0,05$	7,61±0,11 $p_1 < 0,01$
СДГ, ммоль/(кг·хв)	8,23±0,12	6,93±0,12 $p < 0,05$	7,41±0,05 $p_1 < 0,05$	6,48±0,07 $p_1 > 0,05$	7,42±0,09 $p_1 < 0,05$

ВИСНОВКИ. 1. Профілактичне введення попередника синтезу оксиду азоту сприяє зменшенню порушень прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу за умов ішемії-реперфузії печінки.

2. Блокування синтезу оксиду азоту, особливо за рахунок інгібування конститутивної

NO-синтази, призводить до ще більшої активації процесів ліпопероксидації.

Перспективи подальших досліджень. Встановлення ролі системи L-Arginine–NO в патогенезі ішемії-реперфузії дозволить проводити пошук ефективних засобів профілактики уражень печінки при відновленні органного кровотоку.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. 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.
2. Барабой В. А. Антиокислительная и биологическая активность мелатонина / В. А. Барабой // Укр. біохім. журн. – 2000. – **72**, № 3. – С. 5–11.
3. Вплив L-аргініну та інгібіторів NO-синтази на стан антиоксидантної системи тромбоцитів за умов цукрового діабету першого типу / Н. Сибірня, О. Вовк, В. Бурда [та ін.] // Вісник Львів. ун-ту. – 2004. – **38**. – С. 50–56.
4. Гаврилов В. Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В. Б. Гаврилов, М. И. Мишкородная // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33–35.
5. Ещенко Н. Д. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы / Н. Д. Ещенко, Г. Г. Вольский // Методы биохимических исследований. – Л. : Изд-во Ленинградского университета, 1982. – С. 207–212.
6. 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 // Лаб. діагностика. – 2001. – № 3. – С. 43–45.
7. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 1982. – 311 с.
8. Куровська В. О. Роль оксиду азоту в ішемічних і ішемічно-реперфузійних ушкодженнях головного мозку / В. О. Куровська, В. П. Пішак, С. С. Ткачук // Бук. мед. вісник. – 2008. – **12**, № 4. – С. 143–149.
9. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
10. Механизмы передачи сигнала оксидант-оксид азота в сосудистой ткани / М. С. Волин, К. А. Девидсон, П. М. Камински [и др.] // Биохимия. – 1998. – № 7. – С. 958–965.
11. Современные методы в биохимии / под ред. В. Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1977. – 390 с.
12. Среднемолекулярные пептиды спинномозговой жидкости при гнойных менингитах / В. В. Оськина, К. И. Чекалина, Н. И. Габриэлян [и др.] // Лаб. дело. – 1987. – № 2. – С. 23–25.
13. 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.
14. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids / L. C. Green, A. W. Davie, J. Glogowski [et al.] // *Analyt. Biochem.* – 1982. – **126**, № 1. – P. 131–138.
15. 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. – **68**. – P. 803–813.
16. Cassina A. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport / A. Cassina, R. Radi // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1994. – **308**. – P. 309–16.
17. 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. – **36**, № 7. – P. 1959–1961.
18. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – № 82. – P. 70–77.
19. Grace P. A. Ischemia-reperfusion injury / P. A. Grace // *Brit. J. Surg.* – 1994. – **81**. – P. 637–647.
20. Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in the “oxygen paradox”: Reduction of creatine kinase release by catalase, allopurinol or deferoxamine, but not by superoxide dismutase / C. L. Myers, S. J. Weiss, M. M. Kirsh [et al.] // *J. Mol. and Cell. Cardiol.* – 1985. – **17**. – P. 675–684.
21. Reiter R. J. Melatonin: Lowering the High Price of Free radicals / R. J. Reiter // *News Physiol. Sci.* – 2000. – **15**. – P. 246–250.
22. The effect of nitric oxide on cell respiration A key to understanding its role in cell survival or death / B. Beltran, A. Mathur, M. R. Duchon [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – **97**. – P. 14602–14607.
23. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury / W. Jassem, S. V. Fuggle, M. Rela [et al.] // *Transplantation.* – 2002. – **27**, № 73. – P. 493–499.
24. The roles of iNOS in liver ischemia-reperfusion injury / V. G. Lee, M. L. Johnson, J. Baust [et al.] // *Shock.* – 2001. – **16** (5). – P. 355–360.
25. Ullrich V. Superoxide as a messenger of endothelial function / V. Ullrich, M. Bachschmid // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – **278**. – P. 1–8.
26. Xia Y. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages / Y. Xia, J. L. Zweier // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – **94**. – P. 6954–6958.

ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ЕЕ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ В ПРИСУТСТВИИ МОДУЛЯТОРОВ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА

Резюме

Исследовано состояние системы прооксиданты–антиоксиданты в печени при ее ишемическо-реперфузионном поражении на фоне введения предшественников и блокаторов синтеза оксида азота. Установлено, что профилактическое введение предшественника синтеза оксида азота способствует уменьшению нарушений прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза в условиях ишемии-реперфузии печени. Блокирование синтеза оксида азота, особенно за счет ингибирования конститутивной NO-синтазы, приводит к еще большей активации процессов липопероксидации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: система прооксиданты–антиоксиданты, ишемическо-реперфузионное поражение, синтез оксида азота.

O. M. Oleshchuk
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

PROOXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE AT ISCHEMIC-REPERFUSION OF LIVER OF RATS AT THE PRESENCE OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS MODULATORS

Summary

Prooxidant-antioxidant balance at ischemic-reperfusion of liver of rats at the presence of nitric oxide synthesis precursors and blocks was investigated. It was found that the prophylactic injection of nitric oxide synthesis precursor reduces violations of prooxidant-antioxidant homeostasis under the conditions of ischemic-reperfusion of liver. Blocking the nitric oxide synthesis, especially due to inhibition of constitutive NO-synthase, leads to aggravation of peroxidation injury.

KEY WORDS: prooxidant-antioxidants system, ischemic-reperfusion lesion, nitrix oxide synthesis.

Отримано 16.02.12

Адреса для листування: О. М. Олещук, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.