

УДК 616.381-002-092. 9-085.273.2

РОЛЬ НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В РЕГУЛЯЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ПЕЧЕНИ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПЕРИТОНИТОМ

Срубиллин Д.В., Еникеев Д.А., Мышкин В.А., Исаков И.Д.,
Исакова А.В., Каширина Е.П.

ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Уфа, e-mail: rectorat@bashgmu.ru

Роль нитроксидазной системы в механизмах регуляции окислительного стресса при перитоните недостаточно изучена, поэтому целью работы явилось исследование изменений показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в печени крыс с экспериментальным перитонитом в условиях модуляции L-аргинин-NO системы. Эксперименты проведены на крысах-самцах, у которых моделировали перитонит путем внутривентрального введения 10% каловой взвеси в дозе 1,0 мл на 100 г массы. Модуляцию пути L-аргинин – NO осуществляли путем внутримышечного ежедневного введения ингибиторов NO-синтазы (NOS) в дозе 10 мг/кг с момента моделирования перитонита: неселективного ингибитора NOS – N-nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME; «Sigma») и селективного ингибитора индуцибельной NOS (iNOS) – S-methylisothiourea (S-MT). При развитии воспалительного процесса в брюшной полости усиливаются окислительные процессы в печени, что при недостаточности системы антиоксидантной защиты ведет к развитию «окислительного и нитрозилирующего стресса», являющегося одним из основных механизмов ее повреждения, что подтверждается ростом активности органоспецифического фермента – урокиназы. Применение блокаторов NO-синтазы – L-NAME и S-MT свидетельствуют о том, что ингибирование индуцибельной NOS не влияет на окислительные процессы и степень повреждения печени, незначительно увеличивая выживаемость животных, а ингибирование продукции оксида азота при применении L-NAME увеличивает генерацию супероксидного анион-радикала в печени, что на фоне сниженной активности супероксиддисмутазы и содержания восстановленного глутатиона усиливает повреждение печени. Увеличение смертности среди крыс, получавших L-NAME, свидетельствует о значении оксида азота, образуемого конститутивной NOS, в защите эндотелиальных клеток от оксидантного повреждения.

Ключевые слова: оксид азота, нитрозотиолы, свободно-радикальное окисление, печень, перитонит, крысы

THE ROLE OF THE NITROXIDERGIC SYSTEM IN OXIDATIVE STRESS REGULATION IN THE RAT LIVER WITH EXPERIMENTAL PERITONITIS

Srubilin D.V., Enukeev D.A., Myshkin V.A., Isakov I.D., Isakova A.V., Kashirina E.P.
Bashkirian State medical University, Ufa, e-mail: rectorat@bashgmu.ru

The role of the nitroxidergic system in oxidative stress regulation mechanisms induced by peritonitis has not been completely elucidated. Thus, the aim of the present study is to investigate changes in lipid peroxidation and antioxidant protection in the rat liver with experimental peritonitis under the conditions of L-Arginine-NO system modulation. Experiments were performed on male rats with peritonitis modulated by administration of 10% fecal suspension at a dose of 1,0 ml per 100 g of mass. The L-Arginine-NO system modulation was performed by daily intramuscular administration of nitric oxide (NO) synthase (NOS) at a dose of 10 mg/kg from the moment of peritonitis modeling: nonselective inhibitor NOS – N-nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME; «Sigma») and selective inhibitor of inducible NOS (iNOS) – S-methylisothiourea (S-MT). With an inflammation process development in the abdominal cavity, oxidative processes intensify in the liver. With poor antioxidant protection, it causes the development of «oxidative and nitrosilizing stress» which is one of major mechanisms of its damage. This is confirmed by an increased activity of urokinase – an organospecific enzyme. The use of NO synthase – L-NAME и S-MT blockers confirms that inducible NOS inhibition does not impact on oxidative processes and the liver damage level insignificantly increasing animal survival, whilst, nitrogen oxide product inhibition with the L-NAME use increases generation of superoxide anion-radical in the liver. With a decreased activity of superoxidismutase and the content of restored glutathione it increases the liver damage. An increase in mortality rate among rats who received L-NAME confirms the role of nitrogen oxide formed by the constitutive NOS in the protection of endothelial cells from oxidative damage.

Keywords: nitrogen oxide, nitrosothiols, free radical oxidation, liver, peritonitis, rats

Перитонит представляет собой комплекс тяжелых патофизиологических реакций с нарушением функционирования всех систем организма. По современным представлениям важная роль в патогенезе перитонита принадлежит нарушениям прооксидантно-антиоксидантного равновесия [1, 11, 12]. Интенсификация прооксидантных процессов, превышающая возможности ан-

тиоксидантных систем защиты предотвращать эти процессы, служит основным механизмом развития окислительного стресса. В организме образование оксида азота (NO) осуществляется NO-синтазой (NOS), которая представлена конститутивными изоформами (nNOS, cNOS) и индуцибельной изоформой iNOS. В физиологических условиях образование оксида азота происходит

в небольших количествах за счет функционирования конститутивных изоформ, а при воспалительных процессах в организме индуцируется iNOS, что приводит к значительному усилению синтеза оксида азота [15]. В условиях окислительного стресса повышается интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ), вследствие этого значительная часть оксида азота может расходоваться на реакции с липидными радикалами, что в свою очередь может способствовать обрыванию цепи свободно-радикального окисления липидов [2]. С другой стороны, реакция оксида азота с супероксидным анион-радикалом приводит к усилению образования пероксинитрита, который может вызвать значительные повреждения ДНК, углеводов, белков [25]. Рядом авторов установлено, что неспецифическое ингибирование NOS при эндотоксемии вызывает прогрессирующее повреждение печени, свидетельствующее о том, что образующийся локально при системном воспалении NO играет защитную роль в печени [21]. Другие ученые, изучая роль специфических изоформ iNOS, установили факты прямого гепатотоксического воздействия NO при эндотоксемии [20]. Роль нитроксидергической системы в механизмах регуляции окислительного стресса при экспериментальном перитоните недостаточно изучена.

Целью работы явилось исследование изменений показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в печени крыс с экспериментальным перитонитом в условиях модуляции L-аргинин-NO системы.

Материалы и методы исследования

Проведены эксперименты с использованием 64 белых половозрелых, неинбредных крыс-самцов массой 220–250 г. Эксперименты проводились в соответствии с требованиями приказов № 1179 МЗ СССР от 10.10.83 г., № 267 МЗ РФ от 19.06.03 г. «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» и «Правила по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных». Животные были разделены на 4 группы по 8 крыс в каждой группе. Крысам 1-й группы (ложнооперированные крысы, контроль) внутрибрюшинно вводили стерильный физиологический раствор. У крыс 2, 3, 4 групп моделировали перитонит. Перитонит у животных воспроизводили путем внутрибрюшинного введения 10% каловой взвеси в дозе 1,0 мл на 100 г массы. Через 8 часов после введения каловой взвеси у всех животных развивались симптомы перитонита: вялость, заторможенность, отказ от пищи, учащенное дыхание, вздутие живота. У крыс 2, 3, 4 групп с целью лечения перитонита через 8 часов после введения каловой взвеси выполняли лапаротомию, оценивали возникшие патологические изменения в брюшной полости и санировали ее. В течение эксперимента все группы животных при остром перитоните получали подкожно физиологический раствор в суточной дозе 40 мл на

кг. На животных 2-й группы изучали изменения, происходящие при динамическом развитии перитонита без введения ингибиторов NOS. Модуляцию пути L-аргинин – NO осуществляли путем внутримышечного ежедневного введения ингибиторов NOS в дозе 10 мг/кг с момента моделирования перитонита: неспецифического ингибитора NOS – N-nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME; «Sigma») у крыс 3-й группы и селективного ингибитора индуцибельной NOS (iNOS) – S-methylisothiourea (S-MT) у крыс 4 группы. Животных выводили из эксперимента на 1-е, 3-е и 5-е сутки после операции. Для обезболивания использовали эфир для наркоза. Выводили животных из опыта путем декапитации. Объектом биохимических исследований служили печень и плазма крови.

Для изучения состояния процессов липопероксидации определяли содержание диеновых конъюгатов [4] и малонового диальдегида, используя метод M. Mihara (1980), заключающийся в образовании окрашенного комплекса при взаимодействии продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) с тиобитуровой кислотой, с помощью стандартного набора фирмы Агат-Мед (Россия). Одновременно с продуктами ПОЛ определяли активность ферментов антиоксидантной защиты: каталазы [5], супероксиддисмутазы [13], а также содержание восстановленного глутатиона, учитывая его способность реагировать с избытком аллоксана с образованием соединения, имеющего максимум поглощения при длине волны 305 нм.

О содержании оксида азота в плазме крови судили по количеству стабильных конечных метаболитов NO, а именно $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- (\text{UNO}_x)$. Принцип метода заключается в одновременном восстановлении нитратов в нитриты в присутствии VCl_3 и реакции диазотирования образовавшимся нитритом сульфаниламида с развитием розовой окраски [9]. Для определения S-нитрозотиолов применили метод, основанный на спектрофотометрическом измерении нитрита в плазме крови до и после добавления Hg(II), которая специфически разрушает S–N связи и катализирует высвобождение из S-нитрозотиолов оксида азота [22]. Для определения генерации супероксиданиона в печени использовали метод, предложенный в работе [3]. Степень повреждения печени оценивали по активности специфического фермента – сывороточной урокиназазы, которая встречается только в печени позвоночных и в норме как в крови, так и в других органах не обнаруживается [7].

Обработку полученных результатов проводили с применением методов вариационной статистики. После проверки нормальности распределения изучаемых параметров в сравниваемых группах тестом Шапиро – Уилка определяли средние величины (M), ошибку средних величин (m). Оценку достоверности проводили по критерию Стьюдента (t). Минимальный уровень статистической значимости различий верифицировали при $p < 0,05$. Математическую обработку выполняли на компьютере с применением программного обеспечения Microsoft Excel и программы Statistica 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследования проведены в 2 этапа. На первом этапе исследовали активность процессов ПОЛ, систему антиоксидантной защиты печени, суммарное содержание

нитритов, нитратов и нитрозотиолов в плазме крови, а также оценивали степень повреждения печени при экспериментальном перитоните. На втором этапе изучали вышеприведенные показатели при применении неселективного ингибитора NOS – N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME), а также селективного ингибитора индужи-

бельной NOS – S-метилизотиомочевины. Как следует из данных таблицы, при развитии воспалительного процесса в брюшной полости происходит накопление продуктов ПОЛ в ткани печени, причем проведенная лечебная санация брюшной полости значительно не уменьшила выраженности окислительного стресса.

Влияние модуляции синтеза оксида азота на показатели перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты в печени, содержание стабильных метаболитов оксида азота и S-нитрозотиолов в плазме крови у крыс при перитоните ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Интактные животные ($n = 8$)	Группы животных ($n = 8$ в группе)	Значение показателей на этапах исследования (от момента моделирования)		
			1-е сутки	3-е сутки	5-е сутки
ДК, ($\lambda = 232$) усл.ед. на 1 г ткани	$1,9 \pm 0,18$	2-я группа	$3,71 \pm 0,15^*$	$2,95 \pm 0,12^*$	$3,32 \pm 0,19^*$
		3-я группа	$3,76 \pm 0,19^*$	$3,23 \pm 0,14^*$	$3,83 \pm 0,17^{*\wedge}$
		4-я группа	$3,38 \pm 0,16^*$	$2,83 \pm 0,15^*$	$3,08 \pm 0,2^*$
МДА мкмоль на 1 г ткани	281 ± 14	2-я группа	$535,3 \pm 23,1^*$	$449,4 \pm 27,8^*$	$577,7 \pm 25,4^*$
		3-я группа	$498,3 \pm 20,6^*$	$481,3 \pm 22,4^*$	$617,5 \pm 23,3^*$
		4-я группа	$521,5 \pm 16,3^*$	$464,3 \pm 15,9^*$	$594,7 \pm 14,3^*$
СОД, усл.ед. на 1 мг белка	$41,1 \pm 2,5$	2-я группа	$48,2 \pm 2,9$	$50,8 \pm 2,5^*$	$31,7 \pm 2,6^*$
		3-я группа	$48,9 \pm 1,6^*$	$48,5 \pm 1,5^*$	$24,9 \pm 2,0^{*\wedge}$
		4-я группа	$49,9 \pm 1,9^*$	$50,6 \pm 2,1^*$	$36,5 \pm 3,2^*$
Каталаза, мМоль в мин на 1 мг белка	$214,8 \pm 6,2$	2-я группа	$181,3 \pm 9,6^*$	$174,5 \pm 12,2^*$	$153,7 \pm 5,1^*$
		3-я группа	$185,3 \pm 6,2^*$	$180,8 \pm 8,1^*$	$156,1 \pm 5,9^*$
		4-я группа	$187,2 \pm 5,5^*$	$176,2 \pm 7,8^*$	$154,0 \pm 5,8^*$
Восстановленный глутатион, мг %	$149 \pm 5,3$	2-я группа	$133,9 \pm 6,2^*$	$129,1 \pm 9,7^*$	$106,8 \pm 7,3^*$
		3-я группа	$118,3 \pm 7,8^*$	$110,0 \pm 7,4^*$	$78,1 \pm 7,0^{*\wedge}$
		4-я группа	$141,2 \pm 7,5$	$140,3 \pm 6,5$	$109,8 \pm 6,2^*$
Коэффициент МДА/ДК	$147,9 \pm 4,4$	2-я группа	$144,3 \pm 4,1$	$152,3 \pm 5,7$	$174,0 \pm 6,6^*$
		3-я группа	$132,5 \pm 5,2$	$149,0 \pm 4,8$	$161,2 \pm 5,6$
		4-я группа	$154,3 \pm 3,9$	$164,1 \pm 6,8$	$193,1 \pm 4,7^{*\wedge}$
Содержание UNO_x в плазме крови, мкмоль/л	$17,6 \pm 0,4$	2-я группа	$101,8 \pm 6,2^*$	$53,5 \pm 4,4^*$	$64,5 \pm 5,9^*$
		3-я группа	$89,2 \pm 8,1^*$	$56,2 \pm 5,8^*$	$53,5 \pm 5,0^*$
		4-я группа	$98,5 \pm 8,4^*$	$53,2 \pm 5,1^*$	$68,1 \pm 4,7^*$
Содержание S-нитрозотиолов в плазме крови, нмоль/л	$1015 \pm 54,7$	2-я группа	$3287,3 \pm 155,1^*$	$2028,6 \pm 108,5^*$	$3278,8 \pm 103,8^*$
		3-я группа	$2389,4 \pm 120,2^{*\wedge}$	$1560,6 \pm 86,3^{*\wedge}$	$3089,3 \pm 121,7^*$
		4-я группа	$2671,5 \pm 95,2^{*\wedge}$	$1333,7 \pm 146,9^{\wedge}$	$2278,3 \pm 104,8^{*\wedge}$

Примечания: * – различие достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с интактными животными. \wedge – различие достоверно ($p < 0,05$) по сравнению со 2-й группой на определенные сутки эксперимента.

Содержание диеновых конъюгатов (ДК) гидроперекиси ненасыщенных жирных кислот, являющихся первичными молекулярными продуктами ПОЛ, у крыс второй группы через 24 часа после моделирования патологического процесса увеличивалось на 195,2% ($p < 0,05$), а накопление малонового диальдегида (МДА), относящегося к поздним продуктам пероксидации, увеличивалось на 190,5% ($p < 0,05$). На 5 сутки эксперимента количество ДК несколько снижается, а содержание МДА возрастает, что находит отражение в увеличении коэффициента МДА/ДК и свидетельствует о на-

растающем переходе первичных продуктов ПОЛ в промежуточные и конечные.

Поскольку первичные и вторичные продукты ПОЛ оказывают выраженное повреждающее действие, в организме существуют регуляторные механизмы, ограничивающие накопление высокотоксичных продуктов. Ведущую роль в регуляции ПОЛ играют антиоксидантные ферменты, такие как супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза [23]. СОД катализирует реакцию взаимодействия двух супероксидных радикалов с образованием перекиси водорода и молекулярного кислорода, конкурируя с оксидом азота,

поскольку скорость реакции NO с супероксиданионом в три раза выше, чем скорость реакции супероксиданиона с СОД [14]. В свою очередь перекись водорода может быть использована фагоцитами для синтеза гипохлорида, обладающего бактерицидным действием, либо диффундировать в клетки и разрушаться там каталазой и глутатионпероксидазой, либо в присутствии Fe^{+2} разрушаться с образованием гидроксильного радикала. Проведенные исследования установили повышение активности СОД в печени в 1-е и 3-е сутки на 17,3% ($p < 0,05$) и 23,6% ($p < 0,05$) соответственно, что свидетельствует о мобилизации защитно-приспособительных механизмов, связанных с избыточной продукцией супероксидного аниона-радикала. Избыточная активность СОД ведет к повышенному образованию перекиси водорода. При этом по нашим данным не происходит параллельного увеличения активности каталазы, что может быть связано с повышенной концентрацией водородных ионов, приводящих к возникновению протонированных форм ферментов, обладающих измененной каталитической активностью. В то же время на 5 сутки на фоне сохраняющегося высокого уровня продуктов ПОЛ активность мембраносвязанной СОД, ключевого компонента антиоксидантной защиты, снижалась на 22,9% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем и на 37,6% ($p < 0,05$) по сравнению с данными 3-х суток. Торможение активности СОД во многом связано с избытком перекиси водорода, накапливающейся к 5 суткам вследствие сохраняющегося дефекта каталазы и снижения активности глутатионového звена антиоксидантной защиты. В эти же сроки

снижалось и содержание восстановленного глутатиона на 28,3% ($p < 0,05$). Глутатион участвует как в индуцированной глутатионпероксидазной реакции, так и в поддержании восстановленного состояния сульфгидрильных групп белковых молекул, редокс-статуса аскорбата и клетки в целом.

При развитии экспериментального перитонита происходило значительное увеличение продукции оксида азота, о чем свидетельствовало более чем 3-кратное повышение содержания суммы его стабильных метаболитов в плазме крови. Разнообразная функциональная активность оксида азота предполагает наличие своеобразных переносчиков, способных потенцировать его биологические эффекты. По современным представлениям, в качестве таких соединений выступают S-нитрозотиолы (RSNO) со структурой $R-S-N=O$, в которых NO ковалентно связан с SH-группами белков и низкомолекулярными тиолами, например, глутатионом [17]. Как видно из данных, представленных в таблице, при экспериментальном перитоните значительно изменяется содержание S-нитрозотиолов в плазме крови.

Развивающиеся окислительный и нитролизующий стрессы являются одним из основных механизмов повреждения печени, что подтверждается ростом активности ее органоспецифического фермента – уруканиназы, с помощью которого можно обнаружить и выявить степень поражения печени (рис. 1). В норме как в крови, так и в других тканях этот фермент не обнаруживается и обнаружение уруканиназной активности у крыс 2-й группы является ранним проявлением патологического процесса в печени.

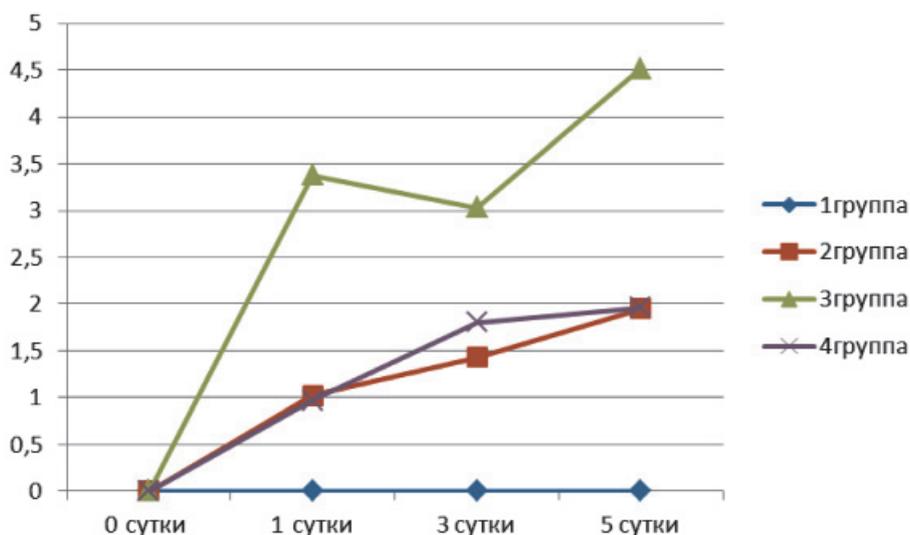


Рис. 1. Влияние модуляции синтеза оксида азота на активность уруканиназы (нмоль/с·л) в печени у крыс при перитоните ($n = 8$ в каждой группе)

Активные формы азота и кислорода могут реагировать со многими молекулами-мишенями по разным механизмам и относительное равновесие между этими реакциями является ключевым для определения роли NO в содействии окислительному стрессу, либо в защите от него [19]. В последнее десятилетие оксиду азота (NO) как одному из важных медиаторов различных физиологических и патологических процессов, в том числе и в печени, уделяется пристальное внимание, однако окончательно не установлено, в какие процессы, гепатодеструкции или гепатопротекции, он вовлечен. Учитывая данные обстоятельства, представляло интерес изучение влияния ингибирования образования оксида азота в организме на процессы пероксидации липидов, состояние системы антиоксидантной защиты печени у животных с экспериментальным перитонитом.

У крыс 3-й группы применение L-NAME не оказывало существенного влияния на течение процессов ПОЛ и состояние ферментного звена антиоксидантной системы, однако на 5 сутки перитонита количество ДК и МДА статистически достоверно возрастало на 102% ($p < 0,05$) и 119,8% ($p < 0,05$) соответственно. Данное обстоятельство можно объяснить существенным снижением активности СОД и содержания восстановленного глутатиона в эти сроки. С целью выявления роли индуцибельной NOS в окислительных процессах при экспериментальном перитоните проведены эксперименты с введением ее ингибитора S-MT животным 4-й группы. Результаты исследования, представленные в таблице, свидетельствуют о незначительном снижении уровня продуктов ПОЛ, без изменения факторов антиоксидантной защиты в сравнении с животными 2-й группы.

Применение блокаторов NO-синтаз – L-NAME и S-MT – привело к незначительному снижению образования NO. Изменения в содержании S-нитрозотиолов были более значительными: у животных на фоне применения L-NAME и S-MT уменьшение концентрации S-нитрозотиолов составило 72,7% ($p < 0,05$) и 81,3% ($p < 0,05$) соответственно в 1-е сутки эксперимента в сравнении со 2 группой животных. Более выраженное снижение S-нитрозотиолов отражает процессы распада этих соединений, в результате чего повышается содержание в плазме суммы стабильных метаболитов оксида азота, синтез которых блокировался при применении L-NAME и S-MT. Важная роль в этом процессе принадлежит СОД, которая в присутствии восстановленного глутатиона способна катализировать разло-

жение S-нитрозотиолов, индуцируя продолжительную генерацию оксида азота [10]. Вероятно, данным обстоятельством объясняется более выраженное уменьшение концентрации метаболитов оксида азота и более высокое содержание S-нитрозотиолов у животных 3 группы на 5 сутки экспериментального перитонита.

С одной стороны, уменьшение концентрации нитрозотиолов для поддержания уровня оксида азота в крови имеет приспособительное значение, так как оксид азота нейтрализует липидные радикалы, но, с другой стороны, при низком уровне СОД очевидна возможность образования пероксинитрита и токсических проявлений. Образование пероксинитрита в значительной степени зависит от редокс-состояния клетки, которое определяется соотношением восстановленных и окисленных форм соединений: восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона; НАДН и НАД⁺; НАДФН и НАДФ⁺. Schafer F. и Buettner G. полагают, что редокс-потенциал сопряженных окислительно-восстановительных реакций, протекающих в клетке, в соответствии с уравнением Нернста определяется восстанавливающей способностью субстратов этих редокс-пар и величиной половинного восстановительного потенциала клетки. Половинный восстановительный потенциал клетки в значительной мере зависит от концентрации в ней восстановленного глутатиона [24]. В проведенных исследованиях у крыс 3 группы на 5 сутки экспериментального перитонита отмечается значительное снижение активности СОД на 60,6% ($p < 0,05$), а также содержания восстановленного глутатиона на 52,4% ($p < 0,05$). Учитывая вышеизложенное, рассматривать пути реализации эффектов NO без учета активности СОД с современных позиций неверно.

Данные, представленные на рис. 1, свидетельствуют об увеличении повреждения печени у животных 3 группы, получавших L-NAME, определяемой по активности урокиназы, уровень которой к 5-м суткам возрастал в 4,52 раз ($p < 0,05$). С другой стороны, у крыс 4 группы, получавших S-MT, повреждение печени не увеличивалось в сравнении с животными 2 группы. L-NAME является необратимым ингибитором эндотелиальной NOS и обратимым ингибитором i NOS. Эндотелиальные клетки составляют в печени 12,5%, а гепатоциты и клетки Купфера составляют вместе 78% [16], следовательно, вклад эндотелиальных клеток в увеличение продукции оксида азота при экспериментальном перитоните

незначительный и в основном увеличение продукции оксида азота связано с iNOS. Данные, представленные в таблице, свидетельствуют, что как при применении L-NAME, так и при S-MT уровень оксида азота в плазме меняется в одинаковой степени, однако у крыс, получавших L-NAME, увеличивается повреждение печени, которое более выражено к 5 суткам. Можно заключить, что блокирование i NOS значительно не изменяет уровень ПОЛ и связанное с ним повреждение печени при экспериментальном перитоните. По данным литературы, у крыс усиливалось эндотоксин-индуцированное повреждение печени после применения L-NAME, которое не было связано с увеличением портального давления [26]. Следует, однако, отметить, что авторы измеряли портальное давление, а не печеночную перфузию.

Данные представленные на рис. 2, показывают, что развитие перитонита вызывает незначительное увеличение спонтанной продукции супероксид-анион радикала в гомогенате печени крыс, которое становится более выраженным к 5 суткам эксперимента. Ингибирование продукции NO при применении L-NAME сопровождается повышением спонтанной продукции супероксид-анион радикала на 84,9% ($p < 0,05$) по сравнению со 2 группой, а при применении S-MT продукция супероксид-анион радикала увеличивалась в значительно меньшей степени. Следовательно, снижение продукции NO эндотелиальными клетками в условиях применения L-NAME при одновременном повышении уровня супероксиданиона лежит в основе эндотелиальной дисфункции и повреждения в печени у крыс при экспериментальном перитоните.

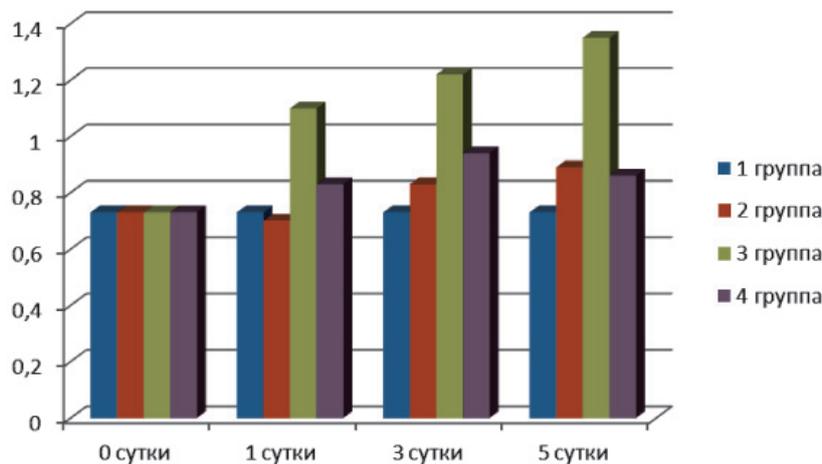


Рис. 2. Влияние модуляции синтеза оксида азота на спонтанную продукцию супероксид-аниона (нмоль/г-с) в гомогенате печени крыс при перитоните ($n = 8$ в каждой группе)

В условиях сниженного содержания восстановленного глутатиона и активности СОД изменяется редокс-статус клетки и, вероятно, образуется пероксинитрит, который обладает универсальной биоагрессивностью, может вступать в реакции с нуклеиновыми кислотами, липидами и белками, подавлять митохондриальное дыхание, вызывая тем самым нарушение функции клетки и повреждение тканей [18], что может играть существенную роль в патогенезе повреждения печени как на молекулярном, так и на функциональном уровне. В гепатоцитах глутатионовая система непосредственно обезвреживает активные формы кислорода, либо как вторая линия обороны организма (после микросомальных ферментов и СОД) дополняет и завершает работу

первой линии или исправляет ее ошибки [6]. Взаимодействие глутатиона с органическими радикалами эффективно только в условиях удаления супероксидного анион радикала, поэтому глутатион образует с СОД своеобразную антиоксидантную систему.

В серии экспериментов оценили влияние L-NAME и S-MT на выживаемость животных при перитоните. Проведенные исследования свидетельствуют о том, L-NAME оказывает влияние на продолжительность жизни животных с перитонитом. По истечении 5 дней с момента воспроизведения перитонита смертность среди животных 2-й группы и группы животных, получавших S-MT, составила 30 и 20% соответственно, в то время как в 3-й группе достигла 50%.

Заключение

Таким образом, комплексный анализ введения селективного и неселективного ингибиторов дает основание считать, что ингибирование индуцибельной NOS не влияет на степень повреждения печени и незначительно увеличивает выживаемость животных при экспериментальном перитоните. Ингибирование продукции NO при применении L-NAME увеличивает генерацию супероксидного анион радикала, что на фоне сниженной активности СОД и содержания восстановленного глутатиона увеличивает вероятность образования пероксинитрита, вызывающего повреждение печени. Увеличение смертности среди крыс, получавших L-NAME, свидетельствует о значении оксида азота, образуемого конститутивной NOS, в защите гепатоцитов от оксидантного повреждения.

Список литературы

1. Алиев С.А. Некоторые аспекты патогенеза гипоксии и нефармакологические методы ее коррекции при гнойном перитоните / С.А. Алиев, Г.А. Султалов, М.А. Эфендиев // Вестник интенсивной терапии – 2003. – № 2. – С. 20–27.
2. Близнецова Г.Н. Влияние L-аргинина и ингибиторов NO-синтазы на образование оксида азота и нитрозотиолов при токсическом поражении печени / Г.Н. Близнецова, С.С. Артемьева, М.И. Рецкий // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, Вып. 6. – С. 656–661.
3. Близнецова Г.Н. Перекисное окисление липидов, антиоксидантная система и оксид азота при токсическом повреждении печени: дис. ... канд. биол. наук. – Воронеж, 2004. – С. 68–71.
4. Волчегорский И.А. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов, Б.Г. Яровинский, Р.И. Лифшиц // Вопросы медицинской химии. – 1989. – № 1. – С. 127–130.
5. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.
6. Кулинский В.И. Обмен глутатиона / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Успехи биол. химии. – 1990. – Т. 31, № 1. – С. 157–179.
7. Мардашев С.Р. Обнаружение уростаниназы в крови при отравлении четыреххлористым углеродом / С.Р. Мардашев, В.А. Буробин // Вопросы медицинской химии. – 1963. – Т. IX, Вып. 1. – С. 93–94.
8. Меньшикова Е.Б. Оксид азота и NO-синтазы при различных функциональных состояниях / Е.Б. Меньшикова, Н.К. Зенков, В.П. Реутов // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 4. – С. 485–503.
9. Метельская В.А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 6. – С. 15–18.
10. Пашов А.И. Оксидантный стресс и глутатионовая редокс-система в канцерогенезе / А.И. Пашов, В.Б. Цхай, Э.К. Гребенникова, Е.Н. Сивова // Мать и дитя в Кузбассе. – 2012. – № 3. – С. 3–14.
11. Срубиллин Д.В. Патогенетическое обоснование применения низкоинтенсивного лазерного излучения и комплексного соединения янтарной кислоты с 5-окси-6-метилурацилом при экспериментальном перитоните /

Д.В. Срубиллин, Д.А. Еникеев, В.А. Мышкин и др. // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 12. – С. 336–343.

12. Строев Ю.В. Фармакологическая коррекция иммунных и оксидантных нарушений при распространенном перитоните / Ю.В. Строев, Ю.Ю. Блинков, А.И. Конопля, В.П. Гаврилюк // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 12. – С. 152–156.

13. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, Н. Чаба, Й. Секей // Лабораторное дело. – 1985. – № 11. – С. 678–680.

14. Швальб П.Г. Антиоксидантная защита и функциональное состояние эндотелия у больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей до и после оперативного лечения / П.Г. Швальб, Р.Е. Калинин // Хирургия. – 2009. – № 1. – С. 53–55.

15. Alderton W.K. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition / W.K. Alderton, C.E. Cooper, R.G. Knowles // Biochem. J. – 2001. – Vol. 357. – P. 593–615.

16. Blaner W.S. Retinoids, retinoid-binding proteins and retinyl palmitate hydrolase distributions in different types of rat liver cells / W.S. Blaner, H.F.J. Hendriks, A. Brouwer, A.M. et al. // J. Lipid Res. – 1985. – Vol. 26. – P. 1241–1251.

17. Duval D.L. Regulation of hepatic nitric oxide synthase by reactive oxygen intermediates and glutathione / D.L. Duval, D.J. Sieg, R.E. Billings // Arch. Biochem. Biophys. – 1995. – Vol. 316, № 2. – P. 699–706.

18. Epe B. DNA damage by peroxynitrite characterized with DNA repair enzymes / B. Epe, D. Ballmaier, I. Roussyn et al. // Nucleic Acids Res. – 1996. – Vol. 24, № 21. – P. 4105–4110.

19. Espey M.G. Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress / M.G. Espey, K.M. Miranda, M. Feelisch et al. // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2000. – Vol. 899. – P. 209–221.

20. Fiorucci S. A NO-releasing derivative of acetaminophen spares the liver by acting at several checkpoints in the Fas pathway / S. Fiorucci, E. Antonelli, A. Mencarelli et al. // Br. J. Pharmacol. – 2002. – Vol. 35, № 4. – P. 589–599.

21. Masini E. Changes in the production of nitric oxide and superoxide by inflammatory cells in liver cirrhosis / E. Masini, L. Mugnai, M. Foschi et al. // Gastroenterology. – 2005. – Vol. 129, № 2. – P. 682–695.

22. Moore K.P. Measurement of protein nitration and nitrosothiol formation in biology and medicine / K.P. Moore, A.R. Mani // Methods Enzymology. – 2002. – Vol. 359. – P. 256–268.

23. Rodrigo J. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. / J. Rodrigo, A.P. Fernandez, J. Serrano et al. // In: Free Radical Biology & Medicine. – 2005. – Vol. 39. – P. 26–50.

24. Schafer F.Q. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple / F.Q. Schafer, G.R. Buettner // Free Radic. Biol. Med. – 2001. – Vol. 30, № 11. – P. 1191–1212.

25. Singh S. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? / S. Singh, T.V. Evans // Eur. Respir. J. – 1997. – Vol. 10, № 3. – P. 699–707.

26. Vos T.A. Differential effects of nitric oxide synthase inhibition on endotoxin-induced liver damage in rats / Vos T.A., Gouw A.S., Klok P.A., Havinga R., van. Goor H., Huitema S., Roelofsen H., Kuipers F., Jansen P.L., Moshage H. // Gastroenterology. – 1997. – Vol. 113, № 4. – P. 1323–1333.

References

1. Aliev S.A., Sultalov G.A., Jefendiev M.A. Nekotorye aspekty patogeneza gipoksii i nefarmakologicheskie metody ee korrekcii pri gnojnom peritonite // Vestnik intensivnoj terapii. 2003. no. 2. pp. 20–27.
2. Bliznecova G.N., Artem'eva S.S., Reckij M.I. Vlijanie L-arginina i inhibitorov NO-sintazy na obrazovanie oksida azota i nitrozotiolov pri toksicheskom porazhenii pečeni // Biomedicinskaja himija. 2005. Vol. 51, no. 6. pp. 656–661.

3. Bliznecova G.N. Perekisnoe okislenie lipidov, antioksidantnaja sistema i oksid azota pri toksicheskom povrezhdenii pecheni: dis... kand. biol. nauk. Voronezh 2004. pp. 68–71.
4. Volchegorskij I.A., Nalimov A.G., Jarovinskij B.G., Lifshic R.I. Sopostavlenie razlichnyh podhodov k opredeleniju produktov perekisnogo okislenija lipidov v geptanizopropanol'nyh jekstraktah krvi // Voprosy medicinskoj himii. 1989. no. 1. pp. 127–130.
5. Koroljuk M.A., Ivanova L.I., Majorova I.G. Metod opredelenija aktivnosti katalazy // Lab. delo. 1988. no. 1. pp. 16–18.
6. Kulinskij V.I., Kolesnichenko L.S. Obmen glutaciona // Uspehi biol. Himii. 1990. Vol. 31, no.1. pp. 157–179.
7. Mardashev S.R., Burobin V.A. Obnaruzhenie urokaninazy v krvi pri otravlenii chetyrehloristym uglerodom // Voprosy medicinskoj himii. 1963. Vol. IX, no.1. pp. 93–94.
8. Men'shikova E.B., Zenkov N.K., Reutov V.P. Oksid azota i NO-sintazy pri razlichnyh funkcional'nyh sostojanijah // Biohimija. 2000. Vol. 65, no. 4. pp. 485–503.
9. Metel'skaja V.A., Gumanova N.G. Skrining-metod opredelenija urovnja metabolitov oksida azota v syvorotke krvi // Klinicheskaja laboratornaja diagnostika. 2005. no. 6. pp. 15–18.
10. Pashov A.I., Chaj V.B., Grebennikova Je.K., Sivova E.N. Oksidantnyj stress i glutacionovaja redoks-sistema v kancero-geneze // Mat' i ditja v Kuzbase. 2012. no. 3. pp. 3–14.
11. Srubilin D.V., Enikeev D.A., Myshkin V.A., Isakov I.D., Rjahovskij A.E., Isakova A.V. Patogeneticheskoe obosnovanie primenenija nizkointensivnogo lazernogo izlucheniya i kompleksnogo soedinenija jantarnoj kisloty s 5-oksi-6-metiluracilom pri jeksperimental'nom peritonite // Fundamental'nye issledovaniya. 2013. no. 12. pp. 336–343.
12. Stroev Ju.V., Blinkov Ju.Ju., Konoplja A.I., Gavriljuk V.P. Farmakologicheskaja korekcija immunnih i oksidantnyh narushenij pri rasprostranennom peritonite // Fundamental'nye issledovaniya. 2011. no. 12. pp. 152–156.
13. Chevari S., Chaba N., Sekej J. Rol' superoksidmutazy v oksislitel'nyh processah kletki i metod opredelenija ee v biologicheskikh materialah // Laboratornoe delo. 1985. no. 11. pp. 678–680.
14. Shval'b P.G., Kalinin R.E. Antioksidantnaja zashhita i funkcional'noe sostojanie jendotelija u bol'nyh obliterirujushhim aterosklerozom arterij nizhnih konechnostej do i posle operativnogo lechenija // Hirurgija. 2009. no. 1. pp. 53–55.
15. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition // Biochem. J. 2001. Vol. 357. pp. 593–615.
16. Blaner W.S., Hendriks H.F.J., Brouwer A., de Leeuw A.M., Knook D.L., Goodman D.S. Retinoids, retinoid-binding proteins and retinyl palmitate hydrolase distributions in different types of rat liver cells // J. Lipid Res. 1985. Vol. 26. pp. 1241–1251.
17. Duval D.L., Sieg D.J., Billings R.E. Regulation of hepatic nitric oxide synthase by reactive oxygen intermediates and glutathione // Arch. Biochem. Biophys. 1995. Vol. 316, no. 2. pp. 699–706.
18. Epe B., Ballmaier D., Roussyn I., Briviba K., Sies H. DNA damage by peroxy-nitrite characterized with DNA repair enzymes // Nucleic. Acids. Res. 1996. Vol. 24, no. 21. pp. 4105–4110.
19. Espey M.G., Miranda K.M., Feelisch M., Fucuto G., Grisham M.B., Vitek M.P., Wink D.A. Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2000. Vol. 899. pp. 209–221.
20. Fiorucci S., Antonelli E., Mencarelli A., Pallazetti B., Alvarez-Miller L., Muscara M., del Soldato P., Sanpaolo L., Wallace J.L., Morelli A. A NO-releasing derivative of acetaminophen spares the liver by acting at several checkpoints in the Fas pathway // Br. J. Pharmacol. 2002. Vol. 35, no. 4. pp. 589–599.
21. Masini E., Mugnai L., Foschi M., Laffi G., Gentilini P., Mannaioni P.F. Changes in the production of nitric oxide and superoxide by inflammatory cells in liver cirrhosis // Gastroenterology. 2005. Vol. 129, no. 2. pp. 682–695.
22. Moore K.P., Mani A.R. Measurement of protein nitration and nitrosothiol formation in biology and medicine // Methods Enzymology. 2002. Vol. 359. pp. 256–268.
23. Rodrigo J., Fernandez A.P., Serrano J., Peinado M.A., Martinez A. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. // In: Free Radical Biology & Medicine. 2005. Vol. 39. pp. 26–50.
24. Schafer F.Q., Buettner G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple // Free Radic. Biol. Med. 2001. Vol. 30, no. 11. pp. 1191–1212.
25. Singh S., Evans T.V. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? // Eur. Respir. J. 1997. Vol. 10, no. 3. pp. 699–707.
26. Vos T.A., Gouw A.S., Klok P.A., Havinga R., van Goor H., Huitema S., Roelofsen H., Kuipers F., Jansen P.L., Moshage H. Differential effects of nitric oxide synthase inhibition on endotoxin-induced liver damage in rats // Gastroenterology. 1997. Vol. 113, no. 4. pp. 1323–1333.

Рецензенты:

Миннебаев М.М., д.м.н., профессор кафедры патофизиологии, ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», г. Казань;

Фролов Б.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патофизиологии, ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия», г. Оренбург.

Работа поступила в редакцию 14.10.2014.