

© Н.Ф.Воробьева, В.К.Спиридонов, 2010
УДК 616.36-018:599.323.4

Н.Ф. Воробьева и В.К. Спиридонов

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕЧЕНИ У КРЫС ПРИ ИЗМЕНЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ ОКСИДА АЗОТА И ПРИ ДЕАФФЕРЕНТАЦИИ КАПСАИЦИНОМ

Лаборатория функциональной нейроморфологии (зав. — д-р мед. наук В.К. Спиридонов) Научно-исследовательского института физиологии СО РАМН, г. Новосибирск

Цель исследования — изучение морфологических особенностей печени у крыс при блокаде синтеза окиси азота (NO) и увеличении его содержания у интактных крыс и при повреждении капсаицинчувствительных нервов. Показано, что повреждение капсаицинчувствительных нервов вызывает дистрофические и некротические изменения в печени на фоне воспалительной реакции, усиливаемые блокадой синтазы NO. Дефицит NO, вызванный блокадой NO-синтазы, приводит к нарушению регуляции сосудистого русла, что обуславливает ишемию и гипоксию, и как следствие, дистрофические и некротические нарушения в гепатоцитах. Полученные данные свидетельствуют о том, что в развитии дистрофий после изменения функции капсаицинчувствительных нервов, наряду со снижением содержания сенсорных нейропептидов, большую роль играют NO-зависимые механизмы. Введение предшественника NO — L-аргинина после деафферентации капсаицином снижает воспалительные реакции в печени.

Ключевые слова: печень, блокада NO, капсаицинчувствительные нервы, воспаление.

Капсаицин, компонент жгучего перца, в малых дозах активирует ванилоидные рецепторы (TRPV 1) первичных афферентных нейронов, а в больших дозах оказывает десенсибилизирующее и нейротоксическое действие. Нейропептиды капсаицинчувствительных нервов, выделяющиеся при раздражении ванилоидных рецепторов, осуществляют локальное эффекторное действие [12]. Оксид азота (NO), синтезируемый совместно с нейропептидами в капсаицинчувствительных нейронах [13], увеличивает выброс нейропептидов при стимуляции рецепторов, усиливает и опосредует их действие в регуляции сосудистого тонуса, проницаемости, воспалительных реакций [6, 8, 14]. В то же время, значительное увеличение содержания NO может оказывать цитотоксическое действие, обусловленное образованием продукта реакции свободных радикалов азота и кислорода — пероксинитрита, сильного окисляющего соединения [10].

Целью настоящей работы являлось изучение влияния блокады синтеза NO и увеличения его содержания у крыс при повреждении капсаицинчувствительных нервов на морфологические показатели печени.

Материал и методы. Опыты проведены на 78 крысах-самцах линии Вистар с исходной массой 160–180 г в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Экспериментальные группы состояли из 5–8 крыс. Были проведены следующие серии опытов.

1. *Деафферентация капсаицином* (Sigma, США). Препарат вводили под легким эфирным наркозом в растворителе (10% этилового спирта, 10% Твин-80, 80% раствора 0.9% NaCl), трехкратно, в суммарной дозе 150 мг/кг (30+50+70 мг/кг),

подкожно. 2. *Блокада синтеза NO.* Для этого использовали: а) ингибитор нейрональной NO-синтазы (nNOS) 7-нитроиндазол [(Sigma, США) 20 мг/(кг×сут), 2 раза внутрибрюшинно]; б) ингибитор смешанного действия метиловый эфир Nω-нитро-L-аргинина [L-NAME, ICN, 100 мг/(кг×сут) 2 раза внутрибрюшинно или 75 мг/(кг×сут) 8 раз]. 3. *Блокада синтеза NO совместно с нейротоксическими дозами капсаицина.* 7-нитроиндазол [25 мг/(кг×сут) 3 раза] или L-NAME [75 мг/(кг×сут) 3 раза] вводили за 30 мин до введения каждой дозы капсаицина. 4. *Увеличение содержания NO.* Для этого использовали предшественник синтеза NO L-аргинин (Sigma, США 200 мг/кг однократно внутрибрюшинно за 4 сут), а также донор NO нитропруссид натрия (1,5 мг/кг за 4 ч). 5. *Совместное введение L-аргинина и капсаицина:* а) 200 мг/кг L-аргинина за 15 ч и затем по 100 мг/кг за 1 ч до каждого трёхкратного введения капсаицина; б) длительное введение L-аргинина [100 мг/(кг×сут), 8 раз] через 1 сут после введения капсаицина. Контролем служили интактные животные, части из которых вводили растворитель капсаицина в соответствующее время. Животных декапитуировали под эфирным наркозом; образцы печени фиксировали в 10% формалине, депарафинированные гистологические срезы окрашивали гематоксилином Майера—эозином. Изучали структурные компоненты печени при увеличении 1000 с помощью микроскопа Jenamed-2 (Carl Zeiss, Германия). Морфометрический анализ препаратов осуществляли с использованием окулярной морфометрической сетки, состоящей из 25 тестовых точек и 5 линий, методом точечного счета [1]. На гистологических препаратах, полученных от каждого животного, исследовали по 100 полей зрения. Подсчитывали объемную плотность зон с дистрофическими (вакуолизация, зернистость цитоплазмы) и некротическими (вакуолизация цитоплазмы, кариопикноз, кариорексис) изменениями гепатоцитов, численную плотность двуядерных гепатоцитов. Для выявления статистической значимости отличий использовали параметрический критерий Стьюдента (при 95% уровне значимости).

Результаты исследования. 1. *Влияние деафферентации капсаицином.* Через 4 сут после

введения нейротоксических доз капсаицина в печени выявляется резкое расширение центральных вен и синусоидных сосудов долек, сладж эритроцитов, а в портальных трактах обнаруживается умеренно выраженная лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация. В гепатоцитах видны деструктивные явления — вакуолизация цитоплазмы, пикноз ядер, наблюдается частичный распад пластинок. По сравнению с контролем значительно увеличивается число дистрофически и некротически измененных гепатоцитов, а также их двуядерных форм (таблица).

Через 13 сут после введения капсаицина обнаружены аналогичные изменения: расширение кровеносных сосудов, сладж эритроцитов, умеренно выраженная лейкоцитарная и лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация. Отмечаются частичный распад пластинок, более выраженное увеличение числа дистрофически и некротически измененных гепатоцитов, а также двуядерных форм клеток по сравнению с таковыми в контроле (см. таблицу).

2. *Влияние блокады синтеза NO.* Через 1 сут после двукратного введения 7-нитроиндазола наблюдаются расширение центральных вен, синусоидных сосудов, выход из них единичных лейкоцитов. В портальных трактах видна умеренно выраженная лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация. Отмечается увеличение числа дистрофически и некротически измененных, а также двуядерных гепатоцитов по сравнению с таковыми в контроле (см. таблицу), пластиночное строение печени сохранено.

Через 1 сут после двукратного введения L-NAME нарушается пластиночная структу-

ра печени; центральные вены долек расширены, наблюдается сладж эритроцитов; синусоидные сосуды значительно расширены, в портальных трактах видна умеренно выраженная лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация. У этих животных по сравнению с получавшими 7-нитроиндазол в большей степени увеличено число дистрофически и некротически измененных гепатоцитов (см. таблицу).

Длительное введение L-NAME приводит к нарушению пластиночного строения печени. Значительно расширены центральные вены долек, в них наблюдается сладж эритроцитов, более выраженный, чем при введении капсаицина. Существенно расширены синусоиды, лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация выражена слабо. Число некротически и дистрофически измененных, а также двуядерных форм гепатоцитов возросло по сравнению с таковым при кратковременном действии L-NAME.

3. *Действие блокады синтеза NO совместно с нейротоксическими дозами капсаицина.* Введение капсаицина на фоне действия 7-нитроиндазола вызывает незначительные нарушения пластиночного строения печени. Центральные вены долек, синусоидные сосуды расширены, но несколько меньше, чем при введении только капсаицина. Иногда наблюдается выход единичных лейкоцитов в ткани печени. В портальных трактах отчетливо выражена лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация. Число дистрофически измененных и двуядерных гепатоцитов увеличено по сравнению с таковым в контроле и при введении только 7-нитроиндазола, но не больше, чем при деафферентации капсаицином, тогда

Показатели морфологических изменений печени при блокаде синтеза окиси азота и увеличении его содержания у интактных крыс и при деафферентации ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Воздействие	n	Срок наблюдения	Гепатоциты		
			Дистрофически измененные	Некротически измененные	Двуядерные
0 (контроль)	8	—	0,030±0,010	0,050±0,010	0,03±0,01
Капсаицин	8	4 сут	5,54±0,19*	0,42±0,18*	0,78±0,06*
	5	13 сут	5,90±0,19*	0,50±0,021*	0,85±0,04*
7-нитроиндазол	8	1 сут	0,50±0,007*	0,10±0,004*	0,50±0,020*
L-NAME	8	1 сут	1,50±0,05*	2,90±0,08*	0,11±0,007*
	5	13 сут	5,50±0,12*	6,01±0,12*	2,90±0,008*
Капсаицин+7-нитроиндазол	5	13 сут	4,80±0,18*	0,90±0,06*	0,70±0,020*
Капсаицин+L-NAME	5	13 сут	7,89±0,21*	8,07±0,17*	1,31±0,03*
Нитропруссид натрия	7	4 ч	0,30±0,04*	0,020±0,003*	0,40±0,05*
L-аргинин	7	4 сут	0,05±0,03*	0,030±0,004*	0,51±0,03*
Капсаицин+L-аргинин	7	4 сут	8,5±0,6*	0,040±0,010	0,71±0,05*
	5	13 сут	8,2±0,6*	0,020±0,003*	0,30±0,020*

* Различия по сравнению с контролем значимы при $P \leq 0,05$.

как число некротически измененных гепатоцитов превышает этот показатель после деафферентации капсаицином (см. таблицу).

Введение L-NAME до введения капсаицина вызывает более выраженный повреждающий эффект. В этом случае наблюдается значительное увеличение некротически и дистрофически измененных гепатоцитов по сравнению с контролем и с таковым при раздельном введении препаратов. Число двуядерных гепатоцитов увеличено по сравнению с их количеством при введении одного капсаицина, но меньше, чем после длительного введения L-NAME (см. таблицу). Расширение центральных вен долек более выражено, заметнее и расширение синусоидных сосудов, усилена лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация портальных трактов.

4. *Влияние увеличения содержания NO.* Через 4 сут после введения L-аргинина наблюдается значительное расширение и полнокровие центральных вен долек печени, усиленный сладж эритроцитов в капиллярах; синусоидные сосуды расширены; отмечается незначительный выход лейкоцитов в ткани; увеличивается лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация портальных трактов. Наблюдается увеличение дистрофически измененных и двуядерных и уменьшение числа некротически измененных гепатоцитов по сравнению с контролем (см. таблицу).

Через 4 ч после введения экзогенного источника NO нитропруссид натрия выявляется отчетливая сосудистая реакция в виде полнокровия центральных вен и микроциркуляторного русла, умеренно выраженная лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация. Число дистрофически измененных двуядерных гепатоцитов увеличивается, а число некротически измененных снижается по сравнению с таковым в контроле (см. таблицу).

5. *Влияние совместного введения L-аргинина и капсаицина.* Через 4 сут после совместного введения L-аргинина и капсаицина центральные вены, синусоиды значительно расширены, но полнокровия и сладжа эритроцитов не наблюдается, нет и лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации портальных трактов. Выявляется увеличение числа дистрофически измененных гепатоцитов по сравнению с таковым при раздельном введении L-аргинина и капсаицина, но некротически измененных гепатоцитов мало. Число двуядерных форм гепатоцитов увеличено по сравнению с таковым при введении только аргинина; пластиночное строение в центральной части долек печени не нарушено. Длительное введение аргинина после воздействия нейротоксическими дозами капсаицина значительно нарушает пластиночное строение печени. Число двуядерных гепатоцитов уменьшено по сравнению

с их количеством при раздельном введении препаратов; увеличено число дистрофически измененных гепатоцитов по сравнению с контролем, однако число некротически измененных снижено (см. таблицу). Наблюдается умеренно выраженная лейкоцитарная инфильтрация.

Обсуждение полученных данных. Исследование показало, что повреждение афферентных нервов капсаицином вызывает развитие дистрофических и некротических изменений, воспалительную реакцию и пролиферацию в тканях печени, более выраженные через 14 сут после его введения. Максимальное снижение содержания нейропептидов в капсаицинчувствительных нервах и их окончаниях наступает через 10–14 сут после воздействия капсаицином [12], что может быть причиной нарушения тканевого гомеостаза. Наряду с этим, полученные данные показали, что блокада nNOS 7-нитроиндазолом вызывает схожие нарушения тканевого гомеостаза, которые выражены в меньшей степени, чем при введении капсаицина. Однотипность наблюдаемых изменений говорит о том, что нарушение нитроксидагических механизмов является важным патогенетическим звеном развития деафферентационных изменений после введения нейротоксических доз капсаицина и свидетельствует об участии NO нейронального происхождения в поддержании баланса вазодилататорных и вазоконстрикторных механизмов в печени. Совместное применение ингибитора nNOS 7-нитроиндазола и нейротоксических доз капсаицина не приводит к суммированию их эффектов при раздельном применении, что также свидетельствует о том, что повреждение nNOS является составляющей действия капсаицина.

Более выраженные структурные изменения при воздействии ингибитором смешанного типа действия — L-NAME объясняются, по-видимому, его широким спектром влияния на различные формы NOS, увеличением проницаемости сосудов печени [4], содержания провоспалительных цитокинов [2], нейтрофильной инфильтрации [9, 11]. Усиление воспалительной реакции при введении капсаицина на фоне блокады NOS с L-NAME может быть одной из причин более выраженных изменений в структуре печени.

Кратковременное увеличение содержания NO введением его экзогенного источника (нитропруссид натрия) вызывает сосудистую реакцию, снижение числа некротически измененных, увеличение дистрофически измененных и двуядерных гепатоцитов по сравнению с контролем. Увеличение содержания эндогенного NO введением L-аргинина в наших экспериментах вызывало отчетливо выраженную сосудистую реакцию. При введении капсаицина в этих условиях сохраняется

сосудистая реакция, проявляющаяся расширением центральных вен, синусоидных сосудов без воспалительной реакции. Наблюдаются дистрофические изменения гепатоцитов, нарушение пластичной структуры печени в центральных участках долек и увеличение числа двуядерных гепатоцитов по сравнению с контролем. Отсутствие воспалительной реакции после совместного введения L-аргинина и капсаицина свидетельствует о частичном предотвращении повреждающего действия капсаицина. Полученные нами данные об отсутствии воспалительной реакции при введении L-аргинина как отдельно, так и совместно с капсаицином, согласуются с данными литературы о противовоспалительном действии L-аргинина [5, 7]. Наблюдаемые дистрофические изменения (вакуолизация гепатоцитов) после длительного введения L-аргинина могут быть следствием метаболических нарушений, обусловленных образованием цитотоксических продуктов при избыточном образовании NO [10], или активацией аргиназы и включения аргинина в цикл продукции мочевины, орнитина, пролина, субстрата синтеза коллагена и полиаминов, стимулирующих клеточную пролиферацию [3].

Обобщая полученные данные, можно сделать заключение, что повреждение капсаицинчувствительных нервов вызывает дистрофические и некротические изменения в печени на фоне воспалительной реакции, усиливаемые блокадой NOS. Дефицит NO, вызванный блокадой NOS, приводит к нарушению регуляции сосудистого русла, что, в свою очередь, вызывает ишемию и гипоксию и, как следствие, дистрофические и некротические изменения в печени. Можно предполагать, что в развитии дистрофий после нарушения функции капсаицинчувствительных нервов, наряду со снижением содержания сенсорных нейропептидов, большую роль играют связанные с NO механизмы. Введение предшественника NO L-аргинина после деафферентации капсаицином снижает воспалительные проявления в печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М., Медицина, 1990.
2. Chu C.J., Chang C.C. and Wang T.F. Detrimental effects of nitric oxide inhibition on hepatic encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure: role of nitric oxide synthase isoforms. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2006, v. 21, № 7, p. 1194–1199.
3. Curran J.N., Winter D.C. and Bouchier-Hayes D. Biological fate and clinical implications of arginine metabolism in tissue healing. *Wound Repair Regen.*, 2006, v. 14, № 4, p. 376–386.
4. Filep J.G., Foldes-Filep E., Rousseau A. et al. Vascular responses to endothelin-1 following inhibition of nitric oxide synthesis in the conscious rat. *Br. J. Pharmacol.*, 1993, v. 110, № 3, p. 1213–1221.
5. Gabriel A., Porrino M.L., Stephenson L.L. and Zamboni W.A. Effect of L-arginine on leukocyte adhesion in ischemia-reperfusion injury. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2004, v. 113, № 6, p. 1698–1702.
6. Holzer P., Wachter C., Heinemann A. et al. Sensory nerves, nitric oxide and NANC vasodilatation. *Arch. Int. Pharmacodyn Ther.*, 1995, v. 329, № 1, p. 67–69.
7. Loehe F., Bruns C.J., Nitsch S.M. et al. The role of L-arginine following trauma and blood loss. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 2007, v. 10, № 1, p. 80–87.
8. Merhi M., Dusting G.J. and Khalil Z. CGRP and nitric oxide of neuronal origin and their neurogenic vasodilatation in rat skin microvasculature. *Br. J. Pharmacol.*, 1998, v. 123, p. 863–868.
9. Ou J., Carlos T.M., Watkins S.C. et al. Differential effects of nonselective nitric oxide synthase (NOS) and selective inducible NOS inhibition on hepatic necrosis, apoptosis, ICAM-1 expression, and neutrophil accumulation during endotoxemia. *Nitric Oxide*, 1997, v. 5, № 1, p. 404–416.
10. Pacher P., Beckman J.S. and Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, 2007, v. 87, № 1, p. 315–424.
11. Peitan L., Yin K., Nagele R. et al. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates peroxynitrite generation, but augment neutrophil accumulation in hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Pharmacology*, 1998, v. 284, № 3, p. 1139–1146.
12. Szolcsanyi J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides*, 2004, v. 38, № 6, p. 377–384.
13. Thippeswamy T. and Morris R. The role of nitric oxide in dorsal root ganglion neurons. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2002, v. 962, p. 103–110.
14. Zheng Z., Shimamura K., Anthony T.L. et al. Nitric oxide is a sensory nerve neurotransmitter in the mesenteric artery of guinea pig. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 1997, v. 67, № 3, p. 137–144.

Поступила в редакцию 27.05.09

Получена после доработки 24.09.09

MORPHOLOGICAL PARAMETERS OF LIVER IN RATS DURING THE CHANGES OF NITRIC OXIDE CONTENT AND DEAFFERENTATION WITH CAPSAICIN

N.F. Vorobyova and V.K. Spiridonov

The aim of this investigation was to study the morphological changes of rat liver during the blockade of nitric oxide (NO) synthesis and its increased content in the intact rats and after the damage of capsaicin-sensitive nerves. It was shown that the damage of capsaicin-sensitive nerves resulted in dystrophic and necrotic changes in the liver, associated with the inflammatory reaction. These changes were enhanced by the blockade of NO-synthase. NO deficiency, caused by NO-synthase blockade, lead to disturbances of vascular bed control, resulting in ischemia and hypoxia, and, as a consequence, in dystrophic and necrotic changes in hepatocytes. The data obtained indicate that in the development of dystrophic changes after the modification of the function of capsaicin-sensitive nerves, along with the decrease in the sensory neuropeptide content, the significant role is played by NO-dependent mechanisms. Administration of NO precursor, L-arginine, after deafferentation with capsaicin, inhibited the inflammatory reactions in the liver.

Key words: liver, NO blockade, capsaicin-sensitive nerves, inflammation.

Laboratory of the Functional Neuromorphology, RAMS SB Scientific Research Institute of Physiology, Novosibirsk